

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202192832 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.01.19

(51) Int. Cl. C12Q 1/6876 (2018.01)
C12Q 1/6806 (2018.01)

(22) Дата подачи заявки
2020.04.16

(54) КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ДЛЯ СТАБИЛИЗАЦИИ микроРНК

(31) 19305496.2

(32) 2019.04.16

(33) EP

(86) PCT/EP2020/060760

(87) WO 2020/212522 2020.10.22

(71) Заявитель:
ЖЕНФИТ (FR)

(72) Изобретатель:
Майд Заухер (FR)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к стабилизации молекул микроРНК. Композиции и способы, представленные в настоящем описании, можно предпочтительно использовать для получения внутреннего контроля и стандартных микроРНК для включения в наборы, которые можно использовать для нормализованного, относительного или абсолютного количественного анализа микроРНК в биологической жидкости.

A1

202192832

202192832

A1

КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ДЛЯ СТАБИЛИЗАЦИИ микроРНК

Настоящее изобретение относится к стабилизации молекул микроРНК (мкРНК). Композиции и способы, представленные в настоящем описании, можно успешно использовать для подготовки стандартных микроРНК для включения в наборы, которые можно использовать для относительного или абсолютного количественного анализа мкРНК в биологической жидкости.

Циркулирующие мкРНК обладают множеством признаков, которые делают их привлекательным классом биомаркеров. Они являются стабильными, их последовательности являются эволюционно консервативными, экспрессия мкРНК зачастую является специфической в отношении ткани или патологии, и, т.к. ее можно определять посредством ПЦР в реальном времени, анализы могут являться высокочувствительными и специфическими. Однако также существуют проблемы, ассоциированные с детекцией циркулирующей мкРНК, которые все еще предстоит решить. Одна из проблем относится к низкому количеству тотальной РНК в крови, что затрудняет измерение концентрации и качества выделенной РНК. В связи с этим, очень важно i) иметь калиброванные и точные положительные контроли для интересующей мкРНК и ii) точно нормализовать определенные значения мкРНК для отклонений с учетом количества исходного материала и выделения мкРНК. Нормализацию осуществляют посредством поиска циркулирующей РНК "домашнего хозяйства". В некоторых исследованиях используют U6 или другую мкРНК (например, miR-16) в качестве РНК "домашнего хозяйства". Однако уровни этих РНК часто изменяются при патологических состояниях. В других статьях описан подход дополненной нормализации, в котором 3 синтетические мкРНК *Caenorhabditis elegans* (без гомологии в отношении мкРНК человека) добавляли во время очистки и использовали для нормализации данных. Однако, хотя мкРНК являются относительно стабильными в биологических жидкостях, находясь в ассоциации с белками и липидами, и упаковываются в микровезикулы, синтетическая мкРНК легко гидролизует РНКазы, и, таким образом, ее трудно обрабатывать или использовать. Это является серьезной проблемой, т.к. в подходе дополненной нормализации необходимо использовать стандарт мкРНК с известной концентрацией, что является требованием для абсолютного или относительного количественного анализа уровня мкРНК в биологической жидкости.

Настоящее изобретение относится к композициям и способам, позволяющим решить эту проблему.

Авторы настоящего изобретения в настоящем описании показали, что синтетическую мкРНК успешно можно включать в наборы, которые можно использовать для диагностики, прогнозирования или мониторинга заболевания, при ее комплексовании с липидным вектором.

Таким образом, первый аспект изобретения относится к диагностическому набору, содержащему один или более контейнеров, содержащих синтетическую мкРНК и липидный вектор, где указанная синтетическая мкРНК находится в определенной концентрации.

В конкретном аспекте изобретение относится к диагностическому набору, содержащему один или более контейнеров, содержащих синтетическую мкРНК, липидный вектор и матрицу (например, синтетическую сыворотку, плазму, истощенную в отношении нуклеиновой кислоты, образец, полученный из крови), где указанная синтетическая мкРНК находится в определенной концентрации.

В конкретном варианте осуществления набор содержит несколько контейнеров.

В первом варианте каждый контейнер может содержать одну и ту же синтетическую мкРНК, при этом указанная синтетическая мкРНК находится в разной определенной концентрации в каждом контейнере. Например, набор может содержать первый контейнер, содержащий синтетическую мкРНК в определенной концентрации, и по меньшей мере второй контейнер, содержащий ту же синтетическую мкРНК, что и первый контейнер, где концентрация синтетической мкРНК во втором контейнере отличается от ее концентрации в первом контейнере. Набор может содержать дополнительный третий контейнер, содержащий ту же синтетическую мкРНК, где концентрация синтетической мкРНК в третьем контейнере отличается от ее концентрации в первом контейнере и концентрации во втором контейнере. Набор может содержать один или более дополнительных контейнеров, содержащих одну и ту же синтетическую мкРНК в разных концентрациях.

Во втором варианте набор содержит:

- один или более контейнеров, содержащих первую синтетическую мкРНК; и
- один или более контейнеров, содержащих вторую синтетическую мкРНК, отличающуюся от первой мкРНК.

Например, набор может содержать:

- первый набор контейнеров, содержащий первую синтетическую мкРНК, где указанная первая синтетическая мкРНК находится в другой концентрации в каждом контейнере из первого набора контейнеров; и
- второй набор контейнеров, содержащий вторую синтетическую мкРНК, где указанная вторая синтетическая мкРНК находится в другой концентрации в каждом контейнере из второго набора контейнеров.

Набор может дополнительно содержать по меньшей мере один другой контейнер или по меньшей мере один другой набор контейнеров, содержащий дополнительную синтетическую мкРНК (например, третью или более чем третью синтетическую мкРНК). Дополнительная синтетическая мкРНК может отличаться от первой синтетической мкРНК, второй синтетической мкРНК и любой другой мкРНК более низкого порядка, включенной в набор. Например, в случае третьей синтетической мкРНК, указанная третья синтетическая мкРНК отличается от первой синтетической мкРНК и второй

синтетической мкРНК. В варианте осуществления, включающем другой набор контейнеров, дополнительная синтетическая мкРНК (например, третья синтетическая мкРНК) может находиться в другой концентрации в каждом контейнере из дополнительного (например, третьего) набора контейнеров.

Синтетические мкРНК, включенные в набор по изобретению, могут являться любой синтетической мкРНК, которую можно использовать для контроля качества или внутреннего контроля, диагностического, прогностического или мониторингового значения. Например, синтетические мкРНК, включенные в набор, могут иметь последовательность мкРНК, уровень, отсутствие или присутствие которой в биологической жидкости коррелирует с заболеванием или стадией заболевания, или потенциально коррелирует с заболеванием или стадией заболевания, или коррелирует с потенциальным заболеванием или потенциальной стадией заболевания. Иллюстративные заболевания, диагностика которых может включать оценку уровня, присутствия или отсутствия по меньшей мере одной мкРНК, включают, в качестве неограничивающих примеров, заболевание неалкогольного ожирения печени (NAFLD), NASH, злокачественные новообразования, фиброз, вирусные инфекции, нарушения нервной системы, сердечно-сосудистые нарушения и диабет.

В конкретном варианте осуществления синтетические мкРНК представляют собой мкРНК, уровень, отсутствие или присутствие которых ассоциировано с NAFLD, NASH или фиброзом, в частности, с NASH с фиброзом.

В конкретном варианте осуществления по меньшей мере один из одного или более контейнеров содержит синтетическую hsa-miR-34a (более конкретно - hsa-miR-34a-5p), hsa-miR-452 (более конкретно - hsa-miR-452-5p) или синтетическую hsa-miR-193 (более конкретно - hsa-miR-193b-3p).

В дополнительном конкретном варианте осуществления по меньшей мере один из одного или более контейнеров содержит синтетическую hsa-miR-34a (более конкретно - hsa-miR-34a-5p). В еще одном варианте осуществления набор содержит набор контейнеров, каждый из которых содержит синтетическую hsa-miR-34a (более конкретно - hsa-miR-34a-5p) в другой концентрации. В конкретном варианте указанный набор содержит один, по меньшей мере два или по меньшей мере три контейнера, каждый из которых содержит синтетическую hsa-miR-34a (более конкретно - hsa-miR-34a-5p) в другой концентрации. В другом конкретном варианте указанный набор содержит один, два или три контейнера, каждый из которых содержит синтетическую hsa-miR-34a (более конкретно - hsa-miR-34a-5p) в другой концентрации. Дополнительный вариант относится к набору, содержащему один контейнер, содержащий синтетическую hsa-miR-34a (более конкретно - hsa-miR-34a-5p) в определенной концентрации. Другой вариант относится к набору, содержащему два контейнера, содержащих синтетическую hsa-miR-34a (более конкретно - hsa-miR-34a-5p) в определенной концентрации, где концентрация синтетической hsa-miR-34a (более конкретно - hsa-miR-34a-5p) в первом контейнере отличается от концентрации синтетической hsa-miR-34a (более конкретно hsa-miR-34a-5p)

во втором контейнере. В дополнительном варианте набор содержит три контейнера, содержащих синтетическую hsa-miR-34a (более конкретно - hsa-miR-34a-5p) в определенной концентрации, где концентрация синтетической hsa-miR-34a (более конкретно - hsa-miR-34a-5p) в первом контейнере отличается от концентрации синтетической hsa-miR-34a (более конкретно - hsa-miR-34a-5p) во втором контейнере, и где концентрация синтетической hsa-miR-34a (более конкретно - hsa-miR-34a-5p) в третьем контейнере отличается от концентрации синтетической hsa-miR-34a (более конкретно - hsa-miR-34a-5p) в первом контейнере и втором контейнере.

В дополнительном конкретном варианте осуществления по меньшей мере один из одного или более контейнеров содержит синтетическую hsa-miR-193 (более конкретно - hsa-miR-193b-3p). В еще одном варианте осуществления набор содержит набор контейнеров, каждый из которых содержит синтетическую hsa-miR-193 (более конкретно - hsa-miR-193b-3p) в другой концентрации. В конкретном варианте указанный набор содержит один, по меньшей мере два или по меньшей мере три контейнера, каждый из которых содержит синтетическую hsa-miR-193 (более конкретно - hsa-miR-193b-3p) в другой концентрации. В другом конкретном варианте указанный набор содержит один, два или три контейнера, каждый из которых содержит синтетическую hsa-miR-193 (более конкретно - hsa-miR-193b-3p) в другой концентрации. Дополнительный вариант относится к набору, содержащему один контейнер, содержащий синтетическую hsa-miR-193 (более конкретно - hsa-miR-193b-3p) в определенной концентрации. Другой вариант относится к набору, содержащему два контейнера, содержащих синтетическую hsa-miR-193 (более конкретно - hsa-miR-193b-3p) в определенной концентрации, где концентрация синтетической hsa-miR-193 (более конкретно - hsa-miR-193b-3p) в первом контейнере отличается от концентрации синтетической hsa-miR-193 (более конкретно - hsa-miR-193b-3p) во втором контейнере. В дополнительном варианте набор содержит три контейнера, содержащих синтетическую hsa-miR-193 (более конкретно - hsa-miR-193b-3p) в определенной концентрации, где концентрация синтетической hsa-miR-193 (более конкретно - hsa-miR-193b-3p) в первом контейнере отличается от концентрации синтетической hsa-miR-193 (более конкретно - hsa-miR-193b-3p) во втором контейнере, и где концентрация синтетической hsa-miR-193 (более конкретно - hsa-miR-193b-3p) в третьем контейнере отличается от концентрации синтетической hsa-miR-193 (более конкретно - hsa-miR-193b-3p) в первом контейнере и втором контейнере.

В конкретном варианте осуществления по меньшей мере один из одного или более контейнеров содержит синтетическую cel-miR-39 (более конкретно - cel-miR-39-3p). В еще одном варианте осуществления набор содержит набор контейнеров, каждый из которых содержит синтетическую cel-miR-39 (более конкретно - cel-miR-39-3p) в другой концентрации. В конкретном варианте указанный набор содержит один, по меньшей мере два или по меньшей мере три контейнера, каждый из которых содержит синтетическую cel-miR-39 (более конкретно - cel-miR-39-3p) в другой концентрации. В другом конкретном варианте указанный набор содержит один, два или три контейнера, каждый из

которых содержит синтетическую cel-miR-39 (более конкретно - cel-miR-39-3p) в другой концентрации. Дополнительный вариант относится к набору, содержащему один контейнер, содержащий синтетическую cel-miR-39 (более конкретно - cel-miR-39-3p) в определенной концентрации. Другой вариант относится к набору, содержащему два контейнера, содержащих синтетическую cel-miR-39 (более конкретно cel-miR-39-3p) в определенной концентрации, где концентрация синтетической cel-miR-39 (более конкретно - cel-miR-39-3p) в первом контейнере отличается от концентрации синтетической cel-miR-39 (более конкретно - cel-miR-39-3p) во втором контейнере. В дополнительном варианте набор содержит три контейнера, содержащих синтетическую cel-miR-39 (более конкретно - cel-miR-39-3p) в определенной концентрации, где концентрация синтетической cel-miR-39 (более конкретно - cel-miR-39-3p) в первом контейнере отличается от концентрации синтетической cel-miR-39 (более конкретно - cel-miR-39-3p) во втором контейнере, и где концентрация синтетической cel-miR-39 (более конкретно - cel-miR-39-3p) в третьем контейнере отличается от концентрации синтетической cel-miR-39 (более конкретно - cel-miR-39-3p) в первом контейнере и втором контейнере.

В другом конкретном варианте осуществления по меньшей мере один из одного или более контейнеров содержит синтетическую cel-miR-40 (более конкретно - cel-miR-40-3p). В еще одном варианте осуществления набор содержит набор контейнеров, каждый из которых содержит синтетическую cel-miR-40 (более конкретно - cel-miR-40-3p) в другой концентрации. В конкретном варианте указанный набор содержит один, по меньшей мере два или по меньшей мере три контейнера, каждый из которых содержит синтетическую cel-miR-40 (более конкретно - cel-miR-40-3p) в другой концентрации. В другом конкретном варианте указанный набор содержит один, два или три контейнера, каждый из которых содержит синтетическую cel-miR-40 (более конкретно - cel-miR-40-3p) в другой концентрации. Дополнительный вариант относится к набору, содержащему один контейнер, содержащий синтетическую cel-miR-40 (более конкретно - cel-miR-40-3p) в определенной концентрации. Другой вариант относится к набору, содержащему два контейнера, содержащих синтетическую cel-miR-40 (более конкретно - cel-miR-40-3p) в определенной концентрации, где концентрация синтетической cel-miR-40 (более конкретно - cel-miR-40-3p) в первом контейнере отличается от концентрации синтетической cel-miR-40 (более конкретно - cel-miR-40-3p) во втором контейнере. В дополнительном варианте набор содержит три контейнера, содержащих синтетическую cel-miR-40 (более конкретно - cel-miR-40-3p) в определенной концентрации, где концентрация синтетической cel-miR-40 (более конкретно - cel-miR-40-3p) в первом контейнере отличается от концентрации синтетической cel-miR-40 (более конкретно - cel-miR-40-3p) во втором контейнере, и где концентрация синтетической cel-miR-40 (более конкретно - cel-miR-40-3p) в третьем контейнере отличается от концентрации синтетической cel-miR-40 (более конкретно - cel-miR-40-3p) в первом контейнере и втором контейнере.

В дополнительном конкретном варианте осуществления по меньшей мере один из одного или более контейнеров содержит синтетическую ath-miR-159a, cel-lin-4, cel-miR-2, cel-miR-238, cel-miR-54 или cel-miR-55, более конкретно - ath-miR-1549a, cel-lin4-5p, cel-miR2-3p, cel-miR-238-3p, cel-miR-54-3p или cel-miR-55-3p, соответственно.

Контейнеры из набора по изобретению содержат комплекс мкРНК и липидного вектора. Иллюстративные липидные векторы для практического осуществления изобретения могут содержать, в качестве неограничивающих примеров, катионные липиды, некатионные липиды (такие как нейтральные или анионные липиды) и конъюгированные липиды, такие как липиды, конъюгированные с аминокислотами, липиды, конъюгированные с пептидами, или липиды, конъюгированные с PEG. В другом варианте осуществления липидные векторы для практического осуществления изобретения содержат некатионные липиды (такие как нейтральные или анионные липиды) и конъюгированные липиды, такие как липиды, конъюгированные с аминокислотами, липиды, конъюгированные с пептидами, или липиды, конъюгированные с PEG. В конкретном варианте осуществления липидный вектор содержит по меньшей мере один катионный липид. В дополнительном конкретном варианте осуществления по меньшей мере один катионный липид смешивают с по меньшей мере одним нейтральным липидом и/или по меньшей мере одним конъюгированным липидом. В дополнительном конкретном варианте осуществления катионный липид можно смешивать с PEG, таким как C12-C20, в частности, C14-C18, PEG с молекулярной массой 500-7500.

В конкретном варианте осуществления липидный вектор для практического осуществления изобретения выбран из липидов, конъюгированных с PEG. В другом конкретном варианте осуществления липидный вектор является глицерофосфолипидом, конъюгированным с PEG. В еще одном варианте осуществления липидный вектор является моноглицерофосфоэтаноломином, конъюгированным с PEG, или диацилглицерофосфоэтаноломином, конъюгированным с PEG, или их солью. В дополнительном варианте осуществления липидный вектор является диацилглицерофосфоэтаноломином, конъюгированным с PEG, или его солью. В другом конкретном варианте осуществления липидный вектор является ди(C₁₄-C₁₈)ацилглицерофосфоэтаноломином, конъюгированным с PEG, или его солью, таким как ди-C₁₆-ацилглицерофосфоэтанолмин, конъюгированный с PEG, или его соль. В каждом из вариантов осуществления, описанных в этом абзаце, остаток PEG может являться PEG, имеющим молекулярную массу от 500 до 7500, в частности, от 750 до 5000, например, от 1000 до 4000. В конкретном варианте осуществления остаток PEG липидных векторов, описанных в этом абзаце, может иметь молекулярную массу от 1000 до 2000, 3000 или 4000, в частности, 2000. В дополнительном конкретном варианте осуществления липидный вектор представляет собой 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфоэтанолмин-N-[метокси(полиэтиленгликоль)-2000] (C16 PEG2000 PE) или его соль, такую как соль аммония.

В конкретном варианте осуществления катионный липид является моновалентным или поливалентным катионным липидом. Моновалентные катионные липиды включают, в качестве неограничивающих примеров, DOTMA, DOTAP, DMRIE и DDAB. Иллюстративные поливалентные катионные липиды включают, в качестве неограничивающих примеров, DOSPA, DOSPER, DOGS, TMTPS, TMTOS, TMTLS, TMTMS и TMDOS. Нейтральные липиды включают, в качестве неограничивающих примеров, DOPE, DPhPE и холестерин.

Например, иллюстративные липидные векторы включают, в качестве неограничивающих примеров, описанные в WO9405624, WO9427435, WO9502698, WO9517373, WO9640961, US8058068, WO9840502, US20060229246, US20030069173, WO200027795, WO200234879, WO2006102163, WO201268176, WO201611203 и US20190060482.

В конкретном варианте осуществления липидный вектор выбран из:

2,3-диолеилокси-1-(N, N-диметиламино)пропана;

2Н-изоиндол-2-этанаминия, N-[2,3-бис(9-октадеценилокси)пропил]-1,3-дигидро-N, N-диметил-1,3-диоксо-, бромид;

1-пропанаминия, N-(2-амино этил-N, N-диметил-2,3-бис(9-октадеценилокси)бромид;

3-окса-5,9,15-триазагептадекан-17-аминия, N-[2,3-бис(9-октадеценилокси)пропил]-9-[(1,1-диметилэтокси)карбонил]-13-[(1,1-диметилэтокси)карбонил][3-[(1,1-диметилэтокси)-карбонил]аминопропил]аминол-N, N,2,2-тетраметил-4,14-диоксо-, бромид;

1-пропанаминия, N-[2-[[2,5-бис[(3-аминопропил)амино]-1-оксо-пентил]амино]этил]-n, n-диметил-2,3-бис(9-октадеценилокси)-, тетра(трифторацетата)

1-пропанаминия, N-[2-(2-бром)этил]-N, N-диметил-2,3-бис(9-октадеценилокси)-, бромид;

1-пропанаминия, N-{2-[[3-[[4-[(3-аминопропил)амино]бутил]амино]пропил]амино]этил}-n, n-диметил-2,3-бис(9-октадеценилокси)-, бромид; и

1-пропанаминия, N-[2-[(3-аминопропил)амино]этил]-N, N-диметил-2,3-бис(9-октадеценилокси)-, бромид.

В конкретном варианте осуществления липидный вектор выбран из:

N, N,N',N'-тетрапальмитоилспермина, смешанного или несмешанного с DOPE;

N, N,N',N'-тетрапальмилспермина, смешанного или несмешанного с DOPE;

йодида N, N,N',N'-тетраметилтетрапальмилсперминтетрааммония, смешанного или несмешанного с DOPE;

йодида N, N,N',N'-гексаметилтетрапальмилсперминтетрааммония;

DOTMA:DOPE (в частности, 1:1 (масс./масс.))и

DOSPA:DOPE (в частности, 1,5:1 (масс./масс.));

В конкретном варианте осуществления липидный вектор представляет собой йодид N, N,N',N'-тетраметилтетрапальмилсперминтетрааммония, более конкретно - смесь 1:1 йодида N, N,N',N'-тетраметилтетрапальмилсперминтетрааммония и DOPE;

В конкретном варианте осуществления вектор на основе липида содержит трифторацетат 2,3-диолеилокси-N-[2(сперминкарбоксамидо)этил]-N, N-диметил-1-пропанаминия. В дополнительном варианте осуществления трифторацетат 2,3-диолеилокси-N-[2(сперминкарбоксамидо)этил]-N, N-диметил-1-пропанаминия смешивают с нейтральным липидом, таким как диолеоилфосфатидилэтаноламин.

В другом конкретном варианте осуществления вектор на основе липида содержит:

N¹,N⁴-диолеоил-диаминобутан

N¹,N⁴-диолеил-диаминобутан

N¹,N⁴-диолеил-N¹,N⁴-ди-[2-гидрокси-3-(N-фталамидо)пропил]-диамино-бутан

N¹,N⁴-диолеил-N¹,N⁴-ди-[2-гидрокси-3-(N-аминопропил)]-диаминобутан (DHDOS)

N¹,N⁴-димиристил-N¹,N⁴-ди-[2-гидрокси-3-(N-аминопропил)-диаминобутан;

N¹,N⁴-дипальмитил-N¹,N⁴-ди-[2-гидрокси-3-(N-аминопропил)-диаминобутан;

N¹,N⁴-дипальмитоил-N¹,N⁴-ди-[2-гидрокси-3-(N-аминопропил)-диаминобутан;

N¹,N⁴-дистеарил-N¹,N⁴-ди-[2-гидрокси-3-(N-аминопропил)-диаминобутан;

N¹,N⁴-дилаурил-N¹,N⁴-ди-[2-гидрокси-3-(N-аминопропил)-диаминобутан;

N¹,N²-димиристил-N¹,N²-ди-[2-гидрокси-3-(N-аминопропил)-диаминоэтан;

N¹,N²-дипальмитил-N¹,N²-ди-[2-гидрокси-3-(N-аминопропил)-диаминоэтан;

N¹,N²-дипальмитоил-N¹,N²-ди-[2-гидрокси-3-(N-аминопропил)-диаминоэтан;

N¹,N²-дистеарил-N¹,N²-ди-[2-гидрокси-3-(N-аминопропил)-диаминоэтан;

N¹,N²-дилаурил-N¹,N²-ди-[2-гидрокси-3-(N-аминопропил)-диаминоэтан;

N¹,N²-диолеил-N¹,N²-ди-[2-гидрокси-3-(N-аминопропил)-диаминоэтан;

N¹,N⁹-димиристил-N¹,N⁹-ди-[2-гидрокси-3-(N-аминопропил)-джеффамин;

N¹,N⁹-дипальмитил-N¹,N⁹-ди-[2-гидрокси-3-(N-аминопропил)-джеффамин;

N¹,N⁹-дипальмитоил-N¹,N⁹-ди-[2-гидрокси-3-(N-аминопропил)-джеффамин;

N¹,N⁹-дистеарил-N¹,N⁹-ди-[2-гидрокси-3-(N-аминопропил)-джеффамин;

N¹,N⁹-дилаурил-N¹,N⁹-ди-[2-гидрокси-3-(N-аминопропил)-джеффамин;

N¹,N⁹-диолеил-N¹,N⁹-ди-[2-гидрокси-3-(N-аминопропил)-джеффамин

N¹,N⁴-диолеил-N¹,N⁴-ди-[2-гидрокси-3-(N-карбоксамидин)аминопропил]-

диаминобутан;

N¹,N⁴-диолеил-N¹,N⁴-ди-{2-гидрокси-3-[N-(NI, NII,NIII, NIV-бутоксикарбонил-сперминкарбоксамидо)]аминопропил} диаминобутан;

N¹,N⁴-диолеил-N¹,N⁴-ди-[2-гидрокси-3-(N-сперминкарбоксамидо)-аминопропил]-диаминобутан.

N¹,N⁴-димиристил-N¹,N⁴-ди-[2-гидрокси-3-(N-сперминкарбоксамидо)аминопропил]-диаминобутан;

N¹,N⁴-дипальмитил-N¹,N⁴-ди-[2-гидрокси-3-(N-сперминкарбоксамидо)-аминопропил]-диаминобутан;

N^1, N^4 -дипальмитоил- N^1, N^4 -ди-[2-гидрокси-3-(N-сперминкарбоксамидо)аминопропил]-диаминобутан;
 N^1, N^4 -дистеарил- N^1, N^4 -ди-[2-гидрокси-3-(N-сперминкарбоксамидо)-аминопропил]-диаминобутан;
 N^1, N^4 -дилаурил- N^1, N^4 -ди-[2-гидрокси-3-(N-сперминкарбоксамидо)-аминопропил]диаминобутан;
 N^1, N^9 -димиристил- N^1, N^9 -ди-[2-гидрокси-3-(N-сперминкарбоксамидо)аминопропил]-джеффамин;
 N^1, N^9 -дипальмитил- N^1, N^9 -ди-[2-гидрокси-3-(N-сперминкарбоксамидо)-аминопропил]-джеффамин;
 N^1, N^9 -дипальмитоил- N^1, N^9 -ди-[2-гидрокси-3-(N-сперминкарбоксамидо)аминопропил]-джеффамин;
 N^1, N^9 -дистеарил- N^1, N^9 -ди-[2-гидрокси-3-(N-сперминкарбоксамидо)-аминопропил]-джеффамин;
 N^1, N^9 -дилаурил- N^1, N^9 -ди-[2-гидрокси-3-(N-сперминкарбоксамидо)-аминопропил]джеффамин;
 N^1, N^9 -диолеил- N^1, N^9 -ди-[2-гидрокси-3-(N-сперминкарбоксамидо)-аминопропил]джеффамин;
 N^1, N^2 -димиристил- N^1, N^2 -ди-[2-гидрокси-3-(N-сперминкарбоксамидо)-аминопропил]-диаминоэтан;
 N^1, N^2 -дипальмитил- N^1, N^2 -ди-[2-гидрокси-3-(N-сперминкарбоксамидо)аминопропил]-диаминоэтан;
 N^1, N^2 -дипальмитоил- N^1, N^2 -ди-[2-гидрокси-3-(N-сперминкарбоксамидо)-аминопропил]-диаминоэтан;
 N^1, N^2 -дистеарил- N^1, N^2 -ди-[2-гидрокси-3-(N-сперминкарбоксамидо)-аминопропил]диаминоэтан;
 N^1, N^2 -дилаурил- N^1, N^2 -ди-[2-гидрокси-3-(N-сперминкарбоксамидо)-аминопропил]диаминоэтан;
 N^1, N^2 -диолеил- N^1, N^2 -ди-[2-гидрокси-3-(N-сперминкарбоксамидо)-аминопропил]-диаминоэтан.

В дополнительном варианте осуществления вектор на основе липида содержит:

N, N', N'', N''' -тетраметилтетрапальмитилспермин (TMTPS-йодид или TMTPS-хлорид);

N, N', N'', N''' -тетраметилтетрапальмитилспермин (TMTPS-йодид), смешанный с DOPE ((например, 1:1,5 (М/М));

липосомальный N, N', N'', N''' -тетраметилтетрапальмитилспермин (TMTPS-йодид), смешанный с DOPE (например, 1:1,5 (М/М)).

В другом варианте осуществления вектор на основе липида содержит амин-содержащий липид, такой как:

тетрадецил-2-[3-метиламинопропил-(2-оксо-2-тетрадекоксиэтил)амино]ацетат;

2-[2-[2-[2-[бис[2-(додециламино)-2-оксо-этил]амино]этил-[2-(додециламино)-2-оксо-этил]амино]этиламино]этил-[2-(додециламино)-2-оксо-этил]амино]-N-додецил-ацетамид;

2-[2-[2-[2-[бис[2-(додециламино)-2-оксоэтил]амино] этиламино] этиламино] этил-[2-(додециламино)-2-оксоэтил]амино]-N-додецил-ацетамид;

дипентадецил-4,4'-(3-(метил(4-оксо-4-(пентадецилокси)бутил)амино)пропилазанидиол)дибутианоат; и
пентадецил-4-(метил(3-(4-оксо-4-(пентадецилокси)бутиламино)пропил)амино)бутианоат.

В дополнительном конкретном варианте осуществления липидный вектор содержит по меньшей мере одно из соединений 1-87 из WO2012068176. В дополнительном конкретном варианте осуществления липидный вектор содержит по меньшей мере один липид, выбранный из группы, состоящей из:

Соединение 1 из WO2012068176;
Соединение 2 из WO2012068176;
Соединение 3 из WO2012068176;
Соединение 4 из WO2012068176;
Соединение 5 из WO2012068176;
Соединение 6 из WO2012068176;
Соединение 7 из WO2012068176;
Соединение 8 из WO2012068176;
Соединение 9 из WO2012068176;
Соединение 10 из WO2012068176;
Соединение 11 из WO2012068176;
Соединение 12 из WO2012068176;
Соединение 13 из WO2012068176;
Соединение 14 из WO2012068176;
Соединение 15 из WO2012068176;
Соединение 16 из WO2012068176;
Соединение 17 из WO2012068176;
Соединение 18 из WO2012068176;
Соединение 19 из WO2012068176;
Соединение 20 из WO2012068176;
Соединение 21 из WO2012068176;
Соединение 22 из WO2012068176;
Соединение 23 из WO2012068176;
Соединение 24 из WO2012068176;
Соединение 25 из WO2012068176;
Соединение 26 из WO2012068176;
Соединение 27 из WO2012068176;

Соединение 28 из WO2012068176;
Соединение 29 из WO2012068176;
Соединение 30 из WO2012068176;
Соединение 31 из WO2012068176;
Соединение 32 из WO2012068176;
Соединение 33 из WO2012068176;
Соединение 34 из WO2012068176;
Соединение 35 из WO2012068176;
Соединение 36 из WO2012068176;
Соединение 37 из WO2012068176;
Соединение 38 из WO2012068176;
Соединение 39 из WO2012068176;
Соединение 40 из WO2012068176;
Соединение 41 из WO2012068176;
Соединение 42 из WO2012068176;
Соединение 43 из WO2012068176;
Соединение 44 из WO2012068176;
Соединение 45 из WO2012068176;
Соединение 46 из WO2012068176;
Соединение 47 из WO2012068176;
Соединение 48 из WO2012068176;
Соединение 49 из WO2012068176;
Соединение 50 из WO2012068176;
Соединение 51 из WO2012068176;
Соединение 52 из WO2012068176;
Соединение 53 из WO2012068176;
Соединение 54 из WO2012068176;
Соединение 55 из WO2012068176;
Соединение 56 из WO2012068176;
Соединение 57 из WO2012068176;
Соединение 58 из WO2012068176;
Соединение 59 из WO2012068176;
Соединение 60 из WO2012068176;
Соединение 61 из WO2012068176;
Соединение 62 из WO2012068176;
Соединение 63 из WO2012068176;
Соединение 64 из WO2012068176;
Соединение 65 из WO2012068176;
Соединение 66 из WO2012068176;
Соединение 67 из WO2012068176;

Соединение 68 из WO2012068176;
 Соединение 69 из WO2012068176;
 Соединение 70 из WO2012068176;
 Соединение 71 из WO2012068176;
 Соединение 72 из WO2012068176;
 Соединение 73 из WO2012068176;
 Соединение 74 из WO2012068176;
 Соединение 75 из WO2012068176;
 Соединение 76 из WO2012068176;
 Соединение 77 из WO2012068176;
 Соединение 78 из WO2012068176;
 Соединение 79 из WO2012068176;
 Соединение 80 из WO2012068176;
 Соединение 81 из WO2012068176;
 Соединение 82 из WO2012068176;
 Соединение 83 из WO2012068176;
 Соединение 84 из WO2012068176;
 Соединение 85 из WO2012068176;
 Соединение 86 из WO2012068176;
 Соединение 87 из WO2012068176; и
 их солей.

В другом конкретном варианте осуществления липидный вектор может представлять собой липидный состав, описанный в таблицах 1, 2 и 3 из WO2012068176, воспроизведенных ниже:

Таблица 1 из WO2012068176

Соединение из WO2012068176	Липид PEG	Хелперный липид	Буфер	Этанол, %	Концентрация, мг/мл
49	C16 PEG2000 PE	Холестерин	50 mM ацетата натрия	25	15,625
7	C16 PEG2000 PE	Холестерин	50 mM ацетата натрия	25	15,625
69	C14 PEG2000 PE	Холестерин	50 mM ацетата натрия	25	15,625
70	C14 PEG2000 PE	Холестерин	50 mM ацетата натрия	25	15,625
51	C14 PEG2000 PE	Холестерин	50 mM ацетата натрия	25	15,625
52	C14	Холестерин	50 mM ацетата	25	15,625

	PEG2000 PE		натрия		
54	C14 PEG2000 PE	Холестерин	50 мМ ацетата натрия	25	15,625
56	C16 PEG2000 PE	Холестерин	50 мМ ацетата натрия	25	15,625
57	C16 PEG2000 PE	Холестерин	50 мМ ацетата натрия	25	15,625
73	C16 PEG2000 PE	Холестерин	50 мМ ацетата натрия	25	15,625
76	C16 PEG2000 PE	Холестерин	50 мМ ацетата натрия	25	15,625
77	C16 PEG2000 PE	Холестерин	50 мМ ацетата натрия	25	15,625

Таблица 2 из WO2012068176:

Соединение из WO2012068176	Липид PEG	Хелперный липид	Буфер	Этанол, %	Концентрация, мг/мл
IVF2.0	C16 PEG2000 PE	Холестерин	139,5 мМ ацетата натрия	25	15,625
57 NO (CB00396)	C16 PEG2000 PE	Холестерин	139,5 мМ ацетата натрия	25	15,625
57 OPT (CB00396)	C14 PEG2000 PE	Холестерин	139,5 мМ ацетата натрия	25	15,625
72 OPT (CB00401)	C14 PEG2000 PE	Холестерин	139,5 мМ ацетата натрия	25	15,625
84 NO (CB00416)	C14 PEG2000 PE	Холестерин	139,5 мМ ацетата натрия	25	15,625
84 OPT (CB00416)	C14 PEG2000 PE	Холестерин	139,5 мМ ацетата натрия	25	15,625

Соединение из WO2012068176	Хелперный липид	Этанол, %
83	Нет	100
67	Холестерин	100

В дополнительном конкретном варианте осуществления липидный вектор представляет собой смесь DHDMS, HDMS, DOPE и холестерина. В другом варианте

осуществления липидный вектор представляет собой липидный состав, описанный в таблице 1 WO2016011203:

Таблица 1 WO2016011203:

Состав	DHDMS	HDMS	DOPE	Холестерин
1	0,1	0,1	0,4	0,4
2	0,1	0,25	0,25	0,4
3	0,1	0,25	0,4	0,25
4	0,1	0,4	0,1	0,4
5	0,1	0,4	0,25	0,25
6	0,1	0,4	0,4	0,1
7	0,1	0,3	0,3	0,3
8	0,2	0,4	0,2	0,2
9	0,2	0,2	0,2	0,4
10	0,2	0,2	0,4	0,2
11	0,25	0,4	0,1	0,25
12	0,25	0,4	0,25	0,1
13	0,25	0,1	0,25	0,4
14	0,25	0,1	0,4	0,25
15	0,25	0,25	0,1	0,4
16	0,25	0,25	0,4	0,1
17	0,3	0,1	0,3	0,3
18	0,3	0,3	0,1	0,3
19	0,3	0,3	0,3	0,1
20	0,4	0,4	0,1	0,1
21	0,4	0,2	0,2	0,2
22	0,4	0,25	0,1	0,25
23	0,4	0,25	0,25	0,1
24	0,4	0,1	0,1	0,4
25	0,4	0,1	0,25	0,25
26	0,4	0,1	0,4	0,1

В дополнительном конкретном варианте осуществления липидный вектор содержит состав липидных наночастиц, как описано в US20190060482, содержащий PEG с молекулярной массой 750, 2000 или 5000 и длиной цепи 14 или 18, DHDMS, HDMS, DOPE и холестерин. Более конкретно, состав является одним из составов из таблицы 2 US20190060482:

Состав	Длина цепи PEG	Молекулярная масса PEG	DHDMS	HDMS	DOPE	Холестерин	PEG
Bruce #3.10	14	5000	0,24	0,38	0,32	0,05	0,01
Bruce #3.14	14	5000	0,32	0,39	0,26	0,01	0,02
Bruce #3.20	14	5000	0,18	0,38	0,32	0,10	0,02
Bruce #3.19	14	5000	0,23	0,45	0,20	0,10	0,02
Bruce #3.11	14	5000	0,18	0,51	0,20	0,10	0,01
Bruce #3.15	14	5000	0,27	0,38	0,32	0,01	0,02
Bruce #3.12	14	5000	0,25	0,38	0,26	0,10	0,01
Bruce #2.2	18	750	0,28	0,24	0,32	0,14	0,02
Bruce #3.16	14	5000	0,18	0,47	0,32	0,01	0,02
Bruce #4	14	2000	0,24	0,40	0,24	0,10	0,02
Bruce #3.18	14	5000	0,32	0,38	0,20	0,08	0,02
Молярные диапазоны			0,18-0,32	0,24-0,51	0,20-0,32	0,01-0,14	0,01-0,02

В конкретном варианте осуществления липидный вектор является реагентом для трансфекции на основе липида, таким как реагент для трансфекции на основе липида, выбранный из:

InvivoFectamine[®];

InvivoFectamine[®] 2.0;

InvivoFectamine[®] 3.0;

Липофектамина (смесь 3:1 (масс./масс.) поликатионного липида, 2,3-диолеилокси-N-[2(сперминкарбоксамидо)этил]-N, N-диметил-1-пропанаминия трифторацетата (DOSPA), и DOPE);

Липофектамина 2000;

Lipofectace (смесь 1:2,5 (масс./масс.) бромид диметилдиоктадециламмония (DDAB) и диолеилфосфатидилэтаноламина (DOPE));

DORI-простой эфир;

DORI-простой эфир/лизолипид;

Lipofectin (смесь 1:1 (масс./масс.) хлорида N-[1-(2,3-диолеилокси)пропил]-N, N,N-триметиламмония (DOTMA) и диолеилфосфатидилэтаноламина (DOPE));

DOTAP;

BioPORTER;

Cellfectin (липосомальный состав 1:1,5 М/М катионного липида тетраметилпальмитилспермина (TMTPS) и DOPE); и

DMRIE-C (липосомальный состав 1:1 М/М катионного липида бромид N-(2-гидроксиэтил)-N, N-диметил-2,3-бис(тетрадецилокси)-1-пропанаминия (DMRIE) и холестерина).

В конкретном варианте осуществления липидный вектор представляет собой Invivofectamine[®] 2.0 или Invivofectamine[®] 3.0, в частности, Invivofectamine[®] 3.0.

Изобретение также относится к применению диагностического набора по изобретению.

В конкретном варианте осуществления диагностический набор по изобретению используют в способе диагностики заболевания. В частности, набор используют для получения калибровочного стандарта для мкРНК, содержащихся в наборе.

В контексте настоящего изобретения выражение "способ диагностики" означает способ диагностики, прогнозирования или мониторинга заболевания, а также способ оценки эффективности лечения заболевания.

Таким образом, настоящее изобретение относится к применению диагностического набора по изобретению в способе диагностики, прогнозирования или мониторинга заболевания. Набор по изобретению может представлять собой способ для диагностики неалкогольного стеатогепатита (NASH) и классификации индивидуума в качестве потенциального реципиента лечения NASH, как описано в заявке РСТ WO2017167934.

Изобретение дополнительно относится к способу диагностики заболевания, включающему определение уровня мкРНК в биологическом образце индивидуума, где уровень указанной мкРНК сравнивают с уровнем той же мкРНК в стандарте или положительном контроле из набора по настоящему изобретению.

В конкретном варианте осуществления применение и способы по изобретению включают сравнение уровня мкРНК, определенной в биологическом образце, с уровнем синтетической мкРНК, используемой в качестве стандарта или положительного контроля в наборе.

В другом варианте осуществления применение и способы по изобретению включают нормализацию уровня мкРНК, определенной в биологическом образце, с использованием уровня синтетической мкРНК, используемой в качестве внутреннего контроля в наборе.

В дополнительном варианте осуществления применение и способы по изобретению включают нормализацию уровня мкРНК, определенной в биологическом образце, с использованием выхода выделения синтетической мкРНК, используемой в качестве стандарта или положительного контроля в наборе.

Применение и способы по изобретению полезны для количественного анализа мкРНК в образце биологической жидкости индивидуума, таком как образцы, полученные из крови, например, цельная кровь, сыворотка или плазма, в частности, сыворотка.

В дополнительном варианте осуществления применение и способы по изобретению включают добавление определенного количества синтетической мкРНК в набор по изобретению в биологический образец, в котором предполагают определять уровень мкРНК. В конкретном варианте осуществления добавленная синтетическая мкРНК является не принадлежащей человеку мкРНК, экзогенной мкРНК, отсутствующей в образце индивидуума. Например, не принадлежащую человеку синтетическую или экзогенную мкРНК можно получать из *Caenorhabditis elegans (cel)* или *Arabidopsis thaliana (ath)*. В конкретном варианте осуществления дополненная мкРНК является cel-miR39 (в частности, cel-miR-39-3p). Другие не принадлежащие человеку мкРНК для использования в качестве синтетической мкРНК в контексте настоящего изобретения включают, в качестве неограничивающих примеров, ath-miR-159a и cel-miR-40-3p.

Таким образом, набор по изобретению можно использовать для получения внутреннего контроля, измеренного одновременно с мкРНК, подлежащей тестированию в образце биологической жидкости. Ее можно использовать для вычисления уровня мкРНК в образце по следующей формуле, приведенной в иллюстративных целях в отношении измерения hsa-miR-34a-5p в качестве мкРНК, подлежащей тестированию в образце, и cel-miR-39-3p в качестве внутреннего контроля и дополненной синтетической мкРНК:

$$\text{Уровни hsa-miR-34a-5p} = 2^{-\Delta\Delta Cq}$$

где: $\Delta\Delta Cq = \Delta Cq_{\text{образца}} - \Delta Cq_{\text{стандарта}}$

$\Delta Cq_{\text{образца}} = Cq_{\text{hsa-miR-34a-5p образца}} - Cq_{\text{cel-miR-39-3p, добавленной в образцы}}$

$\Delta Cq_{\text{стандарта}} = Cq_{\text{hsa-miR-34a-5p положительного стандарта}} - Cq_{\text{cel-miR-39-3p, добавленной в положительный стандарт}}$

ПРИМЕРЫ

- Комплексный препарат InvivoFectamine[®]/miR

Высокоочищенные олигорибонуклеотиды мкРНК синтезируют на заказ в IDT (Integrated DNA Technologies Skokie, Illinois USA).

Реагент InvivoFectamine[®] 3.0 (IVF3001-3005, ThermoFisher Scientific, USA) использовали для получения комплексов с мкРНК по инструкциям производителя (публикация № MAN0013651 Rev A.0.pdf). Комплекс мкРНК/InvivoFectamine[®] (IVF) использовали без разведения или разводили в 6 раз посредством добавления 1 мл PBS (pH 7,4).

- Получение стандартов и внутренних контролей

Для получения стандартов мкРНК или внутренних контролей 5 мкл препарата добавляют в 1) биологические базовые матрицы для стандартных препаратов (т.е. сыворотку или плазму здоровых доноров или другие базовые матрицы) или 2) напрямую в биологические образцы в качестве внутренних контролей.

Стандарты мкРНК, положительные контроли и внутренние контроли получают с использованием олигорибонуклеотида синтетической мкРНК (т.е. hsa-miR-34a-5p, cel-miR-39-3p, cel-miR-40-3p).

- Выделение малой РНК

Подлежащие тестированию образцы размораживают на льду. Биологические образцы осторожно перемешивают на центрифуге типа вортекс и центрифугируют при 6000×g в течение 15 минут.

Автоматизированное выделение с использованием MagMax mirVana™ на системе KingFisher™ (KingFisher™ Flex System, кат. № 5400630, ThermoFisher) осуществляли по инструкциям производителя (KingFisher™_Flex_User_Manual_5400630.pdf, кат. № N07669). Набор для выделения тотальной РНК MagMax mirVana™ (A27828, ThermoFisher) использовали, следуя руководству пользователя (руководство пользователя к набору для выделения тотальной РНК MagMAX mirVana™ (ручное выделение) - публикация № MAN0011131 - Rev. B.0.pdf).

- Обратная транскрипция (RT)

Реакцию обратной транскрипции осуществляли с использованием набора для обратной транскрипции микроРНК TaqMan®, кат. № 4366597, следуя руководству пользователя: TaqMan® Small RNA Assays Protocol (PN 4364031E).pdf, кат. № 4364031 Rev E 01/2011, и праймера для анализа RT микроРНК Taqman® [60-кратного], кат. № 4440888 (крупный формат). Инкубацию осуществляли в термоциклере Bio-Rad T100 по инструкциям производителя (термоциклер Bio-Rad T100, кат. № 186-1096.pdf). кДНК хранили в пробирках с низким связыванием при -20°C до дальнейшего использования.

- Количественная ПЦР

Экспрессию зрелой мкРНК количественно анализировали по инструкциям производителя с использованием 20-кратной смеси для анализа RT-qPCR мкРНК Taqman и универсального мастер-микса II TaqMan, без урацил-N-гликозидазы (UNG), 2-кратного (Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, CA) в 96-луночном планшете для ПЦР ThermoFisher с прозрачными лунками и "полу-юбкой", кат. № AB-0900. Фиксированный объем 5 мкл тотальной РНК использовали в качестве матрицы для анализа qPCR с использованием IVD-сертифицированной системы CFX96™ Real-Time System-C1000 по инструкциям производителя (Bio-Rad CFX96 Touch_Instruction manual.pdf, кат. № 110021337, Rev E US/EG). Использовали смесь для анализа hsa-miR-34a-5p TaqMan. Продукт RT синтетической мкРНК серийно разводили и осуществляли ПЦР на всех образцах (стандарты и полученная из сыворотки РНК). Режимом определения Cq являлась регрессия.

Последовательности зрелой мкРНК и ID анализа TaqMan приведены в следующей таблице:

ID мкРНК	Последовательность	№ miRbase	ID анализа
cel-miR-39-3p	UCACCGGGUGUAAAUCAGCUUG (SEQ ID NO: 1)	MIMAT0000010	000200
hsa-miR-34a-5p	UGGCAGUGUCUUAGCUGGUUGU (SEQ ID NO:2)	MIMAT0000255	000426

РЕЗУЛЬТАТЫ

А. Комплексообразование InvivoFectamine[®] с hsa-miR-34a-5p защищает синтетическую мкРНК от деградации.

Фигура 1: InvivoFectamine[®] защищает олигорибонуклеотид синтетической hsa-miR-34a-5p, добавленный в сыворотку.

Уровни экспрессии hsa-miR-34a-5p в отсутствие (А) или присутствии (В) InvivoFectamine[®]. Черный столбец: совокупность сыворотки от здоровых доноров с очень низкими уровнями hsa-miR-34a, используемая в качестве биологической базовой матрицы, серый столбец: базовая матрица, дополненная синтетической hsa-miR-34a-5p без InvivoFectamine[®] (IVF), до или после денатурации. Белый столбец: базовая матрица, дополненная синтетической hsa-miR-34a-5p, инкапсулированной в IVF.

hsa-miR-34a-5p определяют у здоровых пациентов (матрица) на очень низких уровнях (33,6 Cq). Добавление синтетической hsa-miR-34a-5p, используемой в качестве дополнения после добавления денатурирующего буфера в сыворотку, приводит к индуцированию (23,3 Cq). Синтетическая мкРНК деградирует, если добавление происходит до обработки сыворотки денатурирующим буфером (матрицы+hsa-miR-34a-5p). Примечательно, что комбинация InvivoFectamine[®] с hsa-miR-34a-5p до разведения 1:6 восстанавливает уровень мкРНК, определенный, когда дополняемую мкРНК добавляют после денатурирующего буфера. Комплекс мкРНК/InvivoFectamine[®] можно использовать с разведенным 1/6 комплексом (фигура 1).

Фигура 2: стабильность комплекса мкРНК/InvivoFectamine[®] при 4°C до 4 ч.

Тестировали два условия получения комплекса мкРНК/InvivoFectamine[®]: температуру 4°C (черные столбцы) и комнатную температуру (RT, белые столбцы) и время между получением комплекса и его использованием (0, 1 и 4 часов). Матрица: совокупность сыворотки от здоровых доноров (Etablissement Français du Sang: EFS) с очень низкими уровнями hsa-miR-34a-5p.

При комнатной температуре уровни hsa-miR-34a-5p снижаются в матрице и в матрице с добавлением hsa-miR-34a-5p. Уровни остаются постоянными при 4°C. Этот результат позволяет предполагать, что подход дополнения в образцах, полученных из крови, может быть замедлен при 4°C после получения комплекса мкРНК/InvivoFectamine[®] (фигура 2).

Фигура 3: Invivofectamine® защищает олигорибонуклеотид синтетической hsa-miR-34a-5p, добавленный в сыворотку, при 4°C до 4 недель.

Уровни hsa-miR-34a-5p являются стабильными в дополненной сыворотке с комплексом hsa-miR-34a-5p/Invivofectamine® до 4 недель при 4°C (фигура 3).

Фигура 4: Стабильность синтетической мкРНК в сыворотке при комбинировании с Invivofectamine® после повторяющихся циклов замораживания-размораживания при -20°C.

Тестировали 5 циклов замораживания/размораживания. Повторяющиеся циклы замораживания/размораживания при -20°C не влияют на уровни hsa-miR-34a-5p, если синтетическую мкРНК комбинируют с Invivofectamine®.

В. Надежность анализа hsa-miR-34a-5p с использованием комплексов miR/IVF

	Вариабельность в пределах анализа								Вариабельность среди анализов			
	Эксперимент #1				Эксперимент #2				Эксперимент #1+2			
	Cel-miR-39-3p		hsa-miR-34a-5p		Cel-miR-39-3p		hsa-miR-34a-5p		Cel-miR-39-3p		hsa-miR-34a-5p	
	4°C	-80°C	4°C	-80°C	4°C	-80°C	4°C	-80°C	4°C	-80°C	4°C	-80°C
Среднее (Cq)	28,30	28,13	31,40	31,25	28,34	28,07	31,38	31,17	28,32	28,10	31,39	31,21
SD (Cq)	0,12	0,08	0,28	0,26	0,19	0,12	0,42	0,24	0,15	0,10	0,35	0,25
CV (%)	0,41	0,28	0,89	0,84	0,66	0,41	1,33	0,78	0,54	0,36	1,11	0,81

Среднее (кратное)	1,01	1,12	1,02	1,17	1,02	1,15
SD (кратное)	0,16	0,17	0,23	0,16	0,2	0,17
CV (%)	16,01	15,47	22,37	13,92	19,31	14,41

Таблица 1: Вариабельность в пределах анализа и среди анализов для hsa-miR-34a-5p, измеренной с использованием стандартного положительного контроля (n=12 для каждого тестируемого условия) и комплекса cel-miR-39-3p/IVF в качестве внутреннего контроля (добавленного в каждый образец). Образцы инкубировали при 4°C в течение 4 ч. или напрямую замораживали при -80°C. Данные выражали как среднее Cq +/- SD или как кратное выражение уровня hsa-miR-34a-p по следующей формуле:

$$\text{Уровни hsa-miR-34a-p} = 2^{-\Delta\Delta Cq}$$

$$\text{Где: } \Delta\Delta Cq = \Delta Cq_{\text{образца}} - \Delta Cq_{\text{стандарта}}$$

$$\Delta Cq_{\text{образца}} = Cq_{\text{hsa-miR-34a-5p образца}} - Cq_{\text{cel-miR-39-3p, добавленной в образцы}}$$

$$\Delta Cq_{\text{стандарта}} = Cq_{\text{hsa-miR-34a-5p положительного стандарта}} - Cq_{\text{cel-miR-39-3p, добавленной в положительный стандарт}}$$

Положительные стандарты представляли объединенную сыворотку от пациентов с NASH, n=12.

Добавляемая мкРНК является не принадлежащей человеку мкРНК: cel-miR-39-3p при Cq=28. InvivoFectamine[®] используют в соотношении cel-miR-39-3p/IVF=100/100.

После получения комплекс IVF/cel-miR-39 инкубируют при 4°C в течение 4 ч. или напрямую замораживают при -80°C.

CV не различался значимо между условиями. Нормализованный количественный анализ hsa-miR-34a-5p остается стабильным и воспроизводимым при разных условиях.

Внутренний контроль является надежным.

Внутренний контроль=Cel-miR-39-3p в IVF			
	hsa-miR-34a-5p (Cq)	Cel-miR-39-3p (Cq)	hsa-miR-34a-5p (кратность=$2^{-\Delta\Delta Cq}$)
Среднее	31,43	28,24	1,01
Sd	0,61	0,54	0,15
CV	1,93%	1,91%	14,60%
Внутренний контроль=Cel-miR-40-3p в IVF			
	hsa-miR-34a-5p (Cq)	Cel-miR-40-3p (Cq)	hsa-miR-34a-5p (fold=$2^{-\Delta\Delta Cq}$)
Среднее	31,37	28,23	1,01
Sd	0,84	0,81	0,11
CV	2,69%	2,87%	10,90%

Таблица 2: Сравнение вариабельности измерений hsa-miR-34a-5p с использованием стандартного положительного контроля (n=12 для каждого тестируемого условия) и комплекса cel-miR-39-3p/IVF или Cel-miR-40-3p/IVF в качестве внутренних

контролей (добавленных в каждый образец). Данные выражают как среднее $Cq \pm SD$ или как кратный уровень hsa-miR-34a-5p.

С. Характеристики анализа hsa-miR-34a-5p.

Стандарт и внутренние контроли использовали для оценки характеристик анализа hsa-miR-34a-5p у пациентов с NASH.

фигура 5: ROC-кривая hsa-miR-34a-5p с внутренним контролем (А) или без внутреннего контроля (В) в клинической когорте с пациентами с NASH (n=562 пациента, NTBT=271 пациент и TBT=291 пациент). Целевым условием для классификации как TBT являлся $NAS \geq 4 + F \geq 2$.

Сыворотку 562 пациентов из исследования RESOLVE-IT с соответствующей биопсией печени обрабатывали для валидации анализа с внутренним контролем. Образцы сыворотки от всех пациентов использовали для оценки характеристик анализа hsa-miR-34a-5p с использованием внутреннего контроля (Cel-miR-40-3p), комплексированного с IVF, а затем сравнивали по тестированию с анализом hsa-miR-34a-5p без использования внутреннего контроля.

Пациентов разделяли на 2 группы: группа #1: пациенты "Not To be Treated" (NTBT) с баллами $NAS < 4$ и фиброзом < 2 , и группа #2: пациенты "To be Treated" (TBT), с баллами $NAS \geq 4$ и фиброзом ≥ 2 . Пациенты с баллами NAS от 4 до 6 и категорией фиброза от 1 до 3 были более репрезентативными для этой клинической когорты. Пациенты с целевым условием (TBT: $NAS \geq 4 + F \geq 2$) представляли собой 51,8% всей популяции когорты.

Условие	С внутренним контролем	Без внутреннего контроля
Площадь	0,8108	0,7838
Стандартная ошибка	0,01813	0,01935
95%-ный доверительный интервал	от 0,7753 до 0,8463	от 0,7458 до 0,8217
Значение Р	$< 0,0001$	$< 0,0001$
Данные		
Контроли (NTBT2)	271	271
Пациенты (TBT2)	291	291
Отсутствующие контроли	0	0
Отсутствующие пациенты	0	0

Таблица 3: Характеристики площади под кривой для диагностики пациентов TBT с $NAS \geq 4$ и $F \geq 2$.

AUROC для анализа hsa-miR-34a-5p с использованием внутреннего контроля составляла 0,81 (95% CI 0,77-0,85), и AUROC для анализа hsa-miR-34a-5p, где внутренний контроль не использовали, составлял только 0,78 (95% CI 0,74-0,82), что свидетельствует о том, что анализ hsa-miR-34a-5p с использованием внутреннего контроля работает значительно лучше, чем анализ без внутреннего контроля (фигура 5). В совокупности, все

эти данные свидетельствуют о том, что анализ hsa-miR-34a-5p является более специфическим и чувствительным, когда комплекс Cel-miR-40-3p/IVF используют для количественного анализа hsa-miR-34a-5p в качестве маркера для заболевания NASH.

С) Сравнение Invivofectamine[®]/липофектамина

а- Получение комплекса Invivofectamine[®] или липофектамин/miR

Высокоочищенные имитирующие miR олигорибонуклеотиды, синтезируют на заказа в IDT (Integrated DNA Technologies Skokie, Illinois USA). Для тестирования in vitro в качестве стандартов или внутренних контролей получают 100 мкл раствора имитации miR посредством смешивания 50 мкл miR в воде без РНКаз (ref 733-2573, VWR) с 50 мкл комплексирующего буфера (реагент Invivofectamine[®] 3.0 (IVF3001-3005, ThermoFisher Scientific)). Например, используют miR в концентрации 12,5 фмоль/мл для получения контроля 28Cqs, miR в концентрации 2,5 фмоль/мл для получения контроля 30Cqs и miR в концентрации 0,5 фмоль/мл для получения 33Cqs. Затем разведенные miR незамедлительно добавляют к 20 мкл invivofectamine[®] 3.0 или липофектамина (life Technologies Carlsbad, CA, USA), предварительно доведенного до комнатной температуры. Затем Invivofectamine[®] (или липофектамин) и разведенные miR перемешивают на центрифуге типа вортекс в течение 3 секунд для обеспечения образования комплекса miR-IVF 3.0 (или miR-липофектамин). Затем смесь Invivofectamine[®] (или липофектамин)-miR инкубируют в течение 30 мин при 50°C и, наконец, комплекс разводят в 6 раз посредством добавления 1 мл PBS (pH 7,4) для получения конечной концентрации, соответственно, 0,52 фмоль/мл, 104 амоль/и 20,8 амоль/мл для контролей 28Cqs, 30Cqs и 33Cqs. Препарат консервируют замороженным при -20°C в аликвотах.

Для получения стандартных miR или внутренних контролей 5 мкл препарата добавляют к 1) биологическим базовым матрицам для стандартных препаратов (т.е. сыворотке или плазме здоровых доноров или коммерчески доступным базовым матрицам) или 2) напрямую к биологическим образцам в качестве внутренних контролей.

Сравнение условий комплексов Invivofectamine[®]/липофектамина

Тестировали несколько условий получения комплексов Invivofectamine[®]/hsa-miR-34-a-5p или липофектамин/hsa-miR-34-a-5p: температура; (4°C по сравнению с комнатной температурой) и время между получением комплекса и его использованием (0, 1 и 4 часов). Матрица является совокупностью сыворотки от здоровых доноров с очень низкими уровнями hsa-miR-34a-5p. Стандартная РНК представляет собой совокупность РНК с известными уровнями hsa-miR-34a-5p. Все данные выражают как средние циклы амплификации qPCR (Cq) +/- SD с n=3. ND: Неопределимо.

Фигура 6: Препараты комплексов Invivofectamine[®] (IVF)/hsa-miR-34-a-5p.

Температура; 4°C (черные столбцы), комнатная температура (RT, белые столбцы). Также тестировали время между получением комплекса и его использованием (0, 1 и 4 часа).

NRT: без контроля обратной транскриптазы, NTC: без контроля матрицы, отрицательный контроль: пустая проба ПЦР. Все данные выражают как средние циклы амплификации qPCR (Cq) $\pm$ SD с n=3. ND: Неопределимо.

Фигура 7: Препараты комплексов липофектамин/hsa-miR-34-a-5p.

Температура; 4°C (черные столбцы), комнатная температура (RT, серые столбцы).
Время между получением комплекса и его использованием (0, 1 и 4 часа).

NRT: без контроля обратной транскриптазы, NTC: без контроля матрицы, отрицательный контроль: пустая проба ПЦР. Все данные выражают как средние циклы амплификации qPCR (Cq) $\pm$ SD с n=3. ND: Неопределимо.

Выводы: Во всех условиях (температура и время) не наблюдали защиты miR-34a-5p липофектамином. В отличие от этого, использование InvivoFectamine[®] защищает комплекс матрица+hsa-miR34a-5p.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Диагностический набор, содержащий один или более контейнеров, содержащих комплекс синтетической микроРНК (мкРНК) и липидного вектора, где указанная синтетическая мкРНК находится в определенной концентрации.

2. Диагностический набор по п.1, где набор содержит более одного контейнера.

3. Диагностический набор по п.2, где каждый контейнер содержит одну и ту же синтетическую мкРНК, причем указанная синтетическая мкРНК находится в разных определенных концентрациях в каждом контейнере.

4. Диагностический набор по п.3, где набор содержит первый контейнер, содержащий синтетическую мкРНК в определенной концентрации, и по меньшей мере второй контейнер, содержащий ту же синтетическую мкРНК, что и первый контейнер, где концентрация синтетической мкРНК во втором контейнере отличается от ее концентрации в первом контейнере.

5. Диагностический набор по п.4, где набор содержит дополнительный третий контейнер, содержащий синтетическую мкРНК, где концентрация синтетической мкРНК в третьем контейнере отличается от ее концентрации в первом контейнере и ее концентрации во втором контейнере.

6. Диагностический набор по п.2, где набор содержит:

- один или более контейнеров, содержащих первую синтетическую мкРНК; и
- один или более контейнеров, содержащих вторую синтетическую мкРНК, отличающуюся от первой мкРНК.

7. Диагностический набор по п.6, где набор содержит:

- первый набор контейнеров, содержащий первую синтетическую мкРНК, где указанная первая синтетическая мкРНК находится в разных концентрациях в каждом контейнере из первого набора контейнеров; и
- второй набор контейнеров, содержащий вторую синтетическую мкРНК, где указанная вторая синтетическая мкРНК находится в разных концентрациях в каждом контейнере из второго набора контейнеров.

8. Диагностический набор по любому из пп. 1-7, где по меньшей мере один из одного или более контейнеров содержит hsa-miR-34a-5p, hsa-miR-193b-3p, hsa-miR-452-5p, cel-miR39-3p или cel-miR-40-3p.

9. Диагностический набор по любому из пп. 1-8, где липидный вектор выбран из катионных липидов, неcatiонных липидов и конъюгированных липидов, таких как липиды, конъюгированные с аминокислотами, липиды, конъюгированные с пептидами, или липиды, конъюгированные с PEG.

10. Диагностический набор по любому из пп. 1-9, где липидный вектор содержит катионный липид.

11. Диагностический набор по любому из пп. 1-8, где липидный вектор выбран из неcatiонных липидов и конъюгированных липидов, таких как липиды, конъюгированные с аминокислотами, липиды, конъюгированные с пептидами, или липиды,

конъюгированные с PEG.

12. Диагностический набор по п.11, где липидный вектор дополнительно содержит нейтральный липид.

13. Диагностический набор по п.11, где липидный вектор содержит липид, конъюгированный с PEG.

14. Диагностический набор по любому из пп. 1-13, содержащий один или более контейнеров, содержащих комплекс синтетической микроРНК (мкРНК), липидного вектора и матрицы, где указанная синтетическая мкРНК находится в определенной концентрации.

15. Применение диагностического набора по любому из пп. 1-14 в способе количественного анализа мкРНК в биологической жидкости индивидуума, в частности, млекопитающего, более конкретно, человека.

16. Применение по п.15, где количественный анализ является относительным или абсолютным количественным анализом.

17. Применение по п.15, где количественный анализ является нормализованным относительным или абсолютным количественным анализом.

18. Применение по пп. 15 или 16, где набор используют для получения стандартной кривой концентрации мкРНК.

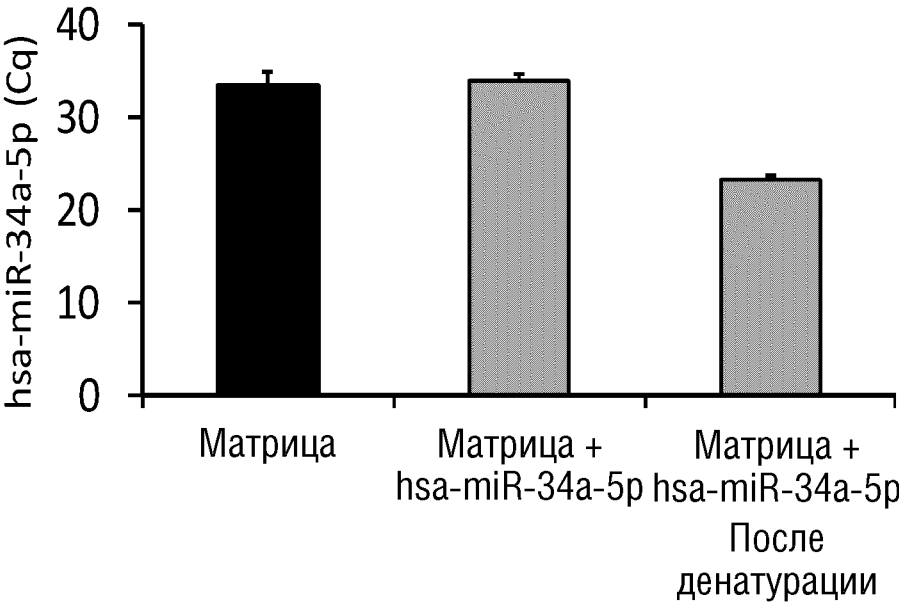
19. Применение по п.15 или 17, где набор используют для добавления в биологический образец, подлежащий тестированию, определенного количества синтетической мкРНК, содержащейся в контейнере из набора.

20. Применение по любому из пп. 15-19, где биологический образец является кровью, сывороткой, плазмой, мочой, слюной или спермой, в частности, кровью, сывороткой или плазмой, более конкретно, сывороткой.

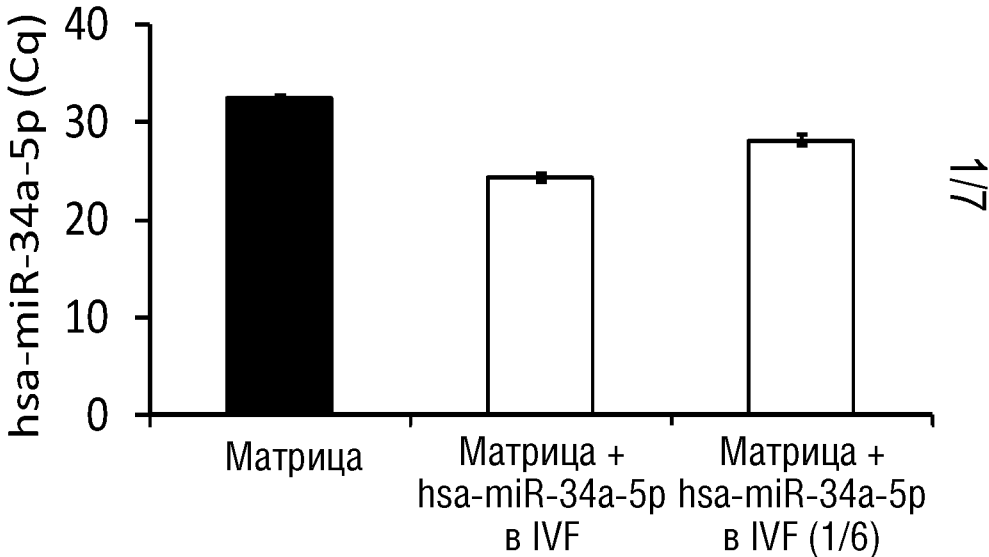
По доверенности

ФИГ.1

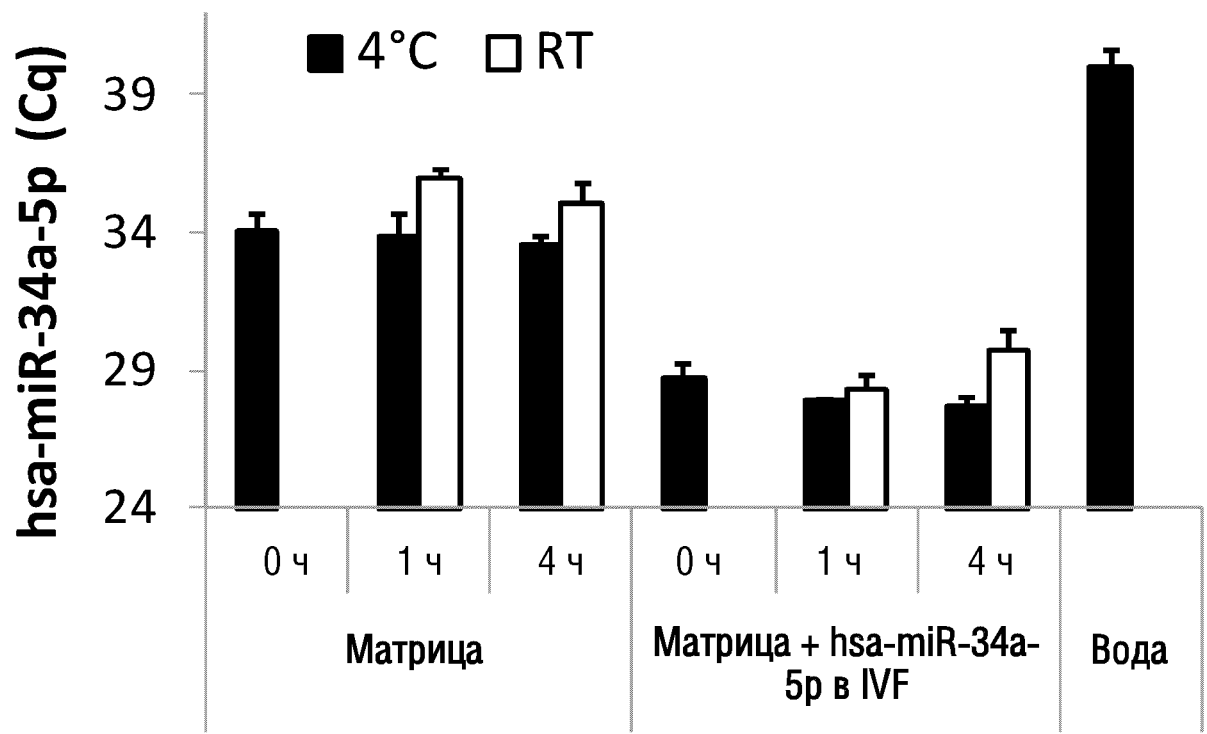
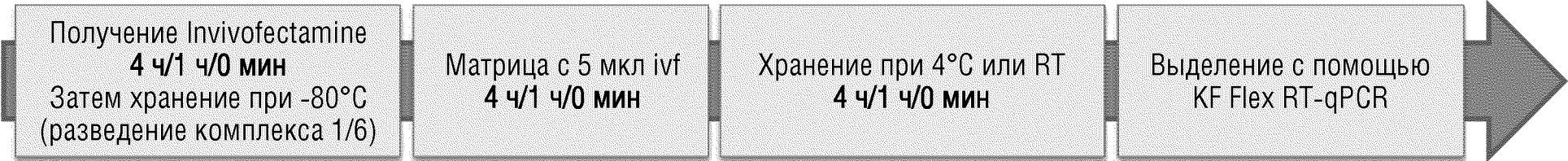
A



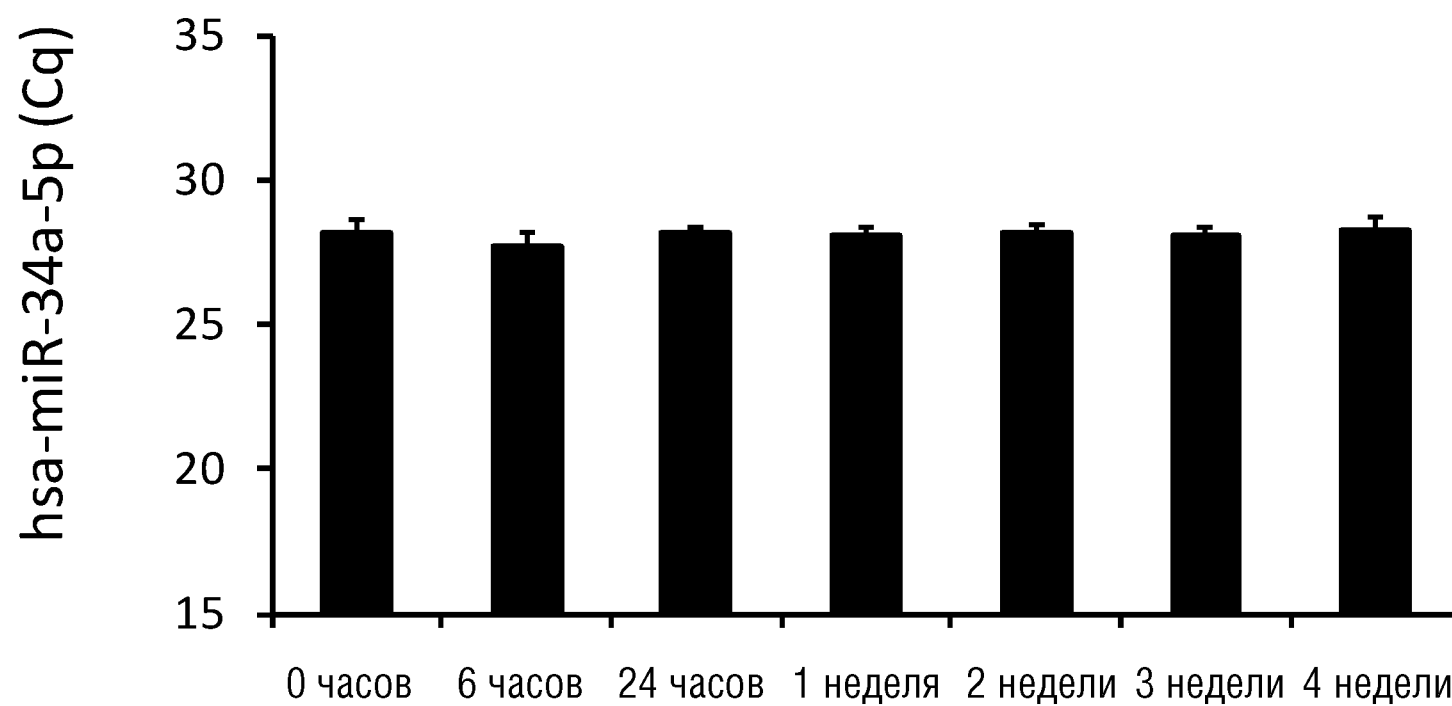
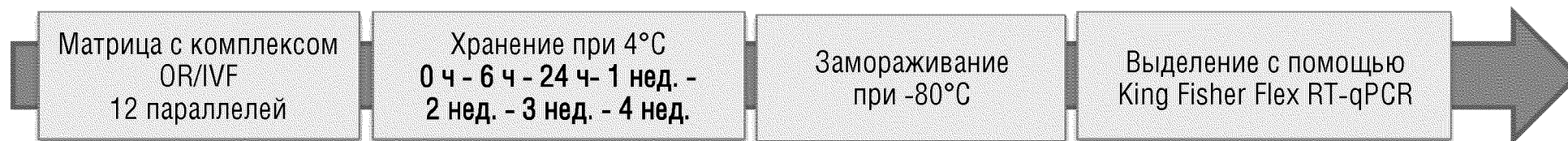
B



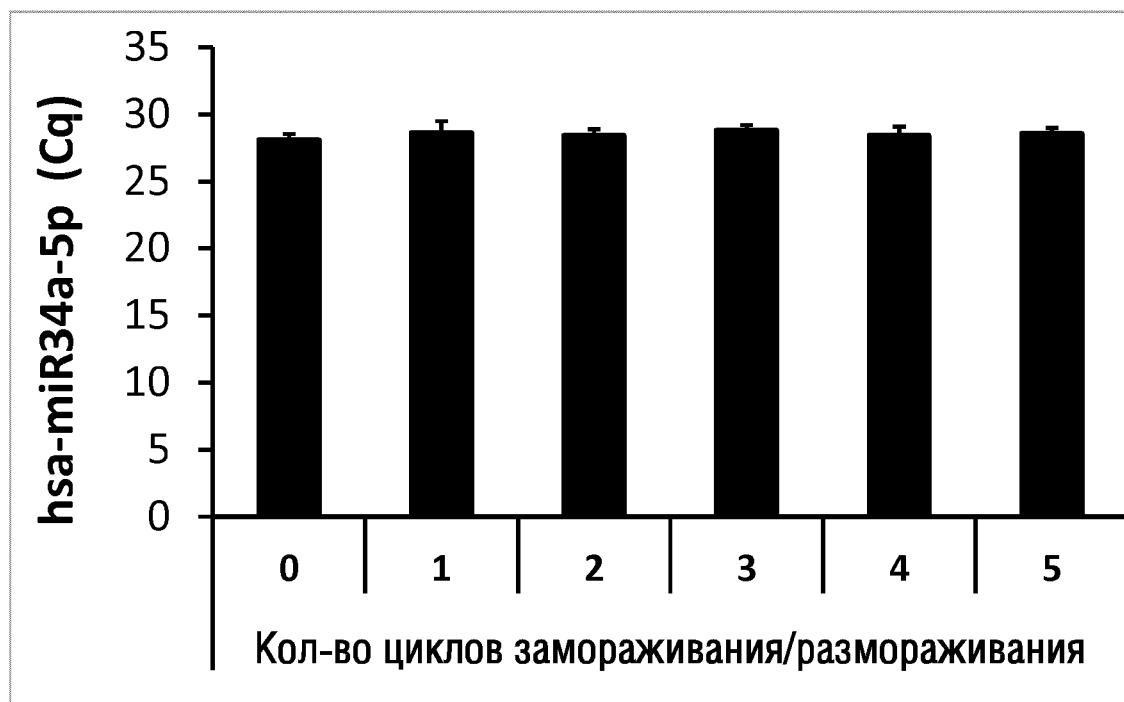
ФИГ.2



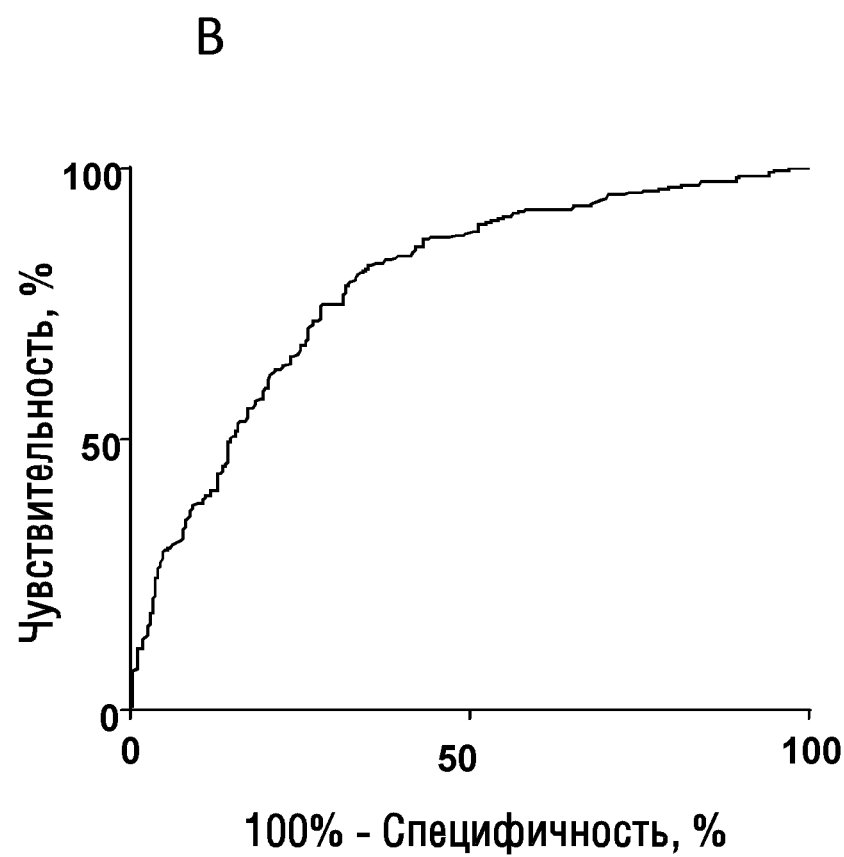
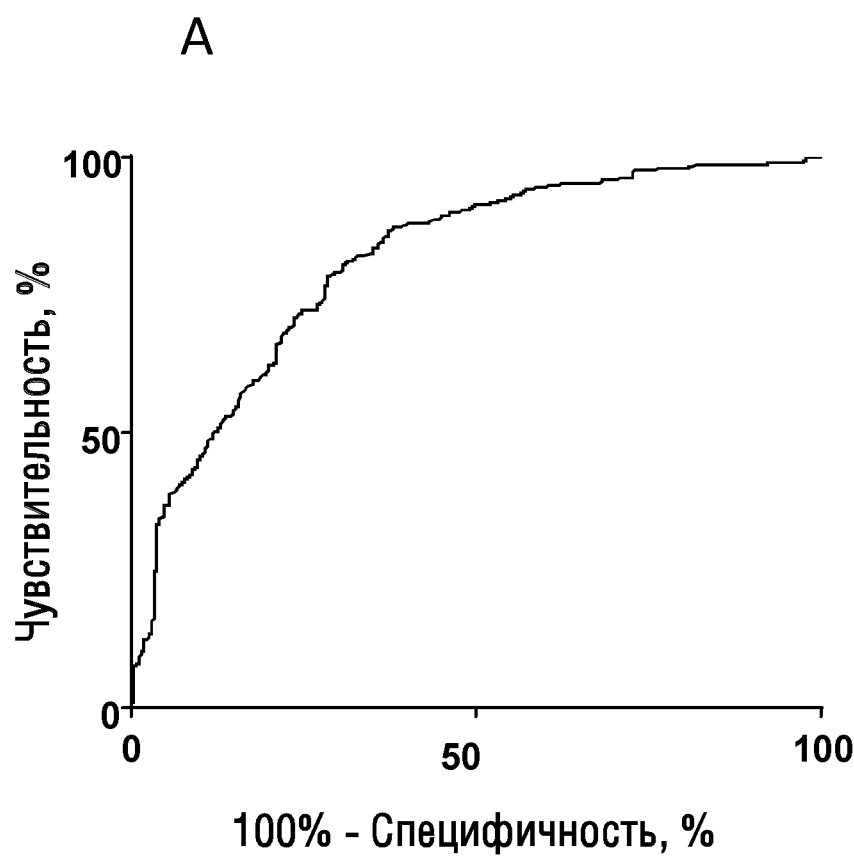
ФИГ.3



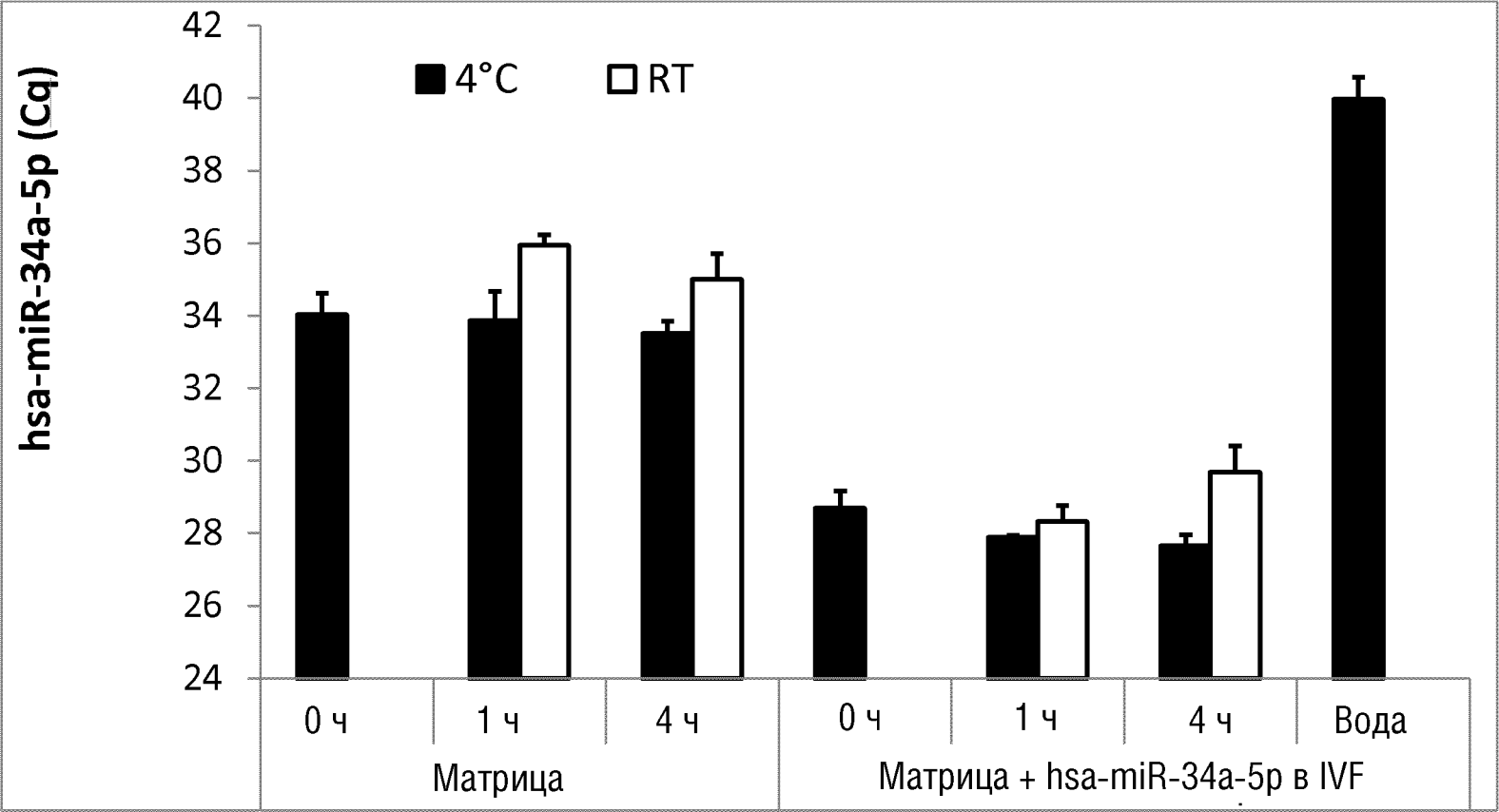
ФИГ.4



ФИГ.5



ФИГ.6



ФИГ.7

