



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: **2004107852/15, 02.10.2002**(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
02.10.2002(30) Конвенционный приоритет:
04.10.2001 DE 10148886.6(43) Дата публикации заявки: **20.04.2005**(45) Опубликовано: **10.12.2007 Бюл. № 34**(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: **US 5976835, 02.11.1999. WO 9923203,
14.05.1999.**(85) Дата перевода заявки РСТ на национальную фазу:
05.05.2004(86) Заявка РСТ:
DE 02/03748 (02.10.2002)(87) Публикация РСТ:
WO 03/030944 (17.04.2003)Адрес для переписки:
**191036, Санкт-Петербург, а/я 24, "НЕВИНПАТ",
пат.пов. А.В.Поликарпову**(72) Автор(ы):
**ХЕКЕР Маркус (DE),
ВАГНЕР Андреас Х. (DE)**(73) Патентообладатель(и):
Авонтек ГмбХ (DE)

(54) ИНГИБИРОВАНИЕ STAT-1

(57) Реферат:
Данное изобретение относится к применению
ДНК-олигонуклеотида, пригодного для
ингибирования активности транскрипционного
фактора STAT-1, для изготовления лекарства для
ослабления воспалительных реакций и дляпредотвращения или терапии:
ишемических/реперфузионных повреждений при
хирургических операциях и трансплантации
органов соответственно. Изобретение
обеспечивает повышение эффективности терапии.
10 ил.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(51) Int. Cl.

A61K 31/713 (2006.01)**A61P 29/00** (2006.01)**(12) ABSTRACT OF INVENTION**(21), (22) Application: **2004107852/15, 02.10.2002**(24) Effective date for property rights: **02.10.2002**(30) Priority:
04.10.2001 DE 10148886.6(43) Application published: **20.04.2005**(45) Date of publication: **10.12.2007 Bull. 34**(85) Commencement of national phase: **05.05.2004**(86) PCT application:
DE 02/03748 (02.10.2002)(87) PCT publication:
WO 03/030944 (17.04.2003)Mail address:
**191036, Sankt-Peterburg, a/ja 24, "NEVINPAT",
pat.pov. A.V.Polikarpovu**(72) Inventor(s):
**KhEKER Markus (DE),
VAGNER Andreas Kh. (DE)**(73) Proprietor(s):
Avontek GmbKh (DE)**(54) INHIBITING OF STAT-1**

(57) Abstract:

FIELD: pharmaceuticals.

SUBSTANCE: claimed method relates to application of DNA oligonucleotide useful in inhibition of STAT-1 transcription factor to produce drug for amelioration of inflammation

reactions and preventing and/or therapy of ischemic/reperfusion damages in surgery and organ transplantation, respectively.

EFFECT: therapy of increased effectiveness.
9 ex, 10 dwg

Настоящее изобретение относится к применению ингибиторов транскрипционного фактора STAT-1 для изготовления лекарства для предупреждения или терапии сердечно-сосудистых осложнений, таких как рестеноз после чрескожной ангиопластики или стеноз венозных шунтов, реакции трансплантат против хозяина, ишемических/реперфузионных
5 повреждений при хирургических операциях и трансплантации органов соответственно, иммунологических реакций гиперчувствительности, в частности аллергического ринита, лекарственных и пищевых аллергий, в частности крапивницы и глютеновой болезни (спру), контактной экземы и комплексных иммунных заболеваний, в частности альвеолита, артрита, гломерулонефрита и аллергического васкулита, воспалительных хондро- и
10 остеопатий, в частности артроза, подагры, остита и остеомиелита, полиневрита, как острого, так и подострого соответственно, инфекционного контингента и в особенности постинфекционных воспалительных болезней, в частности бронхита, эндокардита, гепатита, миокардита, нефрита, перикардита, перитонита и панкреатита, в том числе септического шока.

Одна из важных целей расшифровки человеческого генома заключается в том, чтобы идентифицировать патологические гены (на основании механизма действия их продуктов) и патологические изменения в структуре этих генов (полиморфизмы) соответственно и отнести их к определенной клинической картине болезни. Поэтому этиотропная терапия
15 большинства заболеваний является достижимой, если принимать, что их причиной является определенное количество генных продуктов, которые экспрессируются слишком сильно, слишком слабо или с ошибками. В действительности для целого ряда наследственных заболеваний (например для кистозного фиброза) уже известен, как правило, единичный генетический дефект (моногенетические заболевания), тогда как ситуация для других заболеваний (например гипертонии) представляется намного более
20 сложной. Последние, очевидно, являются результатом не единичных, а множественных генетических дефектов (полигенетические заболевания), которые определяют развитие болезни у пораженных людей при воздействии определенных факторов окружающей среды. Несмотря на это ограничение направленное вмешательство в экспрессию одного или более генов дает возможность для этиотропной, и не только
25 симптоматической, терапии.

Транскрипционные факторы представляют собой ДНК-связывающие белки, которые присоединяются к промоторному участку одного или более генов в ядре клетки и таким образом регулируют их экспрессию, то есть синтез белка, который этот ген кодирует. Наряду с физиологически важной ролью контроля процессов развития и дифференцировки
35 в человеческом организме транскрипционные факторы имеют высокий болезнетворный потенциал, прежде всего, когда экспрессия гена активируется не в нужный момент. Дополнительно (возможно, те же) транскрипционные факторы могут блокировать гены с защитными функциями и действовать как определяющие развитие какой-либо болезни. В этом отношении описанный ниже принцип терапии противотранскрипционными
40 факторами направлен на ингибирование патологических генов и, наоборот, на активирование защитных генов.

Воспаление представляет собой защитную реакцию организма и его тканей от повреждающих стимулов с целью коррекции повреждения или по меньшей мере его локального ограничения, а также устранения причины повреждения (например,
45 проникнувшие бактерии или инородные тела). Иницирующим фактором воспаления могут быть микроорганизмы (бактерии, вирусы, грибы или паразиты), инородные тела (пыльца, кристаллы асбеста или силикатные кристаллы), разрушение ткани посредством механического повреждения, химические повреждающие факторы и физические воздействия, а также факторы собственного организма (распадающиеся опухолевые
50 клетки, внесосудистая кровь, аутоиммунные реакции) или кристаллы веществ, выпавших в осадок в организме (мочевая кислота, оксалат и фосфат кальция, холестерин).

Быстрая активация тучных клеток (в ткани) или базофильных гранулоцитов в крови является примером инициирования очень сильной острой воспалительной реакции и

характерной для иммунологической реакции гиперчувствительности немедленного типа (гуморальная аллергия I типа). Если организм уже вступил в контакт с антигеном (или аллергеном, соответственно, в случае гиперчувствительности), то в качестве ответной реакции на него будут сенсibilизироваться уже произведенные В-лимфоциты. В-лимфоциты преобразуются в плазмоциты при взаимодействии с предварительно сенсibilизированными CD4-положительными Т-хелперами 2 типа (Th2-клетки) и начинают продуцировать антитела типа IgE против данного антигена. В данном процессе дифференцировки костимуляция В-лимфоцитов через CD40-рецептор Th2-клетками, экспрессирующими соответствующие лиганды (CD154), имеет решающее значение. При связывании IgE-антител, нагруженных антигеном, с соответствующими рецепторами (тип $F_{C\epsilon_2}$) на тучных клетках последние высвобождают различные медиаторы воспаления, в частности гистамин, интерлейкин-8, лейкотриен и фактор некроза опухоли- α (ФНО α). Вследствие этого происходит привлечение профессиональных воспалительных клеток, в особенности эозинофильных и нейтрофильных гранулоцитов и моноцитов, а также Т-лимфоцитов в место события (хемотаксис). Одновременно происходит гистамин-зависимое расширение кровеносных сосудов и увеличение проницаемости клеток эндотелия, выстилающих стенки сосудов. Вследствие расширения сосудов скорость течения падает, что облегчает установление физического контакта привлеченных лейкоцитов с клетками эндотелия. Эти клетки эндотелия экспонируются цитокинам (например ФНО α), уже таким образом активированные экспрессируют на своей люминальной поверхности повышенное количество селектинов (например Е-селектина), которые вызывают роллинг лейкоцитов вдоль клеток эндотелия и вследствие этого активацию дальнейших молекул адгезии (интегринов; например, молекулы межклеточной адгезии 1 [ICAM-1] или васкулярно-клеточной молекулы адгезии 1 [VCAM-1]). Лейкоциты могут теперь прилипнуть к стенке сосуда (маргинация), а увеличение проницаемости, обусловленное гистамином (ослабление связи клеток эндотелия), способствует их последующему выходу во внесосудистое пространство (диапедез). Одновременно увеличенное количество жидкости, богатой белками (воспалительный экссудат), достигает интерстициального пространства, образуя отек. Вследствие увеличивающегося давления тканей и под воздействием других медиаторов, образованных воспалительными клетками, окружающие нервные окончания раздражаются и вызывают боли, тем самым приводя к осознанию повреждения ткани.

Гранулоциты, которые мигрируют к месту воспаления, и моноциты, передифференцировавшиеся в макрофаги, пытаются элиминировать агенты, вызвавшие воспаление, посредством фагоцитоза или лизиса соответственно, при этом высвобождаются, среди прочего, протеолитические ферменты и кислородные радикалы, которые могут повредить также окружающие ткани. В особенности этому может способствовать активация макрофагов разнообразными способами (например, высвобождение цитокинов, таких как интерлейкин-1 β или интерлейкин-6), так что целый организм включается в изначально местную воспалительную реакцию в форме ответа острой фазы. Типичными признаками ответа острой фазы являются усталость, подавленность и лихорадка, повышенное высвобождение лейкоцитов из костного мозга (лейкоцитоз), обнаружение белков острой фазы в крови (например, С-реактивного белка), стимуляция иммунной системы, а также потеря веса ввиду измененного обмена веществ.

Если причина воспаления может быть устранена, то начинается процесс заживления, при котором разрушенная ткань восстанавливается. В наилучшем случае она будет полностью восстановлена (восстановление до целого), тогда как при больших повреждениях или чрезмерном образовании соединительной ткани (в особенности коллагена), образуется рубец, который может быть ассоциирован со значительными функциональными нарушениями из-за пораженной ткани. Если причина не может быть немедленно устранена (инородные тела или раневая инфекция), то заживление раны замедляется из-за одновременного усиления иммиграции и активности фагоцитов с последующей гибелью ткани (некроз) вплоть до формирования полостей (абсцесс). Результатом практически всегда является рубцовая перестройка ткани с соответствующей

потерей функции. Если не происходит локального ограничения воспаления, вызванного возбудителем, оно распространяется через лимфатическую систему на весь организм. Результатом этого является сепсис с возможным смертельным исходом (септический шок).

Нарушение заживления раны также имеет место, когда процессы воспаления и заживления находятся в равновесии. Результатом является хроническое воспаление, которое может быть фиброзным (чрезмерный синтез коллагена) или гранулематозным (организация воспалительных клеток в виде грануляционной ткани) и которое, как правило, приводит к непрерывному разрушению или возрастающему ограничению функций пораженных тканей.

Помимо описанных общих воспалительных реакций, которые могут переходить в хронические, существуют воспалительные заболевания, которые обнаруживают общие особенности, но также и особые различия в плане патогенеза, лежащего в их основе. Двумя такими воспалительными заболеваниями являются, например, осложнения после кардиохирургического вмешательства и иммунологические реакции гиперчувствительности, которым посвящается больше места в данных материалах заявки ввиду их огромного клинического значения.

Механическое расширение с помощью баллонного катетера (чрескожная ангиопластика), а также шунтирование атеросклеротических суженных артерий с помощью венозных шунтов соответственно по-прежнему представляет собой терапию выбора у пациентов с коронарными и периферическими нарушениями кровообращения соответственно для предотвращения угрожающего инфаркта или органной недостаточности. Однако частота повторной закупорки артерий (рестеноза), которые были механически расширены и (в большинстве случаев) снабжены металлическими эндопротезами сосудов (стентами), неприемлемо повышается на 20-50% за 6 месяцев. Также частота повторной закупорки аортокоронарных и периферических венозных шунтов, составляющая 50-70% за 5 месяцев, является более чем неудовлетворительной, в особенности на фоне риска во время процедуры и послеоперационного риска у оперируемых пациентов соответственно. Вероятно, из-за механического повреждения стенки сосудов (в данном случае пораженными являются как клетки эндотелия, так и гладкомышечные клетки сосудов) рестеноз после ангиопластики проявляет, в особенности на ранней стадии, выраженный воспалительный компонент, который характеризуется среди прочего инфильтрацией профессиональных воспалительных клеток (прежде всего моноцитов и Т-лимфоцитов) в стенку сосуда. Формирование фибропролиферативного стеноза (гиперплазия внутренней оболочки сосуда) в аортокоронарных, а также периферических венозных шунтах соответственно, по-видимому, также основано на воспалительной реакции, причиной которой являются, в частности, механические и физические повреждающие факторы. Также давно известно, что разрушение ткани, обусловленное воспалением, сопутствует так называемым ишемическим/реперфузионным повреждениям при хирургических вмешательствах или трансплантации органов, когда решающую роль играет в особенности взаимодействие клеток эндотелия и профессиональных воспалительных клеток (прежде всего гранулоцитов, но также и моноцитов и Т-клеток), а также высвобождение веществ, повреждающих ткань (кислородных радикалов, цитокинов).

В отношении упомянутых сердечно-сосудистых осложнений важно, что существуют защитные механизмы, прежде всего в клетках эндотелия и клетках гладкой мускулатуры стенки сосуда, которые помогают ограничить степень воспалительной реакции и последующее адаптивное восстановление ткани. К таким механизмам относится, например, синтез оксида азота (NO) посредством NO-синтазы в клетках эндотелия. NO, возможно, в качестве эндогенного антагониста супероксидных кислородных радикалов, ингибирует среди прочего экспрессию провоспалительных хемокинов (например моноцитарного хемоаттрактантного белка-1, MCP-1) и молекул адгезии (например ICAM-1)) в клетках эндотелия, экспрессию рецепторов для факторов роста в клетках гладкой мускулатуры (например, рецептора эндотелина B), а также высвобождение факторов роста из лейкоцитов. Поэтому легко понять, что механическое, так же как и функциональное

повреждение эндотелия (например, посредством цитокин-индуцированного снижения экспрессии NO-синтазы в этих клетках), противодействует процессам воспаления и последующей фибропролиферативной перестройки стенки сосуда, лежащим в основе упомянутых сердечно-сосудистых осложнений.

5 Все предыдущие попытки медикаментозно контролировать рестеноз после ангиопластики не имели желаемого эффекта у большинства пациентов. В настоящее время преимущественно используют два локальных принципа терапии: уже разрешенная сосудистая брахитерапия - способ сдерживания клеточного роста посредством
10 кратковременного радиоактивного облучения расширенного отрезка сосуда, а также еще находящиеся на клиническом испытании стенты, элюирующие лекарства. При этом способе вводят покрытые полимером стенты, которые «импрегнированы» лекарствами, ингибирующими рост (цитостатиками, иммуносупрессорами), и медленно высвобождают эти лекарства в течение нескольких недель. Последние клинические исследования
15 подтверждают, что оба терапевтических подхода несмотря на первоначально обнадеживающие результаты не исключают некоторых серьезных проблем (например, тромбозы в стентах с опасностью инфаркта).

Помимо уже описанных иммунологических реакций несовместимости типа I существуют, в принципе, четыре другие формы аллергии, а также нарушений иммунорегуляции соответственно. Реакцию типа I как таковую можно делить, в принципе, на две фазы
20 после произошедшей сенсibilизации: быстрое высвобождение и синтез активных в отношении сосудов медиаторов воспаления из обогащенных IgE тучных клеток, а также поздняя реакция, опосредованная привлеченными эозинофильными и нейтрофильными гранулоцитами. Реакция типа I может протекать местно или генерализованно в зависимости от экспозиции аллергену. Аллергены во вдыхаемом воздухе запускают
25 реакции в дыхательном тракте, обычно сопровождающиеся отеками слизистой оболочки и гиперсекрецией (аллергическая ринопатия, вазомоторный ринит), а также бронхоспазмом (астма), тогда как пищевые аллергены в первую очередь вызывают такие желудочно-кишечные симптомы, как тошнота, рвота и диарея. Кожа реагирует на аллергены зудом и крапивницей, а также атопическим дерматитом (нейродерматит). Но если аллерген
30 попадает непосредственно в кровяное русло (например, инфузия продуктов крови, лекарственных препаратов) или экспозиция аллергена особенно сильная, то в результате развивается системная реакция немедленного типа, которая в некоторых условиях вызывает опасное для жизни снижение кровяного давления (анафилактический шок).

При реакции II типа в центре внимания находятся антигенно активные клетки
35 (например, чужеродные клетки крови) или внеклеточные белки (например, индуцированное лекарствами изменение поверхности собственных клеток организма). После алергизации при вторичном контакте образуются аллерген-специфичные антитела типа IgG и IgM, которые в большом количестве связываются с поверхностью аллергенной клетки (опсонизация). Посредством этого активируются система комплемента (образование
40 мембраноатакующего комплекса) и специальная субпопуляция лимфоцитов - натуральные киллеры (НК-клетки). Результатом является разрушение аллергенной клетки путем цитолиза. Похожая реакция индуцируется, когда аутоантитела присоединяются к структурам собственного организма, таким как, например, базальная мембрана капилляров почечных клубочков, и вследствие этого развивается быстро прогрессирующий
45 гломерулонефрит с угрозой почечной недостаточности. Помимо Т-хелперов 1 типа (ТП1-клетки, см. выше) активированные НК-клетки являются основными источниками интерферона- γ - цитокина, который значительно усиливает воспалительную реакцию, в частности, посредством активирования макрофагов.

Реакция III типа характеризуется образованием и отложением иммунocomплексов
50 (комплекс антиген-антитело) с последующим активированием системы комплемента и фагоцитов (гранулоцитов, макрофагов). Они циркулируют в крови и постепенно накапливаются, прежде всего в капиллярах почечных клубочков, но также в суставах или в коже. Воспалительная реакция, индуцированная таким образом, может привести среди

прочего к (иммунокомплексному) гломерулонефриту, болях в суставах, а также к крапивнице. Также системную реакцию III типа могут вызвать инфекции, если иммунной системе не удалось ликвидировать возбудителя (например, стрептококков). Типичными местными реакциями III типа являются так называемые реакции Артюса в коже после прививки или экзогенный аллергический альвеолит - при осаждении комплексов антиген-антитело в легких (например, болезнь любителей голубей). Также реакцией III типа является системная красная волчанка, правда, в том смысле что она является аутоиммунным заболеванием в результате образования аутоантител.

Реакция IV типа, в противоположность упомянутым выше реакциям гиперчувствительности является не гуморальной, а клеточной и достигает своего максимума, как правило, впервые через несколько дней (замедленный тип реакции, или гиперчувствительность замедленного типа). Запускающими факторами являются прежде всего белки проникнувших чужеродных организмов (бактерий, вирусов, грибов и паразитов), другие чужеродные белки (например, глиадин из пшеницы - в случае целиакии), а также гаптены (лекарства, металлы (например, никель - в случае контактного дерматита), косметика и части растений). Также реакцией IV типа является первичное отторжение трансплантированного органа. Антиген подвергается фагоцитозу (тканевыми) макрофагами, процессингу и презентации наивным Т-хелперам (CD4-положительным); сенсбилизация Т-хелперов продолжается несколько дней. При вторичном контакте сенсбилизированные таким образом Т-хелперы превращаются в Th1-клетки; при этом важную роль играет CD154-опосредованная костимуляция антиген-презентирующих клеток (они экспрессируют CD40-рецептор), так как через этот сигнальный путь происходит высвобождение интерлейкина-12 из макрофагов. Интерлейкин-12 запускает дифференцировку и пролиферацию Т-хелперов. Th1-клетки, в свою очередь, посредством определенных факторов роста (например, GM-CSF) вызывают образование моноцитов в костном мозге, пополняют их пул с помощью определенных хемокинов (например, MIF) и активируют их посредством высвобождения интерферона- γ (ИФН- γ). Развивающаяся в результате этого очень сильная воспалительная реакция может в большом объеме разрушать ткань собственного организма (например, туберкулез) или трансплантированную ткань. Более того, в отторжении трансплантата участвуют CD8-положительные цитотоксические Т-клетки (цитотоксические Т-клетки), которые, как и CD4-положительные Th1-клетки, способны распознавать свою мишень (поверхность чужеродной клетки) только посредством предшествующей презентации антигена и «вооружаться» соответственно.

Нарушение иммунорегуляции, подобное реакции IV типа, лежит в основе, например, ревматоидного артрита или рассеянного склероза (аутореактивные Th1-клетки), а также сахарного диабета - (аутореактивные цитотоксические Т-клетки). Помимо соответствующей генетической предрасположенности (MHC-белки, дисбаланс Th1/Th2) и бактериальных суперантигенов (например, возбудитель туберкулеза) при этих аутоиммунных заболеваниях могут потенциально играть роль Т-клетки, направленные против определенных антигенов возбудителей (например, стрептококков), которые перекрестно реагируют с аутоантигенами (продуцируемыми в организме: молекулярная мимикрия). Реакции V типа, напротив, могут быть вызваны среди прочего активирующими или блокирующими аутоантителами рецепторов гормонов (например, тиреотропина - при базедовой болезни) или нейротрансмиттеров (например, ацетилхолина - при тяжелой псевдопаралитической миастении).

Сравнимой с отторжением трансплантата, опять же - в обратном смысле, является реакция «трансплантат против хозяина» (GVHD), которая встречается у примерно 40% реципиентов в ходе трансплантаций аллогенного костного мозга (от генетически не идентичных индивидуумов). В течение острой фазы, продолжающейся до трех месяцев, Т-клетки донора, пересаженные вместе со стволовыми клетками, атакуют организм-хозяина. Возникающая в результате возможно тяжелая воспалительная реакция проявляется прежде всего в коже, в желудочно-кишечном тракте и в печени.

Для лечения острых воспалительных заболеваний в зависимости от предполагаемых

причин используют, как правило, нестероидные противовоспалительные средства (НПВС; среди прочего, ингибирование синтеза простагландина) и/или противомикробную (для уничтожения бактерий, грибов или паразитов) или противовирусную химиотерапию, также возможно местное применение глюкокортикоидов (общее ингибирование экспрессии генов).

5 При серьезных или хронических рецидивирующих воспалительных заболеваниях системно вводят глюкокортикоиды или иммуносупрессоры (ингибирование активации Т-клеток) или цитостатики, такие как метотрексат. Это используют также при трансплантации органов или костного мозга. Несмотря на их неоспоримое терапевтическое значение системное применение упомянутых выше лекарственных средств, в особенности при длительном применении может оказывать тяжелые побочные действия. Например, у 25% пациентов, принимающих метотрексат в течение двух или более лет, развивается тяжелый цирроз печени. Новые активные вещества, в особенности назначаемые при хронических рецидивирующих воспалительных заболеваниях, блокируют провоспалительное действие ФНО α : антитела против самого цитокина или его рецептора, низкомолекулярные антагонисты рецептора, а также растворимые рецепторные белки, полученные рекомбинантным способом, которые захватывают цитокин. Однако возрастает количество ссылок на повышенное число инфекционных заболеваний при лечении рецепторными белками (среди них туберкулез), а примерно 40%, по-видимому, совсем не реагируют на лечение (невосприимчивы). Кроме того, для разрешенных гуманизированных ФНО α -антител имеется соответствующее предупреждение относительно появления инфекций вплоть до сепсиса через 2-4 года после начала лечения. Более того, противопоказано применение обоих типов лекарственных препаратов при остром воспалении. В дополнение, низкомолекулярные антагонисты рецепторов разрешены для лейкотриенов, которые прежде всего находят применение при лечении астмы, а также ингибиторы циклооксигеназы-2, новый класс нестероидных противовоспалительных средств (НПВС) со значительно сниженными желудочно-кишечными побочными явлениями по сравнению с классическими НПВС. Более того, имеется ряд других подходов, как правило, на основе антител - обычно гуманизированных - или олигонуклеотидов, направленных против молекул адгезии лейкоцитов или клеток эндотелия, цитокиновых рецепторов Т-хелперов или IgE-антител, которые находятся на различных фазах клинических испытаний. Чтобы отказаться от глюкокортикоидов и противомикробных средств как группы, упомянутые лекарства в целом должны быть направлены специфично против терапевтически релевантной молекулы-мишени.

35 Таким образом, настоящее изобретение основано на проблеме, состоящей в том, чтобы предложить вещества для предотвращения или терапии сердечно-сосудистых осложнений, таких как рестеноз после чрескожной ангиопластики или стеноз венозного шунта, реакции трансплантат против хозяина, ишемических/реперфузионных повреждений при хирургических операциях и трансплантации органов соответственно, иммунологических реакций гиперчувствительности, в частности аллергического ринита, лекарственных и пищевых аллергий, в частности крапивницы и глютенной болезни (спру), контактной экземы и комплексных иммунных заболеваний, в частности альвеолита, артрита, гломерулонефрита и аллергического васкулита, воспалительных хондро- и остеопатий, в частности артроза, подагры, остита и остеомиелита, полиневрита, как острого, так и подострого соответственно, инфекционного контингента и, в частности, постинфекционных воспалительных болезней, в частности бронхита, эндокардита, гепатита, миокардита, нефрита, перикардита, перитонита и панкреатита, в том числе септического шока, которые составляют более широкий (заведомо не моноспецифический) и поэтому потенциально более эффективный терапевтический подход.

Данную задачу решает объект, определенный в формуле изобретения.

50 Данное изобретение пояснено подробнее следующими фигурами.

На Фиг.1 показано ингибирование цитокин-стимулированной экспрессии CD40 (а, с, d и е), Е-селектина и MCP-1 (а) и индукция лигандом CD40 экспрессии интерлейкина-12p40 (b) в культивируемых клетках эндотелия человека посредством нейтрализации

транскрипционного фактора STAT-1 с помощью соответствующей цис-элемент ловушки (SEQ ID NO: 33). (a) Репрезентативный анализ ПЦР с обратной транскриптазой (ОТ-ПЦР) экспрессии мРНК Е-селектина, MCP-1 и CD40 (включая денситометрический анализ («интенсивность»)), данный в процентах от стимулированного контроля и отнесенный к
5 внутреннему стандарту EF-1) в клетках эндотелия, которые предварительно инкубировали в течение 4 часов со STAT-1 (SEQ ID NO: 33) или NF-κB цис-элемент ловушкой (10 мкМ) и затем инкубировали в течение 9 часов с 100 Е/мл фактора некроза опухоли-α и 1000 Е/мл интерферона-γ. (b) Репрезентативный анализ экспрессии мРНК интерлейкина-12p40 путем полимеразной цепной реакции (ПЦР) с обратной транскриптазой (включая
10 денситометрический анализ («интенсивность»)), данный в процентах от стимулированного контроля и отнесенный к внутреннему стандарту рl32) в клетках эндотелия, которые предварительно инкубировали в течение 4 часов со цис-элемент ловушкой STAT-1 (10 мкМ; SEQ ID NO: 33) с последующей инкубацией в течение 12 часов с примерно 670000 P3xTB.A7-клетками/мл (эти клетки миеломы мышей стабильно экспрессируют лиганды к
15 CD40 человека - CD154) и 1000 Е/мл интерферона-γ. (c) Репрезентативный анализ экспрессии мРНК CD40 путем ПЦР с обратной транскриптазой (включая денситометрический анализ («интенсивность»)), данный в процентах от стимулированного контроля и отнесенный к внутреннему стандарту EF-1) в клетках эндотелия, которые в течение 4 часов предварительно инкубировали со цис-элемент ловушкой STAT-1 (SEQ ID
20 NO: 33) или с соответствующим контрольным олигонуклеотидом (STAT-1-25mut) (концентрация 10 мкМ) с последующей инкубацией в течение 9 часов с 100 Е/мл фактора некроза опухоли-α и 1000 Е/мл интерферона-γ. (d) Статистическое обобщение 5 независимых экспериментов по действию цис-элемент ловушки STAT-1 (SEQ ID NO: 33) на цитокин-стимулированную экспрессию мРНК CD40 в культивированных клетках эндотелия (*p<0,05 против стимулированных контрольных клеток), (e) Репрезентативный Вестерн-
25 блот-анализ, включая денситометрический анализ («интенсивность» дана в процентах от стимулированного контроля и отнесенная к внутреннему стандарту (β-актину) действия цис-элемент ловушки STAT-1 (SEQ ID NO: 33) на цитокин-стимулированную экспрессию белка CD40 в культивированных клетках эндотелия через 24 часа. В дальнейших
30 экспериментах были получены сравнимые результаты.

На Фиг.2 показано ингибирование цитокин-индуцированной экспрессии гена CD40 в культивируемых клетках эндотелия человека посредством основанной на антисмысловом олигонуклеотиде регуляции экспрессии транскрипционного фактора STAT-1 по механизму
35 отрицательной обратной связи. (a) Экспрессия белков CD40 и STAT-1 соответственно в состоянии покоя и после 14-часовой инкубации клеток со 100 Е/мл фактора некроза опухоли-α и 1000 Е/мл интерферона-γ. В левой части рисунка показано статистическое обобщение 2-4 экспериментов с различными сериями клеток, в правой части рисунка показан в каждом случае репрезентативный Вестерн-блот-анализ с дополнительным денситометрическим анализом («интенсивность»)), данным в процентах от
40 стимулированного контроля и отнесенным к внутреннему стандарту β-актину (*p<0,05 против нестимулированных контрольных клеток). (b) Сравнительное ингибирование экспрессии белков CD40 и STAT-1 в стимулированных клетках эндотелия посредством 24-часовой предварительной обработки STAT-1-антисмысловым олигонуклеотидом (1 мкМ; SEQ ID NO: 33). Обобщение 2 экспериментов (левая часть рисунка; *p<0,05 против
45 стимулированных контрольных клеток) и репрезентативный Вестерн-блот анализ (правая часть рисунка).

На Фиг.3 показано ингибирование экспрессии транскрипционного фактора IRF-1 в линии моноцитов THP-1 (a), а также индуцибельной изоформы NO-синтазы в культивированных
50 клетках гладких мышц человека (b) посредством нейтрализации транскрипционного фактора STAT-1 с помощью соответствующей цис-элемент-ловушки (SEQ ID NO: 33). (a) Репрезентативный Вестерн-блот-анализ с дополнительным денситометрическим анализом («интенсивность»)), данным в процентах от стимулированного контроля и отнесенным к внутреннему стандарту β-актину. Культивируемые THP-1 клетки предварительно

инкубировали в течение 4 часов с цис-элемент-ловушкой (10 мкМ) и затем инкубировали в течение 3 часов с 100 Е/мл фактора некроза опухоли- α и 1000 Е/мл интерферона- γ . (b)

Левая часть рисунка: статистическое обобщение 3 экспериментов с различными линиями культивируемых клеток гладкой мускулатуры человека, которые предварительно

5 инкубировали в течение 4 часов со STAT-1 (SEQ ID NO: 33), NF- κ B или GATA-1-цис-элемент-ловушкой (10 мкМ) и затем инкубировали в течение 9 часов с 1000 Е/мл интерферона- γ , 60 Е/мл интерлейкина-1 β , 100 Е/мл фактора некроза опухоли- α и 1 мкг/мл бактериального липополисахарида. Анализ экспрессии мРНК для индуцибельной изоформы NO-синтазы путем ПЦР с обратной транскриптазой (*P<0,05 против

10 стимулированных клеток = 100%). Правая часть рисунка: статистическое обобщение 3 экспериментов с различными клеточными линиями и репрезентативный Вестерн-блот-анализ ингибирования цитокин-стимулированной экспрессии белка NO-синтазы (через 20 часов экспозиции) посредством предварительной инкубации со STAT-1 (SEQ ID NO: 33) и NF- κ B цис-элемент ловушкой соответственно ((*P<0,05 против стимулированных клеток =

15 100%).

На Фиг.4 показана нейтрализация эндогенного STAT-1 в экстракте клеточных ядер линии моноцитов THP1 различными цис-элемент ловушками (SEQ ID NO: 17, 25, 29, 31, 33, 35, 37, 39 и мутантные контрольные олигонуклеотиды STAT-1-19mut и STAT-1-25mut).

Репрезентативный анализ изменения электрофоретической подвижности (EMSA).

20 Культивированные THP-1 клетки инкубировали 3 часа со 100 Е/мл фактора некроза опухоли- α и 1000 Е/мл интерферона- γ и далее использовали для приготовления экстракта ядер. Экстракт ядер клеток инкубировали вместе с двунитевым SIE-олигонуклеотидом, меченным [³²P] (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Германия), и соответствующей цис-элемент ловушкой и контрольным олигонуклеотидом в течение 20 минут при комнатной

25 температуре, и затем подвергали анализу изменения электрофоретической подвижности.

На Фиг.5 показан эффект выбранных STAT-1-цис-элемент ловушек (SEQ ID NO: 17, 31, 35, 37) на экспрессию мРНК E-селектина и MCP-1 в клетках гладкой мускулатуры вены тимуса человека. Культивированные клетки (пассирование 2) предварительно

30 инкубировали 4 часа с соответствующей цис-элемент-ловушкой и затем инкубировали 9 часов со 100 Е/мл фактора некроза опухоли- α и 1000 Е/мл интерферона- γ .

Репрезентативный анализ ПЦР с обратной транскриптазой, сравнимые результаты были получены в дальнейших экспериментах.

На Фиг.6 схематически показана структура STAT-1-антисмыслового вектора экспрессии pCI/ STAT-1 AS в виде генетической карты.

35 На Фиг.7 показан результат нейтрализации STAT-1 в культивированных клетках эндотелия человека различными цис-элемент ловушками (SEQ ID NO: 17, 19, 27, 33 и 39). Репрезентативный анализ EMSA в дополнение к денситометрическому анализ («интенсивность»). Культивированные клетки эндотелия инкубировали 4 часа с олигонуклеотидами-ловушками (10 мкмоль/л) и затем стимулировали в течение 30 минут

40 100 Е/мл фактора некроза опухоли- α и 1000 Е/мл интерферона- γ . Для анализа EMSA использовали экстракты ядер стимулированных клеток и двунитевые SIE-олигонуклеотиды, меченные [³²P] (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Германия).

На Фиг.8 показан гистологический анализ действия STAT-1 - олигонуклеотида-ловушки (STAT-1 конс, 10 нмоль, SEQ ID NO: 19), но не мутантного контрольного олигонуклеотида (STAT-1 mut, 10 нмоль, SEQ ID NO: 61), на DNCB-индуцированный контактный дерматит у самцов морской свинки (оригинал×400, типичный результат для в общей сложности 17

45 подопытных морских свинок).

Авторы изобретения охарактеризовали транскрипционные факторы, принимающие участие в опосредованном цитокинами усилении экспрессии провоспалительных генных

50 продуктов (CD40, E-селектина, индуцибельной изоформы NO-синтазы, интерлейкина-12 [p40], MCP-1) в клетках эндотелия, клетках гладкой мускулатуры человека, а также в моноцитах. При этом показано, что при стимуляции культивированных клеток эндотелия

ФНО- α или CD154 соответственно в комбинации с ИФН- γ имеет место синергизм между транскрипционными факторами: ядерным фактором κB (NF- κB) и переносчиком сигнала и активатором транскрипции-1 (STAT-1). То же самое соответственно справедливо и для культивированных клеток гладкой мускулатуры и моноцитов.

5 ИФН- γ сам по себе оказался способным усиливать экспрессию CD40 в клетках эндотелия человека, но не экспрессию E-селектина или интерлейкина-12. Для экспрессии
 10 обоих этих генных продуктов, которые почти не экспрессируются в клетках эндотелия или экспрессируются неконститутивно, существенной является одновременная стимуляция клеток ФНО- α (для E-селектина) и CD154 (для интерлейкина-12) соответственно. К тому же для опосредованного ИФН- γ усиления экспрессии CD40, но не E-селектина, в клетках
 15 эндотелия и моноцитах необходима *de novo* экспрессия еще одного транскрипционного фактора - интерферон-регулирующего фактора-1 (IRF-1). В рамках этих исследований показано, что экспрессия белка IRF-1 при моностимуляции клеток ИФН- γ и в особенности ФНО- α существенно слабее, чем в присутствии обоих цитокинов. Также при транскрипции
 20 гена IRF-1 транскрипционные факторы NF- κB и STAT-1 действуют синергически (Ohmori et al., J. Biol. Chem., (1997), 272, 14899).

STAT-1 (номер регистрации в GenBank NM007315 и XM010893, а также <http://transfac.gbf.de/cgi-bin/qt/getEntrv.pl?t0149> соответственно) принадлежит к группе
 25 транскрипционных факторов, содержащей по меньшей мере 6 членов. Продукт гена STAT-1 экспрессируется в большинстве клеток конститутивно, но, как правило, находится в цитоплазме в виде неактивного мономерного белка (91 кДа). Тирозин-фосфорилирование этой р91-субъединицы и последующее объединение (димеризация) двух таких р91-субъединиц (называемых STAT-1 α) делает возможным транспорт теперь активного
 30 транскрипционного фактора в ядро клетки. Гетеродимеризация с р84-субъединицей STAT-1 β (дифференциально сплайсированный продукт того же гена) также является возможной. Фосфорилирование конститутивно присутствующих субъединиц осуществляется посредством цитоплазматических Janus-киназ в зависимости от стимула. Так, обе Janus-киназы (Jak1 и Jak2) стимулируются ИФН- α (лучше привлекаемый на
 35 рецептор интерферона); важнейший (пато)физиологический стимул для активации STAT-1 ИФН- γ , напротив, стимулирует только Jak2. Также STAT-1 активируют различные факторы роста и пептидные гормоны (например ангиотензин II); кроме внутренних (фактор роста) рецептор-тирозинкиназ здесь также играет роль митоген-активируемая протеинкиназа (MAP-киназа). В противоположность STAT-1 α STAT-1 β не обладает трансактивирующей, то
 40 есть стимулирующей экспрессию генов активностью.

STAT-1 участвует в экспрессии ряда потенциальных провоспалительных генных продуктов в лейкоцитах, клетках эндотелия и клетках гладкой мускулатуры, где активация этого транскрипционного фактора, как правило, происходит зависимым от ИФН- γ
 45 образом. Исключением является, в частности, зависимая от STAT-1 экспрессия интерлейкина-6 в клетках гладкой мускулатуры, стимулированных ангиотензином II (Schieffer et al., Circ Res, (2000), 87, 1195).

Один аспект настоящего изобретения относится к применению ингибиторов активности транскрипционного фактора STAT-1 для изготовления лекарства для предотвращения или
 50 терапии сердечно-сосудистых осложнений, таких как рестеноз после чрескожной ангиопластики или стеноз венозного шунта, реакции трансплантат против хозяина, ишемических/реперфузионных повреждений при хирургических операциях и трансплантации органов соответственно, иммунологических реакций гиперчувствительности, в частности аллергического ринита, лекарственных и пищевых аллергий, в частности крапивницы и глютеновой болезни (спру), контактной экземы и
 55 комплексных иммунных заболеваний, в частности альвеолита, артрита, гломерулонефрита и аллергического васкулита, воспалительных хондро- и остеопатий, в частности артроза, подагры, остита и остеомиелита, полиневрита, как острого, так и подострого соответственно, инфекционного контингента и, в частности, постинфекционных

воспалительных болезней, в частности бронхита, эндокардита, гепатита, миокардита, нефрита, перикардита, перитонита и панкреатита, в том числе септического шока, для ослабления STAT-1-зависимой экспрессии провоспалительных продуктов генов, участвующих в этих воспалительных реакциях.

5 Активность белков, к которым также относится STAT-1, может быть ингибирована различными способами. Для этого могут быть использованы, например, антитела к STAT-1, а также природные или синтетические вещества, которые ослабляют взаимодействие STAT-1 с ДНК, то есть ослабляют транскрипционную активность. Кроме того, можно ингибировать сигнальный путь, который ведет к активации STAT-1 (Jak1, Jak2, рецепторы тирозинкиназ, MAP-киназы). Предпочтительными способами специфического ингибирования активности STAT-1 являются:

1. Нейтрализация активированного транскрипционного фактора олигонуклеотидом-ловушкой.

2. Ингибирование экспрессии белка STAT-1 с помощью антисмыслового олигонуклеотида.

3. Ингибирование экспрессии белка STAT-1 с помощью антисмыслового вектора экспрессии.

4. Ингибирование экспрессии белка STAT-1 с применением двунитевых РНК-олигонуклеотидов (днРНК-интерференция).

20 Используемое здесь выражение "олигонуклеотид-ловушка" или "цис-элемент-ловушка" означают двунитевую молекулу ДНК и двунитевой ДНК-олигонуклеотид соответственно. Обе нити ДНК имеют комплементарные последовательности. В настоящем изобретении цис-элемент ловушка имеет последовательность, которая соответствует природной кор-связывающей последовательности STAT-1 в геноме, или сходную с ней и связывается в клетке с транскрипционным фактором STAT-1. Таким образом, эта цис-элемент-ловушка действует как молекула для конкурентного ингибирования (лучше - нейтрализации) STAT-1.

Предпочтительным способом специфического ингибирования активности STAT-1 является использование двунитевых ДНК-олигонуклеотидов по настоящему изобретению, также называемых цис-элемент-ловушкой или олигонуклеотид-ловушкой, которые содержат сайт связывания для STAT-1. Экзогенное введение в клетку большого количества сайтов связывания транскрипционного фактора, в особенности гораздо большего количества, чем в геноме, приводит к ситуации, когда большое количество определенного транскрипционного фактора специфично связывается с соответствующей цис-элемент-ловушкой, а не с эндогенными сайтами связывания - мишенями. Этот подход, состоящий в ингибировании связывания транскрипционных факторов с их эндогенными сайтами связывания, также называется подавлением (squelching). Подавление (или также - нейтрализация) транскрипционных факторов с помощью цис-элемент-ловушек было успешно использовано для ингибирования роста клеток. С такой целью использовали фрагменты ДНК, содержащие специфичные сайты связывания транскрипционных факторов для транскрипционного фактора E2F (Morishita et al., PNAS, (1995) 92, 5855).

Последовательность нуклеиновой кислоты, которую применяют для предотвращения связывания транскрипционного фактора STAT-1, представляет собой, например, последовательность, с которой STAT-1 связывается в клетке в природе. STAT-1 специфично связывается с мотивом с

45 последовательностью 5'-NNNSANTTCCGGGAANTGNSN-3', где N=A, T, C или G, и S=C или G. Для эффективного связывания STAT-1 обязательно точное соответствие с подчеркнутыми основаниями и расстоянием между этими основаниями. Поэтому цис-элемент-ловушка по настоящему изобретению может иметь следующую 11-членную консенсусную кор-связывающую последовательность: 5'-NTTNCBGDAAN-3' (SEQ ID NO: 1), где V=C, G или T, D=A, G или T, и N=A, T, C или G. Цис-элемент ловушка может, кроме того, быть длиннее, чем 11-членная кор-связывающая последовательность и может быть длиннее на 5'-конце и/или на 3'-конце. Соответствующие мутации в пределах кор-связывающей последовательности приводят к потере связывания STAT-1 с

олигонуклеотидом-ловушкой.

Поскольку цис-элемент-ловушка является двунитевой нуклеиновой кислотой, ДНК-нуклеотид по этому изобретению содержит не только смысловую, или прямую, последовательность, но также и комплементарную антисмысловую, или обратную, последовательность. Предпочтительные ДНК-олигонуклеотиды по этому изобретению имеют 11-членную кор-связывающую последовательность для STAT-1:

5'-ATTACCGGAAG-3' (SEQ ID NO: 3),

5'-ATTCCGGTAAG-3' (SEQ ID NO: 5),

5'-ATTCCTGGAAG-3' (SEQ ID NO: 7),

5'-ATTCCTGTAAG-3' (SEQ ID NO: 9),

5'-GTTCCAGGAAC-3' (SEQ ID NO: 11),

5'-GTTCCCGGAAG-3' (SEQ ID NO: 13),

5'-GTTCCGGGAAC-3' (SEQ ID NO: 15),

при этом соответствующие комплементарные последовательности здесь не изображены. Однако цис-элемент-ловушка может также иметь последовательность, отличающуюся от предыдущей последовательности, и быть длиннее, чем 11-членная.

Особенно предпочтительны следующие последовательности:

(SEQ ID NO: 17): 5'-TGTGAATTACCGGAAGTGAGA-3'

21-членная, 2 сайта связывания,

(SEQ ID NO: 19): 5'-TGTGAATTACCGGAAGTG-3'

18-членная, 2 сайта связывания,

(SEQ ID NO: 21): 5'-AGTCAGTTCAGGAAGTACTGACT-3'

21-членная, 2 сайта связывания,

(SEQ ID NO: 23): 5'-ATGTGAGTTCAGGAAGTGAAGTACT-3'

23-членная, 2 сайта связывания,

(SEQ ID NO: 25): 5'-ACAGTTCAGGAAGTACTGTC-3'

19-членная, 2 сайта связывания,

(SEQ ID NO: 27): 5'-GACAGTTCAGGAAGTACTGTC-3'

19-членная, 2 сайта связывания,

(SEQ ID NO: 29): 5'-GTGTATTCAGGTAAGTGA-3'

18-членная, 2 сайта связывания,

(SEQ ID NO: 31): 5'-TTATGTGAATTCCTGGAAGTG-3'

21-членная, 2 сайта связывания,

(SEQ ID NO: 33): 5'-CATGTTATGCATATTCCTGTAAGTG-3'

25-членная, 2 сайта связывания,

(SEQ ID NO: 35): 5'-TGTGAATTCCTGTAAGTGAGA-3'

21-членная, 2 сайта связывания,

(SEQ ID NO: 37): 5'-TGCATATTCCTGTAAGTG-3'

18-членная, 2 сайта связывания,

(SEQ ID NO: 39): 5'-ATATTCCTGTAAGTG-3'

15-членная, 2 сайта связывания.

Выражение «2 сайта связывания» относится к смысловой и антисмысловой нити. Этим перечень предпочтительных последовательностей не ограничивается. Специалисту очевидно, что в качестве ингибиторов STAT-1 может быть использовано множество последовательностей, пока они удовлетворяют указанным выше условиям 11-членной консенсусной кор-связывающей последовательности и проявляют аффинность к STAT-1.

Аффинность связывания последовательности нуклеиновой кислоты со STAT-1 может быть определена путем анализа изменения электрофоретической подвижности (EMSA) (Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning. Cold Spring Harbor Laboratory Press;

Krzesz et al. (1999) FEBS Lett. 453, 191). Эта тест-система подходит для качественного контроля нуклеиновых кислот, которые предназначены для использования в способе по настоящему изобретению или для определения оптимальной длины сайта

связывания. Она также подходит для идентификации других последовательностей, которые связываются со STAT-1. Для EMSA, предназначенного для выделения новых сайтов связывания, больше всего подходят очищенные или рекомбинантные экспрессируемые варианты STAT-1, которые используют в нескольких идущих друг за другом циклах ПЦР-амплификации и в отборе посредством EMSA (Thiesen und Bach (1990) *Nucleic Acids Res.* 18, 3202).

Гены, для которых известно, что в их промоторных или энхансерных участках содержатся сайты связывания STAT-1, или для которых уже имеется функциональное доказательство важности STAT-1 для их экспрессии и которые поэтому являются вероятными мишенями для специфичного подавления согласно способу по настоящему изобретению, представляют собой помимо генов CD40, E-селектина, индуцибельной NO-синтазы, интерлейкина-12 (p40) и MCP-1 и другие провоспалительные гены, например, ИФН γ самого по себе, цитокина интерлейкин-6, молекул адгезии ICAM-1, PECAM-1 (эндотелиальная молекула клеточной адгезии тромбоцитов-1), RANTES (регулируемые активацией, экспрессируемые нормальными Т-клетками; предположительно секретируемые; секретируются Т-лимфоцитами в растворенном виде) и VCAM-1, хемокинов интерлейкин-8, IP-10 (интерферон-индуцибельный белок-10) и Mig (монокин, индуцируемый гамма-интерфероном), а также МНС-белков I и II. При этом не играет никакой роли, регулируется ли экспрессия этого гена непосредственно STAT-1 или опосредованно (например, через зависимую от STAT-1 экспрессию IRF-1).

Когда используют олигонуклеотид-ловушку против STAT-1 по настоящему изобретению, но не соответствующий контрольный олигонуклеотид, в клетках эндотелия человека, цитокин-индуцированная экспрессия CD40 (и при моностимуляции ИФН γ , и при комбинации ИФН γ и ФНО α) ингибируется значительно, более чем на 50%. Это справедливо также для экспрессии E-селектина и MCP-1, а также интерлейкина-12 (p40) при стимуляции клеток ИФН γ и ФНО α , а также CD154 соответственно. Выключение активности STAT-1 в соответствии с этим приводит к очень значительному ингибированию экспрессии группы провоспалительных генных продуктов в клетках эндотелия человека. Поэтому при таком терапевтическом подходе нужно рассчитывать на значительное уменьшение взаимодействия эндотелий-лейкоциты (E-селектин, MCP-1), а также взаимодействия антиген-презентирующих клеток (например макрофагов и В-лимфоцитов) с Т-лимфоцитами (CD40, интерлейкин-12) при воспалительных заболеваниях. Аналогично это также справедливо и для показанного ослабления цитокин-индуцированной экспрессии IRF-1 в THP-1 моноцитах (и следовательно, экспрессии «в прямом направлении» IRF-1-зависимых генов), а также цитокин-индуцированной экспрессии упомянутых генных продуктов, включая индуцибельную NO-синтазу, в клетках гладкой мускулатуры человека.

Способ по настоящему изобретению модулирует транскрипцию гена или генов таким образом, что этот ген или эти гены, например, E-селектина, не экспрессируются вовсе или экспрессируются слабее. Сниженная или подавленная экспрессия в контексте настоящего изобретения означает, что уровень транскрипции снижен по сравнению с клетками, которые не обработаны дунитевым ДНК-олигонуклеотидом по настоящему изобретению. Такое снижение может быть установлено, например, посредством Нозерн-блоттинга (Sambrook et al., 1989) или ПЦР с обратной транскриптазой (Sambrook et al., 1989). Такое снижение, как правило, является по меньшей мере 2-кратным, предпочтительно по меньшей мере 5-кратным, еще более предпочтительно по меньшей мере 10-кратным. Потеря активации может быть достигнута, например, когда STAT-1 в качестве транскрипционного фактора воздействует на определенный ген, и подавление активатора, таким образом, приводит к потере экспрессии гена-мишени.

Более того, способ по настоящему изобретению делает возможным отмену ингибирования экспрессии гена, когда эта экспрессия блокируется конститутивно активным или (после соответствующей стимуляции клетки) активированным транскрипционным фактором. Примером этого является отмена ингибирования экспрессии гена препро-эндотелина-1 в нативных клетках эндотелия *V. jugularis* кролика

посредством цис-элемент-ловушки белка, связывающего транскрипционный фактор ССААТ/энхансер (Lauth et al., J. Mol. Med., (2000), 78, 441). Таким же способом может быть осуществлена отмена ингибирования экспрессии генов, продукты которых оказывают защитное действие, например, против воспалительных заболеваний. Таким образом, например, осуществляется регуляция по типу отрицательной обратной связи посредством ИФН γ эндотелиальной изоформы NO-синтазы, продукт NO которой играет решающую роль при подавлении экспрессии провоспалительных молекул адгезии и хемокинов в клетках эндотелия (Rosenkranz-Weiss et al., (1994) J.Clin.Invest. 93, 1875). Цис-элемент ловушка STAT-1 может отменить этот нежелательный эффект путем предотвращения связывания STAT-1 с соответствующим сайтом связывания в промоторе гена эндотелиальной NO-синтазы.

Цис-элемент-ловушка по настоящему изобретению в предпочтительном воплощении содержит один или более чем один сайт связывания, предпочтительно 1, 2, 3, 4 или 5, особенно предпочтительно - 1 или 2 сайта связывания, с которыми специфично связывается STAT-1. Эти нуклеиновые кислоты можно получать путем синтеза, энзиматическими способами или в клетках. Отдельные способы представляют собой уровень техники и известны специалистам.

Длина у двухцепочечного ДНК-олигонуклеотида по меньшей мере такая же, как у применяемой последовательности, которая специфично связывает STAT-1. Используемый двухцепочечный ДНК-олигонуклеотид обычно имеет длину около 11-65, предпочтительно около 13-28, особенно предпочтительно 16-23 пар оснований.

Олигонуклеотиды, как правило, быстро разрушаются в клетке эндо- и экзонуклеазами, в частности ДНКазами и РНКазами. Вследствие этого ДНК-олигонуклеотиды можно модифицировать для стабилизации, т.е. против разрушения, так чтобы в течение длительного времени в клетке сохранялась высокая концентрация олигонуклеотида. Обычно такая стабилизация может быть достигнута путем введения одной или более чем одной модифицированной межнуклеотидной связи.

Успешно стабилизированный ДНК-олигонуклеотид содержит модификацию не обязательно в каждой межнуклеотидной связи. Предпочтительно, чтобы межнуклеотидные связи были модифицированы на соответствующих концах обоих олигонуклеотидов цис-элемент-ловушки. При этом могут быть модифицированы последние шесть, пять, четыре, три, две или последняя межнуклеотидная связь либо одна или более чем одна межнуклеотидная связь из последних шести межнуклеотидных связей. Кроме того, могут быть введены различные модификации межнуклеотидных связей в нуклеиновой кислоте, и полученные таким образом двуниевые ДНК-олигонуклеотиды тестируют на специфичное связывание последовательности со STAT-1, используя рутинные тест-системы EMSA. Эта тест-система позволяет определить константу связывания цис-элемент-ловушки и таким образом определить, изменилась ли аффинность после модификации. Могут быть отобраны модифицированные цис-элемент-ловушки, которые все еще обладают достаточным связыванием, при этом достаточное связывание означает по меньшей мере приблизительно 50% или по меньшей мере приблизительно 75% и особенно предпочтительно - приблизительно 100% от связывания немодифицированной нуклеиновой кислоты.

Цис-элемент ловушки с модифицированными межнуклеотидными связями, которые все еще проявляют достаточное связывание, могут быть проверены в отношении того, являются ли они более стабильными в клетке по сравнению с немодифицированными цис-элемент-ловушками. Клетки, «трансфицированные» цис-элемент-ловушками по настоящему изобретению, проверяют в различные моменты времени в отношении количества все еще присутствующих цис-элемент-ловушек. При этом предпочтительно используют цис-элемент-ловушку, меченную флуоресцентным красителем (например, Техасским красным), или цис-элемент-ловушку с радиоактивной меткой (например, ^{32}P) с последующей цифровой флуоресцентной микроскопией и автордиографией или скинтиграфией соответственно. Успешно модифицированная цис-элемент-ловушка имеет

период полужизни в клетке больше, чем у немодифицированных цис-элемент-ловушек, предпочтительно - по меньшей мере приблизительно 48 часов, более предпочтительно - приблизительно 4 суток, и наиболее предпочтительно - по меньшей мере приблизительно 7 суток.

5 Подходящие модифицированные межнуклеотидные связи обобщены в Uhlmann und Reyman ((1990) Chem. Rev. 90, 544). Модифицированные межнуклеотидные фосфатные остатки и/или нефосфорные мостики в нуклеиновой кислоте, которую можно использовать в способе по настоящему изобретению, включают, например, метилфосфат, фосфоротиоат, фосфородитиоат, фосфорамидат, фосфатный сложный эфир, в то время как межнуклеотидные аналоги, не содержащие фосфора, содержат, например, 10 силосановые мостики, карбонатные мостики, карбоксиметилэфирные мостики, ацетамидатные мостики и/или тиоэфирные мостики. При использовании фосфоротиоат-модифицированных межнуклеотидных связей они предпочтительно не должны находиться между основаниями цитозинном и гуанином, так как это может привести к активированию 15 клеток-мишеней цис-элемент-ловушки.

Еще одним воплощением данного изобретения является стабилизация нуклеиновых кислот путем введения в нуклеиновые кислоты структурных особенностей, которые увеличивают период полужизни нуклеиновой кислоты. Такие структуры, содержащие ДНК-шпильки и колоколообразные ДНК, описаны в US 5683985. Вместе с вышеуказанными 20 структурами могут быть введены модифицированные межнуклеотидные фосфатные остатки и/или нефосфорные мостики. Полученные таким образом нуклеиновые кислоты могут быть проверены в отношении связывания и стабильности с помощью тест-системы, описанной выше.

Кор-связывающая последовательность может находиться не только в цис-элемент-ловушке, но также и в векторе. Предпочтительной формой воплощения вектора является плазмидный вектор, и в особенности плазмидный вектор, способный реплицироваться аутосомно, посредством этого увеличивая стабильность введенной двунитевой нуклеиновой кислоты.

Цис-элемент ловушка по настоящему изобретению быстро проникает в клетку. 30 Достаточное проникновение характеризуется модулированием экспрессии одного или более чем одного гена, которые находятся под контролем STAT-1. Цис-элемент-ловушка по настоящему изобретению предпочтительно модулирует транскрипцию одного гена или генов приблизительно через 4 часа после контакта с клеткой, более предпочтительно приблизительно через 2 часа, приблизительно через 1 час, приблизительно через 30 35 минут и наиболее предпочтительно - приблизительно через 10 минут. Типичная смесь, которую используют в таком эксперименте, содержит 10 мкмоль/л цис-элемент-ловушки.

Настоящее изобретение относится также к способу модулирования транскрипции по меньшей мере одного гена в клетках, принимающих участие в воспалительных событиях, в особенности в клетках эндотелия, клетках эпителия, лейкоцитах, клетках гладкой 40 мускулатуры, кератиноцитах или фибробластах, включающему в себя стадию, на которой указанные клетки приводят в контакт со смесью, содержащей одну или более чем одну двунитевую нуклеиновую кислоту по настоящему изобретению, обладающую способностью связываться специфично к последовательности с транскрипционным фактором STAT-1. Предпочтительным способом является, например, обработка ex vivo донорского костного 45 мозга, содержащего Т-лимфоциты, перед пересадкой в организм реципиента.

Цис-элемент-ловушки по настоящему изобретению могут быть, кроме того, назначены пациентам в составе композиции или использованы в способе по настоящему изобретению. Композицию (в дальнейшем называемую смесью), содержащую цис-элемент-ловушки по настоящему изобретению, приводят в контакт с клетками-мишенями (например 50 клетками эндотелия, клетками эпителия, лейкоцитами, клетками гладкой мускулатуры, кератиноцитами или фибробластами). Целью этого контакта является перенос цис-элемент-ловушек, которые связывают STAT-1, в клетку-мишень (то есть в клетку, которая STAT-1-зависимым образом экспрессирует провоспалительные генные продукты). Поэтому

в объеме настоящего изобретения могут быть использованы модификация нуклеиновой кислоты и/или добавка или вспомогательное вещество, для которых известно, что они увеличивают проникновение через мембрану (Uhlmann und Peyman (1990) Chem. Rev. 90, 544).

5 Смесь по настоящему изобретению в предпочтительном воплощении содержит только нуклеиновую кислоту и буфер. Подходящая концентрация цис-элемент-ловушек находится в диапазоне по меньшей мере от 0,1 до 100 мкМ, предпочтительно до 10 мкМ, в связи с этим может быть добавлен один или более чем один подходящий буфер. Примером такого буфера является раствор Рингера, содержащий 145 ммоль/л Na^+ 5 ммоль/л K^+ 156
10 ммоль/л Cl^- , 2 ммоль/л Ca^{2+} 1 ммоль/л Mg^{2+} , 10 ммоль/л Hepes , 10 ммоль/л D-глюкозы, pH 7,4.

В еще одном воплощении данного изобретения смесь дополнительно содержит по меньшей мере одну добавку и/или вспомогательное вещество. Добавки и/или
15 вспомогательные вещества, такие как липиды, катионные липиды, полимеры, липосомы, наночастицы, аптамеры нуклеиновых кислот, пептиды и белки, которые связываются с ДНК, или синтетические молекулы пептид-ДНК, предназначены для того, чтобы, например, (1) усиливать внедрение нуклеиновых кислот в клетку; (2) чтобы смесь достигла только одной подгруппы клеток; (3) чтобы препятствовать разрушению нуклеиновой кислоты в клетке; (4) чтобы облегчить хранение смеси нуклеиновых кислот до использования.
20 Примерами пептидов и белков или синтетических молекул пептид-ДНК являются антитела, фрагменты антител, лиганды, молекулы адгезии, которые все могут быть модифицированными или немодифицированными.

Добавки, которые стабилизируют цис-элемент-ловушки в клетке, представляют собой, например, вещества, конденсирующие нуклеиновую кислоту, такие как катионные
25 полимеры, поли- β -лизин или полиэтиленмин.

Смесь, которую используют в способе по настоящему изобретению, предпочтительно вводят местно путем инъекции, при помощи катетера, суппозитория, аэрозолей (ингаляция
спрея в нос или ротовую полость), троакара, бомбардирующих частиц (projectiles), гелей из плуроника, полимеров с длительным высвобождением лекарства, или любым
30 другим путем, делающим возможным местный доступ. *Ex vivo* применение смеси, используемое в способе по настоящему изобретению, также обеспечивает местный доступ.

Ингибирование активности STAT-1, однако, можно осуществлять не только на уровне белков в описанном выше способе, а также до и во время трансляции белка транскрипционного фактора. Поэтому дальнейший аспект настоящего изобретения состоит
35 в том, чтобы предложить ингибитор экспрессии белка STAT-1 в качестве терапевтического агента. Этот ингибитор предпочтительно является молекулой одонитевой нуклеиновой кислоты, так называемым антисмысловым олигонуклеотидом. Антисмысловые олигонуклеотиды могут ингибировать синтез гена-мишени на трех разных уровнях: при транскрипции (предотвращение синтеза гетерогенной ядерной РНК (гяРНК)), при
40 процессинге (сплайсинге) гяРНК до мРНК и при трансляции белка с мРНК на рибосомах. Способ ингибирования экспрессии генов посредством антисмысловых олигонуклеотидов описан в уровне техники и хорошо известен специалистам в данной области. В качестве антисмыслового олигонуклеотида можно использовать молекулу одонитевой нуклеиновой
45 кислоты с любой последовательностью, которая делает этот антисмысловой олигонуклеотид способным ингибировать экспрессию белка STAT-1. Антисмысловой олигонуклеотид, который применяют против STAT-1 в способе по настоящему изобретению, предпочтительно имеет последовательность 5'-ТАССАСТГАГАСАТССТГССАС-3' (SEQ ID NO: 41) и образует мостик со стартовым кодоном. Дальнейшими предпочтительными последовательностями
50 для антисмысловых олигонуклеотидов являются 5'-ААСАТСАТТГГСАСГСАГ-3' (SEQ ID NO: 42) и 5'-ГТГААССТГСТССАГ-3' (SEQ ID NO: 43). Антисмысловой олигонуклеотид может быть одонитевой молекулой ДНК, молекулой РНК или молекулой-гибридом ДНК/РНК. Более того, антисмысловой олигонуклеотид может иметь одну или более чем

одну модифицированную межнуклеотидную связь, например, как описано выше для цис-элемент-ловушки. В случае антисмыслового олигонуклеотида, который стабилизирован межнуклеотидными связями, которые модифицированы фосфотиоатом, надо учитывать, в частности, что между основаниями цитозином и гуанином не должны быть вставлены
 5 модифицированные фосфотиоатом интернуклеотидные связи, потому что это ведет к активации, подобной активации интерфероном- γ , в частности, иммунокомпетентных клеток (например, эндотелиальных клеток), и таким образом, должно по крайней мере частично мешать желаемому терапевтическому эффекту.

Антисмысловые олигонуклеотиды по этому изобретению также можно использовать в
 10 композиции для введения пациентам. Эти композиции можно составлять со стабилизирующими добавками или вспомогательными веществами, например, способствующими введению антисмысловых олигонуклеотидов в клетку, нацеливанию композиции только на подгруппу клеток, предотвращению, например, разрушения антисмысловых олигонуклеотидов внутри клетки, или способствующих, например,
 15 хранению антисмыслового олигонуклеотида до применения.

Антисмысловый олигонуклеотид может быть введен не только в виде одонитевой молекулы нуклеиновой кислоты, но также может быть представлен в виде вектора. Предпочтительным воплощением является плазмидный вектор и в особенности
 20 плазмидный вектор, способный аутосомно реплицироваться, тем самым увеличивая стабильность введенной одонитевой нуклеиновой кислоты.

Таким образом, еще одним аспектом настоящего изобретения является антисмысловый вектор экспрессии, который после трансфекции в клетки-мишени экспрессируется ими и специфически ингибирует экспрессию STAT-1. При этом может быть применен любой доступный эукариотический вектор экспрессии в соответствии с уровнем техники.
 25 Предпочтительно это касается pCI-плазмиды фирмы "Promega" (Каталожный №E1731, GenBank Accession Number U47119), в которой, например, участок гена STAT-1 размером 2350 п.о. (от -121 до +2229, GenBank Accession Number (XM010893) клонирован в обратном направлении (3'→5'). Этот участок STAT-1-гена фланкирован двумя сайтами рестрикции EcoR1 и содержит один сайт рестрикции Xho1. Его экспрессия находится под контролем
 30 CMV-промоторов. Вся плазида целиком (обозначена pCI/Stat1 AS) содержит 6365 п.о.

Более того, как описано в Fire (1999), Trends Genet. 15, 358 и Elbashir et al. (2001), Nature 411, 494, предпочтительным способом ингибирования активности STAT-1 на уровне трансляции мРНК в белок транскрипционный фактор является днРНК-интерференция. В случае этого способа в клетку вводят двойную нить РНК, содержащую
 35 точно 21 нуклеотид, последовательность которой идентична сегменту кодирующей мРНК целевого белка (STAT-1). Затем формируется комплекс белков, к настоящему времени не известный в деталях, который специфично расщепляет мРНК-мишень, тем самым предотвращая ее трансляцию. Более длинные двойные цепи РНК использовать нельзя, потому что они вызывают в клетках-мишенях ответ, который сравним с реакцией клеток на
 40 (вирусную) инфекцию, что будет мешать желаемому терапевтическому эффекту.

Смесь, содержащую олигонуклеотиды днРНК-интерференции по этому изобретению, приводят в контакт с клетками-мишенями (например, эндотелиальными клетками, эпителиальными клетками, лейкоцитами, клетками гладкой мускулатуры, кератиноцитами или фибробластами). В связи с этим используют добавки или вспомогательные вещества, о
 45 которых известно, что они улучшают проникновение через мембрану (Uhlmann and Peyman (1990), Chem. Rev. 90, 544).

Следующие фигуры и примеры служат только для иллюстрации и ни в каком отношении не ограничивают объем этого изобретения.

1. Клеточная культура

50 Клетки эндотелия человека выделяли из пупочных вен путем обработки 1,6 Е/мл диспазы в Нерес-модифицированном растворе Тироде в течение 30 мин при 37°C и культивировали на покрытых желатином 6-луночных культуральных планшетах (2 мг/мл желатина в 0,1 М HCl в течение 30 мин при температуре окружающей среды) в 1,5 мл

среды M199 (Gibco Life Technologies, Карлсруэ, Германия), содержащей 20% фетальную телячью сыворотку, 50 Е/мл пенициллина, 50 мкг/мл стрептомицина, 10 Е/мл нистатина, 5 мМ NEPEs и 5 мМ TES, 1 мкг/мл гепарина и 40 мкг/мл эндотелиального фактора роста. Их идентифицировали по их типичной морфологии, напоминающей брусчатку,

5 положительному иммунному окрашиванию для фактора фон Виллебрандта (vWF) и флуориметрической детекции (FACS) PECAM-1 (CD31), а также по отрицательному иммунному окрашиванию для α -актина гладких мышц (Krzesz et al., (1999), FEBS Lett. 453191).

Клеточную линию моноцитов человека THP-1 (ATCC TIB 202) культивировали в среде RPMI 1640 (Life Technologies), содержащей 10% фетальную телячью сыворотку, 50 Е/мл пенициллина, 50 мкг/мл стрептомицина и 10 Е/мл нистатина. Клетки гладких мышц человека выделяли из препарированной вены тимуса по технологии эксплантации (Krzesz et al., (1999), FEBS Lett. 453191) и культивировали на покрытых желатином 6-луночных культуральных планшетах (см. выше) в 1,5 мл модифицированной по Дульбекко среды Игла, содержащей 15% фетальной телячьей сыворотки, 50 Е/мл пенициллина, 50 мкг/мл стрептомицина и 10 Е/мл нистатина. Их идентифицировали по положительному иммунному окрашиванию для α -актина гладких мышц.

2. Анализ путем ПЦР с обратной транскриптазой

Эндотелиальную общую РНК выделяли при помощи набора Qiagen RNeasy Kit (Qiagen, Хилден, Германия) с последующим синтезом кДНК с максимальным количеством 3 мкг РНК и 200 Е обратной транскриптазы Superscript™ II (Life Technologies) в общем объеме 20 мкл в соответствии с инструкциями производителя. Для выравнивания нагрузки по кДНК использовали 5 мкл (приблизительно 75 нг кДНК) получающегося в результате раствора кДНК и пары праймеров (Gibco) для ПЦР фактора элонгации 1 (EF-1) с 1 Е Taq ДНК-полимеразы (Gibco) в общем объеме 50 мкл. EF-1 использовали в качестве внутреннего стандарта для ПЦР. Продукты ПЦР разделяли в 1,5% агарозных гелях, содержащих 0,1% этидия бромид, и интенсивности полос определяли денситометрически при помощи системы камер CCD и программного обеспечения для гель-анализа One-Dscan от Scanalytics (Billerica, MA, USA) для приведения в соответствие с объемом кДНК в последующих анализах ПЦР.

Все реакции ПЦР проводили отдельно для каждой пары праймеров в термоциклере Hybaid OmnE (AWG; Heidelberg, Германия). Индивидуальные условия ПЦР для кДНК из клеток эндотелия пупочных вен человека были следующими: CD40 (размер продукта 381 п.о., 25 циклов, температура отжига 60°C, (прямой праймер) 5'-CAGAGTTCACCTGAAACGGAATGCC-3' (SEQ ID NO:44), (обратный праймер) 5'-TGCCTGCCTGTTGCACAACC-3' (SEQ ID NO:45)); E-селектин (размер продукта 304 п.о., 33 цикла, температура отжига 60°C, (прямой праймер) 5'-AGCAAGGCATGATGTTAACC-3' (SEQ ID NO:46), (обратный праймер) 5'-GCATTCCCTCTCTCCAGAGC-3' (SEQ ID NO:47)); EF-1 (размер продукта 220 п.о., 22 цикла, температура отжига 55°C, (прямой праймер) 5'-TCTTAATCAGTGGTGGAAAG-3' (SEQ ID NO:48), (обратный праймер) 5'-TTTGGTCAAGTTGTTTCC-3' (SEQ ID NO:49)); ИЛ-12p40 (размер продукта 281 п.о., 30 циклов, температура отжига 62°C, (прямой праймер) 5'-GTACTCCACATTCCTACTTCTC-3' (SEQ ID NO:50), (обратный праймер) 5'-TTTGGGTCTATTCCGTTGTGTC-3' (SEQ ID NO:51)); rpl32 (размер продукта 368 п.о., 20 циклов, температура отжига 60°C, (прямой праймер) 5'-GTTTCATCCGGCACCCAGTCAG-3' (SEQ ID NO:52), (обратный праймер) 5'-ACGTGCACATGAGCTGCCTAC-3' (SEQ ID NO:53)); MCP-1 (размер продукта 330 п.о., 22 цикла, температура отжига 63°C, (прямой праймер) 5'-GCGGATCCCCTCCAGCATGAAAGTCTCT-3' (SEQ ID NO:54), (обратный праймер) 5'-ACGAATTCTTCTTGGGTTGTGGAGTGAG-3' (SEQ ID NO:55)).

3. Анализ изменения электрофоретической подвижности (EMSA)

Экстракты ядер и [³²P]-меченные двунитевые консенсусные олигонуклеотиды (Santa Cruz Biotechnologie, Heidelberg, Германия), подвергали неденатурирующему электрофорезу в полиакриламидном геле, авторадиографии и анализу Supershift, как описано в Krzesz et al., (1999), FEBS Lett. 453, 191. При этом использовали двунитевой ДНК-олигонуклеотид со следующей однонитевой последовательностью (кормящая последовательность подчеркнута):

SIE, 5'-GTGCATTTCCCGTAAATCTTGTC-3' (SEQ ID NO:56). Для анализа вытеснения эндогенного STAT-1 в экстрактах ядер цитокин-стимулированных THP-1 клеток (клеточная линия пре-моноцитов человека) посредством различных цис-элемент-ловушек в условиях EMSA-связывания было выбрано соотношение 30:1 (цис-элемент-ловушка STAT-1: [³²P]-меченный олигонуклеотид SIE (11 fmol)).

4. Технология олигонуклеотидов-ловушек

Двунитевые олигонуклеотиды-ловушки получали из комплементарных однонитевых фосфоротиоат-связанных олигонуклеотидов (Eurogentec, Köln, Deutschland) в соответствии с тем, как описано в Krzesz et al (1999) FEBS Lett. 453, 191. Культивированные клетки эндотелия человека предварительно инкубировали в течение 4 часов с соответствующим олигонуклеотидом-ловушкой в концентрации 10 мкМ. Эти условия были оптимизированы ранее на основе анализов EMSA и ПЦР с обратной транскриптазой. Среду, содержащую олигонуклеотид-ловушку, после этого обычно заменяли свежей средой. Однонитевые последовательности олигонуклеотидов были следующими (подчеркнутые буквы означают фосфоротиоат-связанные основания, все последовательности приведены в направлении 5'-3'):

GATA-2, CACTTGATAACAGAAAGTGATAACTCT (SEQ ID NO:57)
 NF-κB, AGTTGAGGGGACTTTCCAGGC (SEQ ID NO:58);
 STAT-1, CATGTTATGCATATTCCTGTAAGTG (SEQ ID NO:33);
 STAT-1-19mut, GACAGTGCAGTGAACTGTC (SEQ ID NO:59);
 STAT-1-25mut, CATGTTATGCAGACCGTAGTAAGTG (SEQ ID NO:60).

5. Технология антисмысловых олигонуклеотидов (ODN)

Для эксперимента с антисмысловыми последовательностями к 100 мл культуральной среды OPTI-MEM®I добавляли 15 мкл липофектина (Gibco Life Technologie, Karlsruhe, Германия) и инкубировали при комнатной температуре (КТ) в течение 45 минут (раствор А). После этого добавляли антисмысловой ODN (Eurogentec, Köln, Германия) до конечной концентрации 0,5 мкМ в 100 мкл культуральной среды OPTI-MEM®I (раствор В). После объединения растворов А и В дальнейшее инкубирование традиционной клеточной культуральной среды для культуры эндотелиальных клеток (без гепарина и эндотелиального фактора роста) добавляли в пробирку типа Эппендорф, содержащую комплекс липофектин-антисмысловой ODN, и клеточную культуральную среду для культуры эндотелиальных клеток заменяли средой антисмысловая последовательность-липидофектин. Среду антисмысловая последовательность-липидофектин удаляли через 4 часа и замещали свежей культуральной средой (с гепарином и эндотелиальным фактором роста). Последовательность STAT-1-антисмыслового ODN представляла собой 5'-Т*А*ССА*С*Т*Г*А*Г*А*С*А*Т*СС*Т*GCC*А*С-3' (*фосфоротиоат-модифицированное основание; SEQ ID NO:41).

6. Вестерн-блот анализ

Клетки эндотелия пуповины человека и гладкомышечные клетки из вены тимуса разрушали посредством пяти последовательных циклов замораживания в жидком азоте и оттаивания при 37°C (термоблок, Kleinfeld, Германия). Белковые экстракты получали как описано Hecker et al., (1994), Biochem J. 299, 247. 20-30 мкг белка разделяли путем электрофореза в 10% полиакриламидном геле в денатурирующих условиях в присутствии додецилсульфата натрия (SDS), следуя стандартному протоколу, и переносили на поливинилфторидную мембрану переноса BioTrace™ (Pall Corporation,

Ropdorf, Германия). Для иммунологической детекции белка использовали следующие первичные антитела: белок CD40 (поликлональное, разведение 1:2000, Research Diagnostics Inc., Flanders NJ, США), белок STAT-1 (моноклональное, разведение 1:5000, BD Transduction Laboratories, Heidelberg, Германия), белок IRF-1 (поликлональное, разведение 1:2000, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Германия), белок iNOS (поликлональное, разведение 1:3000, BD Transduction Laboratories, Heidelberg, Германия). Полосы белка обнаруживали после добавления анти-кроличьих IgG, связанных с пероксидазой, и в случае использования моноклонального первичного антитела посредством соответствующего анти-мышинного IgG (1:3000, Sigma, Deisenhofen, Германия) с использованием хемилюминесцентного метода (SuperSignal хемилюминесцентный субстрат; Pierce Chemical, Rockford, IL, США) и последующей автордиографией (Hyperfilm™MP, Amersham Pharmacia, Biotech, Buckinghamshire, Англия). Нанесение и перенос одинаковых количеств белка были показаны после «разборки» мембраны для переноса (5 минут 0,2 н. NaOH, с последующей отмывкой H₂O, 3×10 минут) детекцией одинаковых полос белка β-актина с моноклональным первичным антителом и связанным с пероксидазой анти-мышинным IgG (оба от Sigma-Aldrich, разведение 1:3000).

7. Статистический анализ

Если не указано иного, все данные на Фигурах и в тексте представлены как среднее ± среднеквадратическое отклонение (С.О.) из n экспериментов. Статистический анализ осуществляли с использованием t-критерия Стьюдента для непарных данных с р-значением <0,05, который считали статистически значимым.

8. Подтверждение эффекта олигонуклеотидов-ловушек экспериментами на животных

8.1 Мышь

Для подтверждения эффективности терапевтического подхода, основанного на олигонуклеотидах-ловушках, разработанных в соответствии с настоящей заявкой, было проведено экспериментальное "доказательство концепции" путем экспериментов на животных, где использовали мышей, 8-10 животных на группу, для выявления антиген-индуцированного артрита (модель см. у Henzgen et al., Exp. Toxicol. Pathol. (1996), 48, 255). Однократное введение 0,25 нмоль олигонуклеотида-ловушки STAT-1 (SEQ ID NO: 33) непосредственно в сустав (внутрисуставная инъекция) значительно снижала индуцированное антигеном опухание сустава (на 35%), интенсивность воспалительной реакции (на 70%), разрушение сустава (на 80%), общее количество артритных очагов (на 70%) и концентрацию провоспалительных цитокинов в сыворотке (например, интерлейкина-6 - на 80%) за период 3-14 суток. В противоположность этому соответствующий контрольный олигонуклеотид не обладал никаким терапевтическим эффектом.

Более того, заслуживающим внимания в этом исследовании является то, что контактный дерматит (реакция IV типа), развившийся на коже через 14 дней после индуцирования артрита - тем что антиген введен еще одной инъекцией животным подкожно - также был значительно снижен (на 35%) у мышей, подвергнутых лечению олигонуклеотидом-ловушкой.

8.2 Морская свинка

После двукратной аллергизации морских свинок (Hartley, самцы, масса тела 350 г) в течение периода 7 суток (в 1-е сутки - в одно ухо, во 2-е сутки - в другое ухо по 50 мкл 10% раствора DNCB (динитрохлорбензол) в 50% ацетоне/50% оливковом масле; на 7-е сутки - повторная иммунизация в кожу шеи 15 мкл 2% раствора DNCB-раствора в 95% ацетоне/5% оливковом масле) контактный дерматит вызывали повторным применением 2,4-динитрохлорбензола (DNCB; 10 мкл 0,5% раствора DNCB в 95% ацетоне/5% оливковом масле) на 13-е сутки на одном или более чем одном участке размером примерно 1 см² бритых спин животных и через 24 часа проводили макроскопическую и гистологическую оценку. Вызванный таким образом контактный дерматит гистологически (окрашивание красителем Гимза) характеризуется образованием ярко выраженного отека и межклеточного отека в области эпидермиса, увеличением апоптотических клеток, а также обширной инфильтрацией лейкоцитов (Фиг.8). Внутрикожное введение олигонуклеотида-

ловушки STAT-1 (SEQ ID NO:19), но не мутантного контрольного олигонуклеотида (5'-TGTGGACCGTAGGAAGTG-3', SEQ ID NO:61) за час до конечной экспозиции DNCB приводило к выраженному сокращению упомянутых гистологических параметров, то есть в целом к значительному ослаблению воспалительной реакции.

8.3 Исследование влияния терапии олигонуклеотидами-ловушками на выживаемость сердечных аллотрансплантатов в трансплантационной модели на крысах

В опытах использовали инбредных самцов крыс линий Lewis (LEW, RT1¹), Wistar-Furth (WF, RT^u). Животных содержали в стандартных условиях и процедуры трансплантации осуществляли, когда животные достигали массы 250 г). Крысы LEW служили реципиентами для сердечных аллотрансплантатов WF.

Трансплантацию сердец осуществляли согласно модифицированной методике Ono and Lindsey (J. Thorac Cardiovasc. Surg., 1969; 225-9). После извлечения донорских сердец WF их подвергали перфузии 4 мл раствора олигонуклеотида-ловушки STAT-1 (SEQ ID No: 33) (5 мкмоль/л) или TEN буферным раствором (10 ммоль/л Трис, 1 ммоль/л ЭДТА (этилендиаминотетрауксусная кислота) и 150 ммоль/л NaCl) соответственно и подвергали в течение 45 минут тепловой ишемии. Повергавшиеся терапии и контрольные группы включали по пять животных. Системную иммунотерапию к животным не применяли. Для последующих анализов трансплантаты из различных экспериментальных групп собирали в дни 1, 3 и 6 после трансплантации (n=5 животных для каждой временной точки и подвергавшейся терапии группы).

Для гистологических анализов сердечные аллотрансплантаты, собранные в указанные дни, секционировали на 2-мм срезы, обрабатывали и хранили, как описано Adams et al. (The Lewis-to-F-344 allograft model. Transplantation 1992; 53: 1115-9).

Иммуногистохимические анализы проводили согласно Ono and Lindsey (J. Thorac Cardiovasc. Surg., 1969; 225-9).

Кроме того, готовили кольцевые сегменты аорт крыс Wistar с массой тела 200-250 г согласно Wagner et al. (Br. J. Pharmacol. 2002; 136: 143-9). Сегменты 5-7 мм длиной помещали в 1 мл среды Waymouth, содержащей 10% фетальной сыворотки теленка, и инкубировали в течение 16 ч в отсутствие и в присутствии IFN- γ (200 ед./мл). Затем часть этих сегментов подвергали предварительной обработке (4 ч) олигонуклеотидом-ловушкой STAT-1 (SEQ ID No:33) (10 мкмоль/л). Белковые экстракты сегментов подвергали вестерн-блот-анализу и гелевому электрофорезу согласно Wagner et al. (Br. J. Pharmacol. 2002; 136: 143-9).

Полученные результаты показали, что обработка сердечных трансплантатов раствором олигонуклеотида-ловушки STAT-1 в процессе 45-минутной тепловой ишемии имела результатом значительное поглощение олигонуклеотидной ДНК эндотелием трансплантатов, что привело к существенному увеличению периода выживания трансплантатов от $5,6 \pm 0,5$ дней в контроле до $7,4 \pm 0,5$ дней в случае обработки олигонуклеотидом. Иммуногистохимический анализ в дни 1, 3 и 6 выявил значительное снижение количества инфильтрующих лейкоцитов (на 50% по сравнению с контролем), а именно Т-клеток, моноцитов/макрофагов, МНС класс II - позитивных клеток. Диффузный воспалительный инфильтрат ассоциирован с некрозом миоцитов (см. Фиг.9).

Иммуногистохимические анализы показали, что обработка трансплантатов раствором олигонуклеотида-ловушки в значительной степени снижала экспрессию провоспалительных генов ICAM-1 и VCAM-1 (см. Фиг.10). Гистохимическое исследование сегментов аорты показало, что их обработка олигонуклеотидом полностью блокировала стимулированную IFN- γ экспрессию VCAM-1.

Обработка трансплантатов олигонуклеотидом не показала никаких токсических эффектов, а также не вызывала повреждения ткани трансплантатов или гистохимических повреждений по сравнению с контрольной группой через 1 сутки после процедуры трансплантации.

Таким образом, обработка сердечных трансплантатов в ходе процедуры трансплантации двунитевым олигонуклеотидом-ловушкой STAT-1: (1) подавляет экспрессию ICAM-1 и

VCAM-1 на ранней фазе отторжения, (2) снижает воспалительный ответ путем понижения клеточной инфильтрации иммунокомпетентными клетками, такими как Т-клетки, моноциты/макрофаги, МНС класс II - позитивные клетки, (3) значительно продлевает выживание сердечных трансплантатов без системного введения дополнительной иммуносупрессивной терапии.

9. Приготовление лекарства

Лекарство на основе двунитевого ДНК-олигонуклеотида согласно настоящему изобретению может быть представлено в виде раствора для небулайзера, содержащего от примерно 0,1 до примерно 100 мг двунитевого ДНК-олигонуклеотида на мл раствора, предпочтительно 2,5, 5 или 10 мг двунитевого ДНК-олигонуклеотида на мл раствора. Раствор может представлять собой водный забуференный фосфатом физиологический раствор хлорида натрия (ЗФР) с рН примерно 7,4. Для приготовления лекарства двунитевой ДНК-олигонуклеотид растворяют в ЗФР. После растворения двунитевого ДНК-олигонуклеотида раствор стерилизуют фильтрованием.

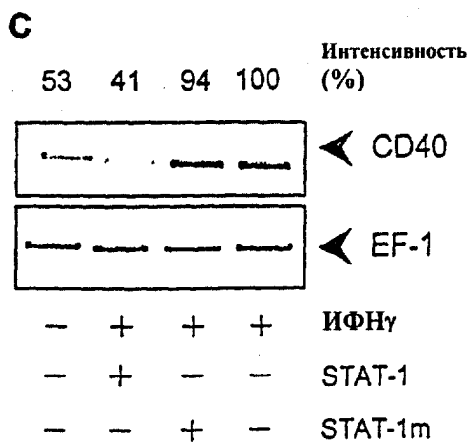
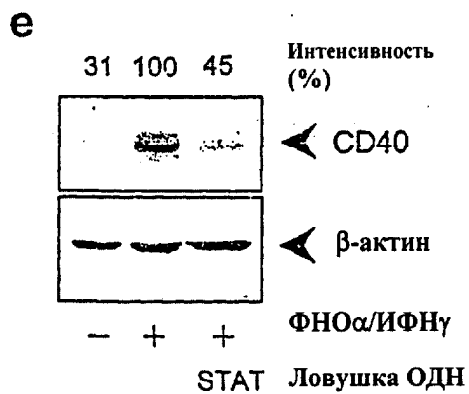
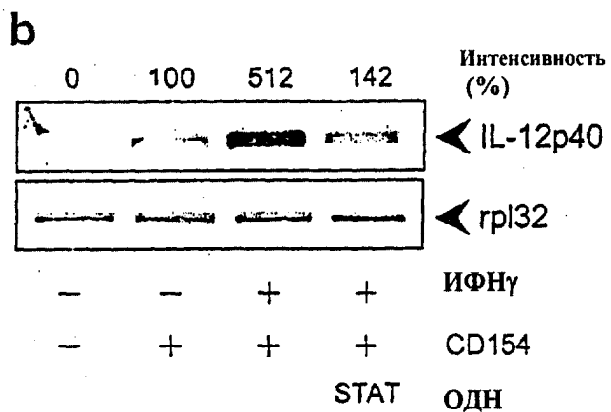
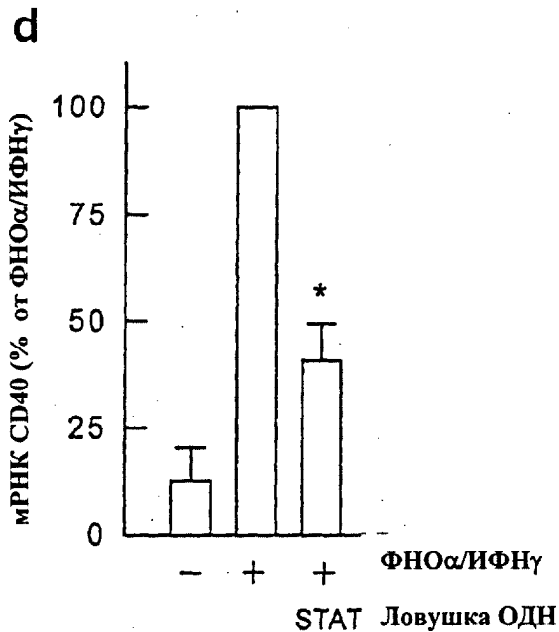
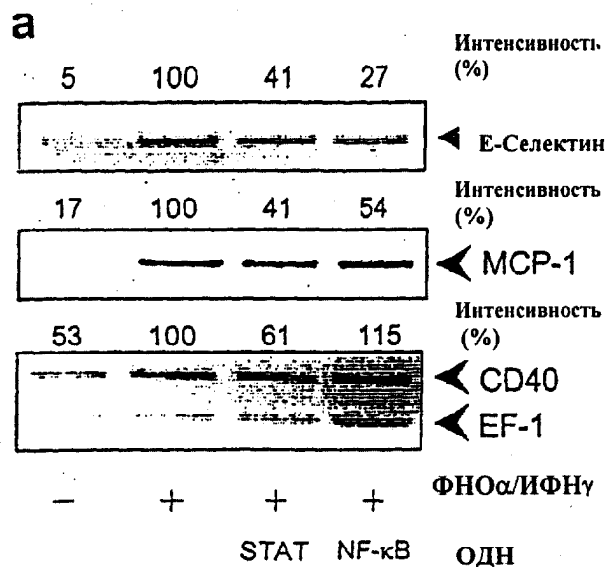
Состав ЗФР раствора:

| Забуференный фосфатом физиологический раствор (ЗФР): 150 мМ | | |
|---|-------------|-----------|
| | % (об./об.) | г/л |
| Одноосновный фосфат натрия, дигидрат | 0,0300 | 0,30±0,02 |
| Хлорид натрия | 0,8200 | 8,20±0,05 |
| Двухосновный фосфат натрия, 12-гидрат | 0,3100 | 3,10±0,05 |
| Вода (ВЭЖХ чистота или эквивалентная), сколько требуется | | |

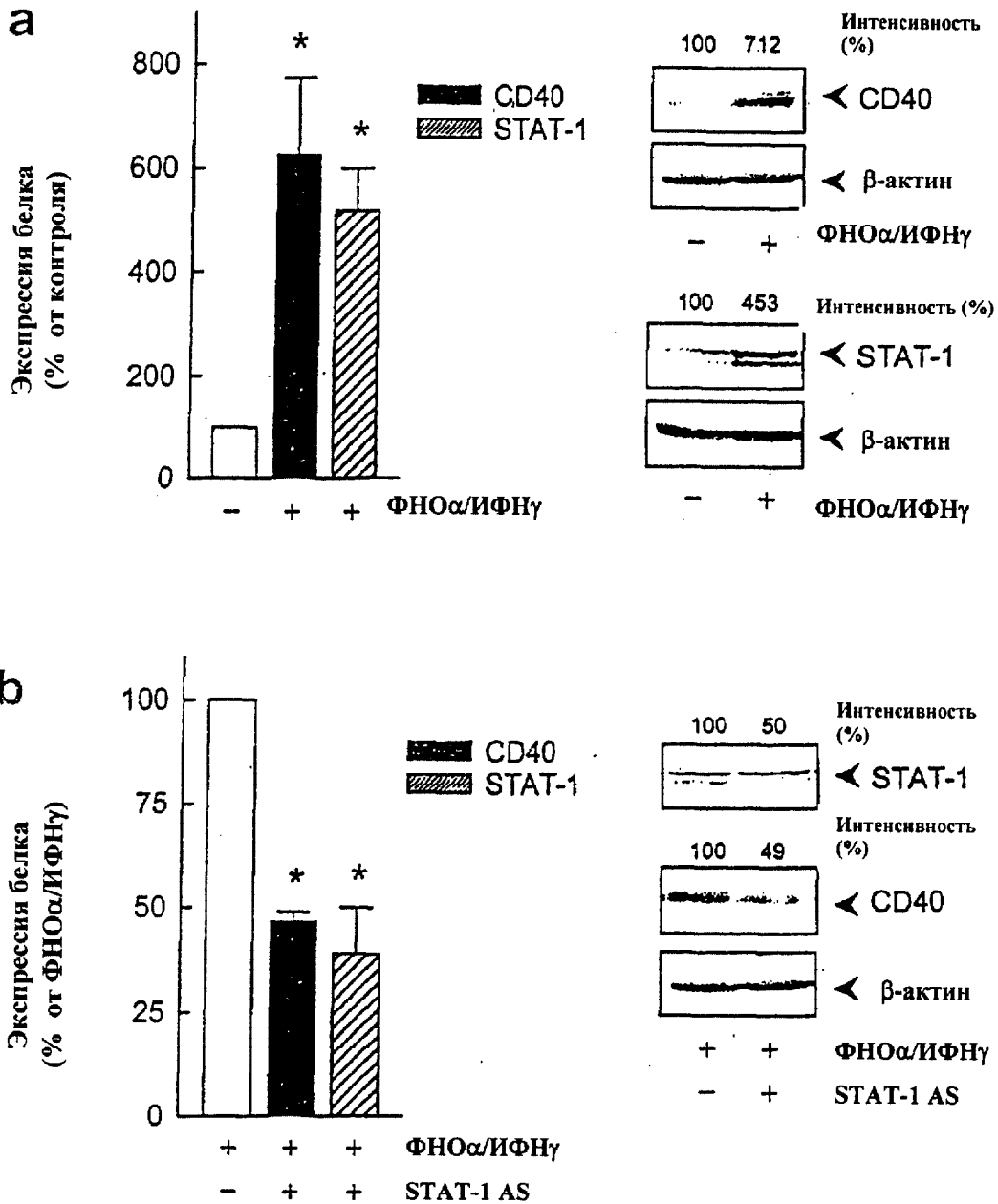
Вводимый объем составляет 2,0 мл раствора на одно приведение в действие, что дает дозы 5 и 10 мг двунитевого ДНК-олигонуклеотида. 2,3 мл растворов содержатся в стеклянных виалах емкостью 6 мл. 2 мл этого раствора с помощью шприца или пипетки эппендорф отбирают из виал и вносят в камеру небулайзера.

Формула изобретения

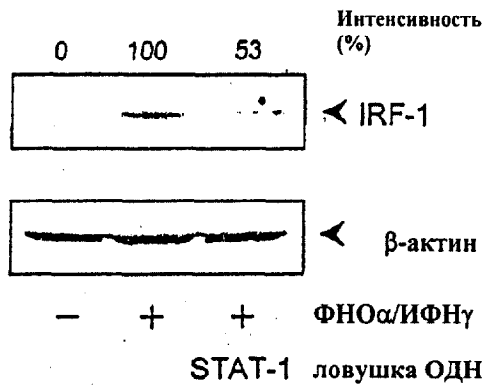
Применение двунитевого ДНК-олигонуклеотида, выбранного из SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:37 или SEQ ID NO:39, пригодного для ингибирования активности STAT-1, где STAT-1 является транскрипционным фактором, представляющим собой ДНК-связывающий белок, для изготовления лекарства для ослабления воспалительных реакций и для предотвращения или терапии, ишемических/реперфузионных повреждений при хирургических операциях и трансплантации органов, соответственно.



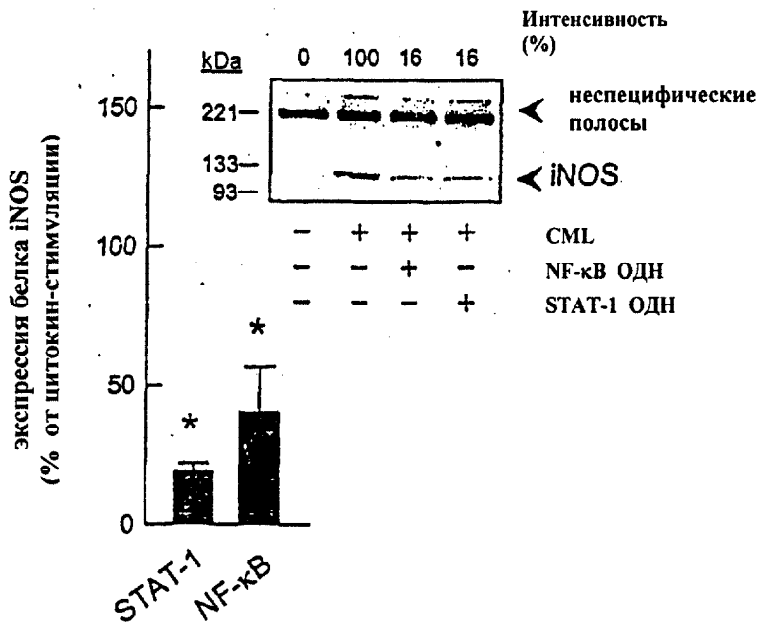
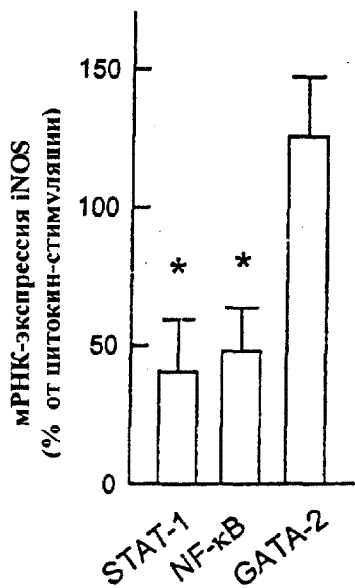
Фиг. 1



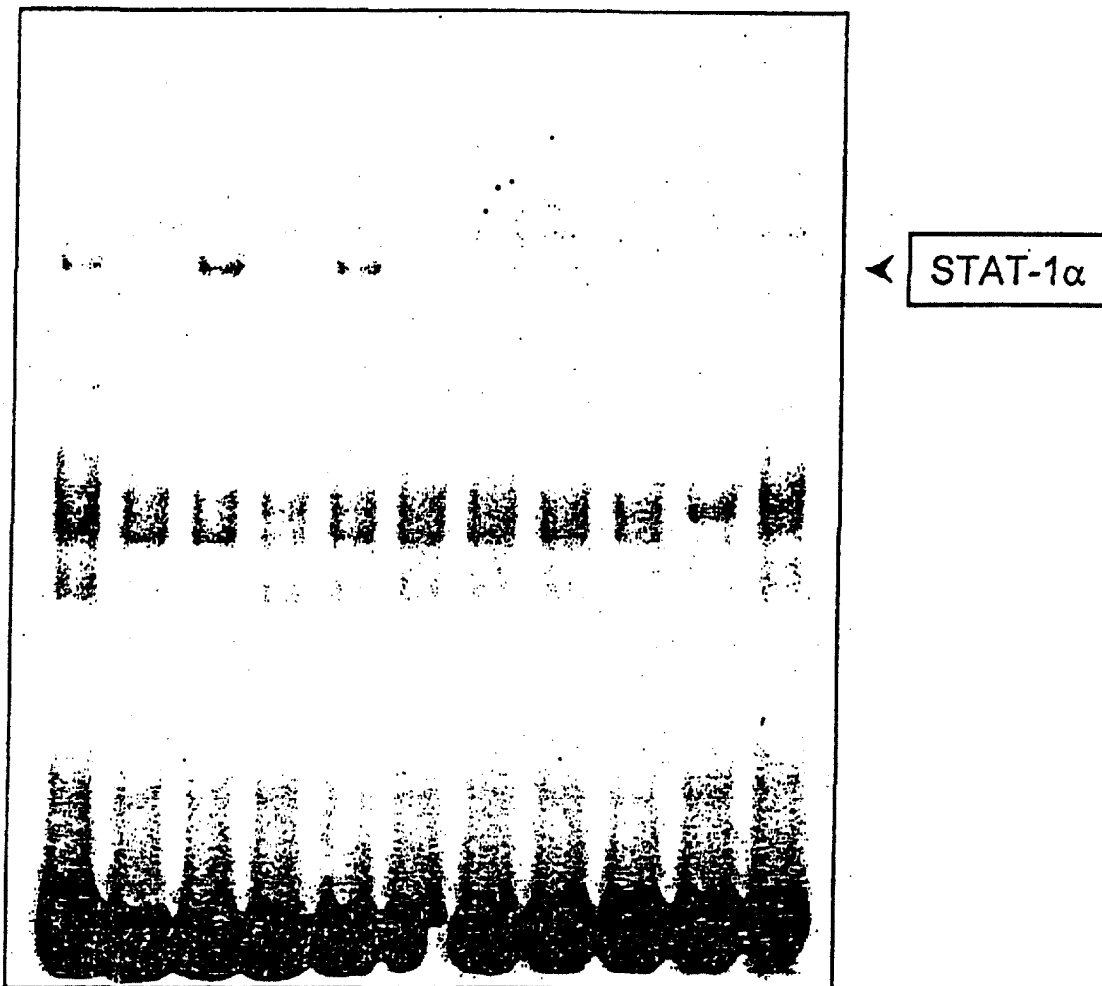
Фиг. 2



b

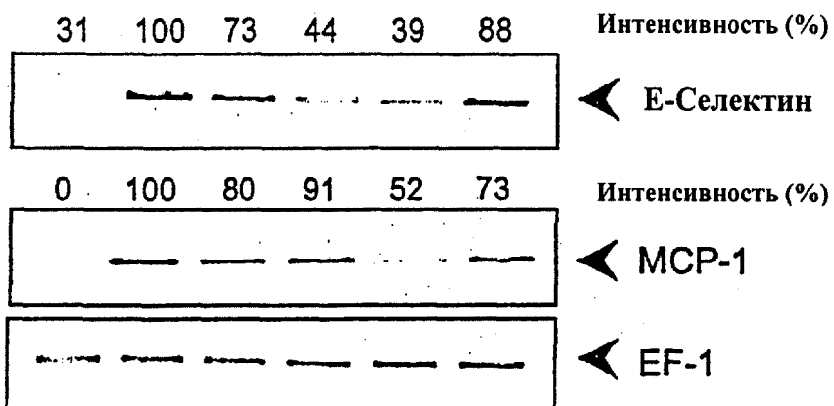


Фиг. 3



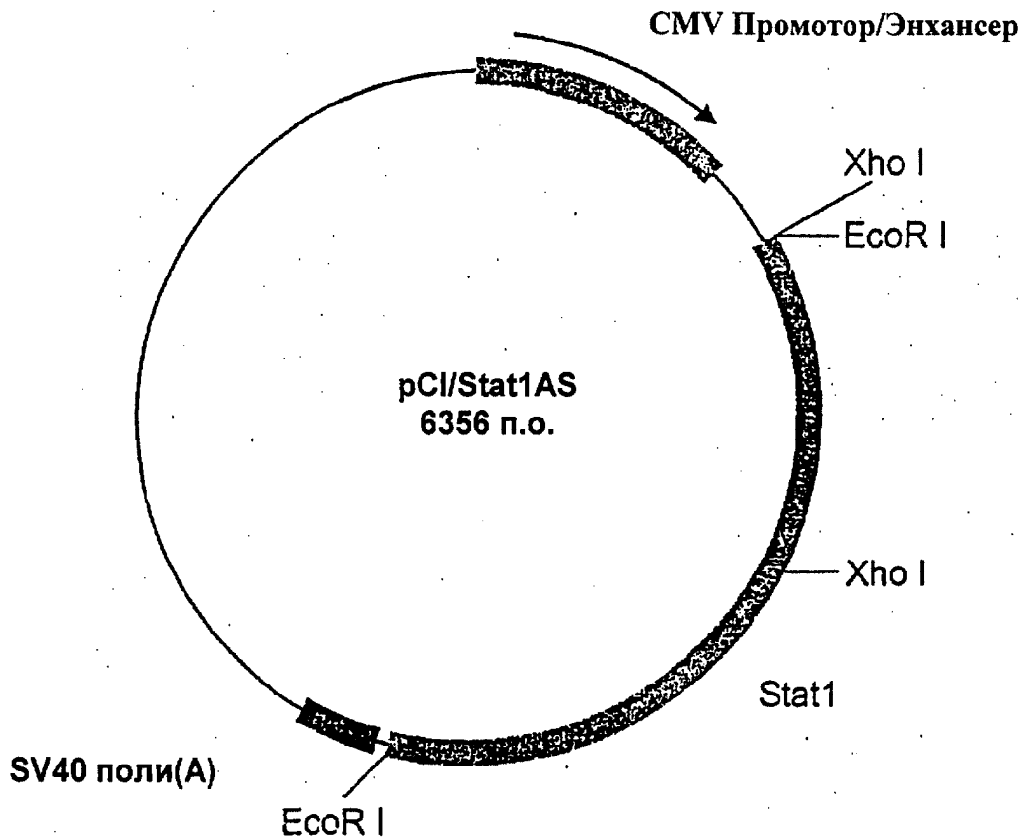
+ + + + + + + + + + ФНОα/ИФНγ
 - 33 - 25 39 37 29 35 17 31 SEQ ID NO:
 1-25mut 1-19mut

Фиг. 4

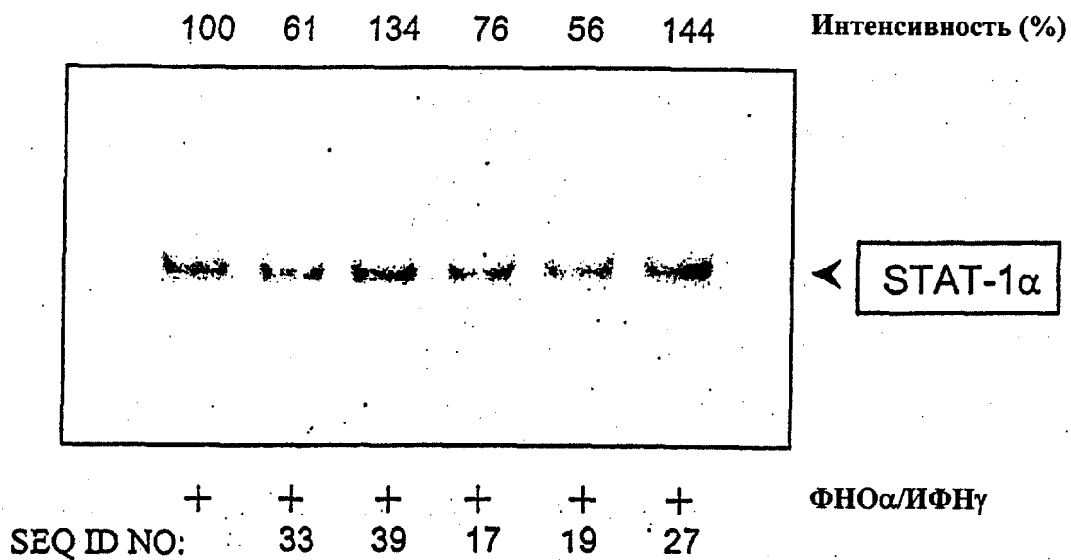


- + + + + ФНОα/ИФНγ
 37 35 17 31 STAT Ловушка SEQ ID NO

Фиг. 5



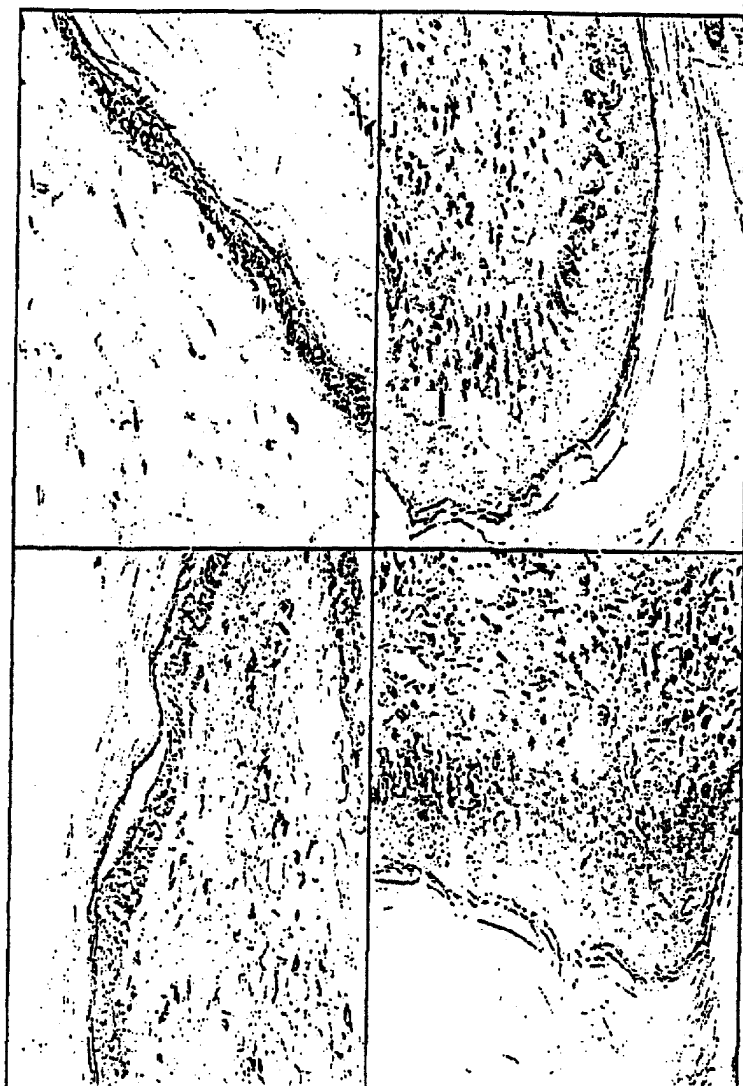
Фиг. 6



Фиг. 7

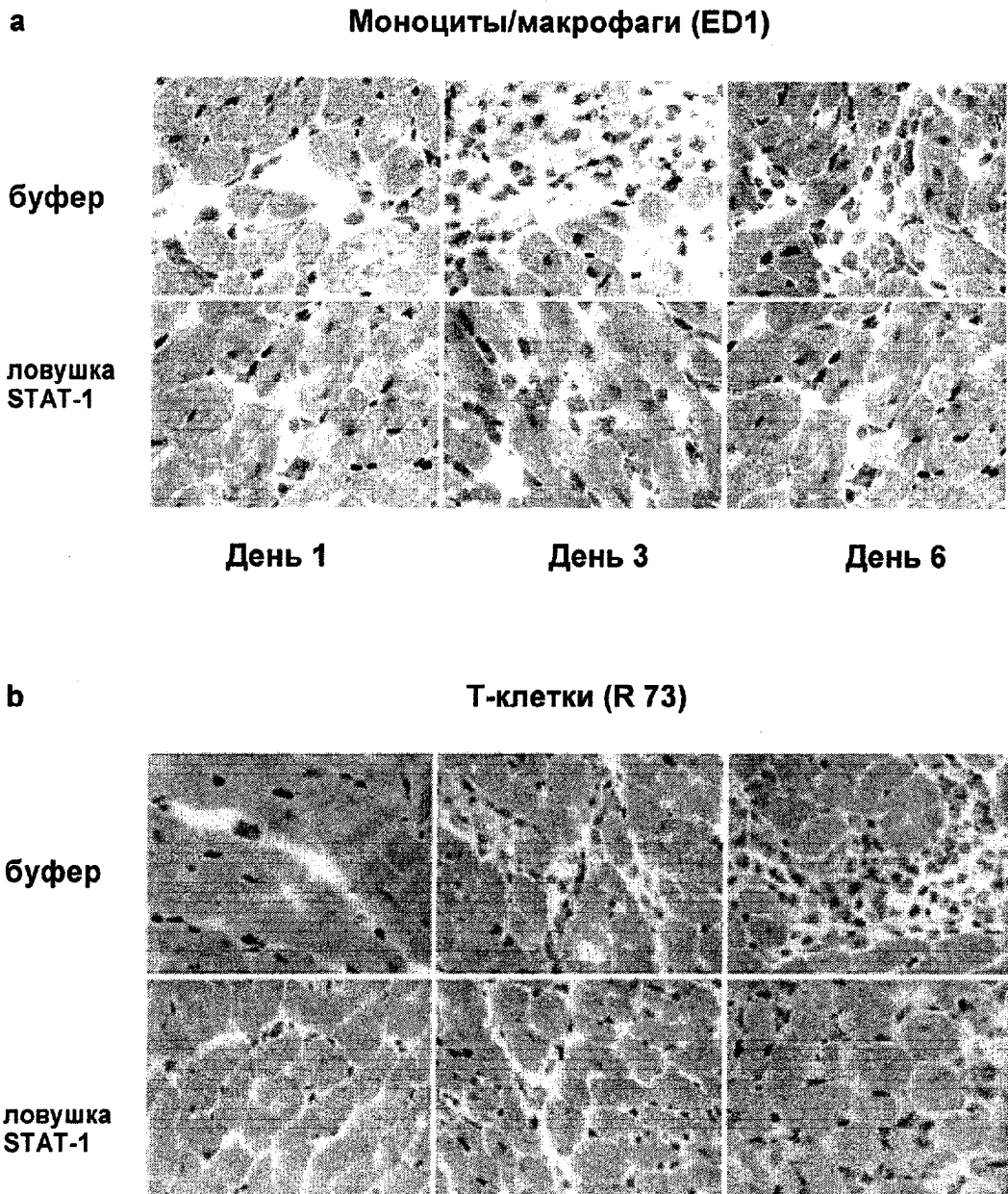
носитель

DNCB + STAT-1 mut



DNCB + STAT-1 конс DNCB

Фиг. 8

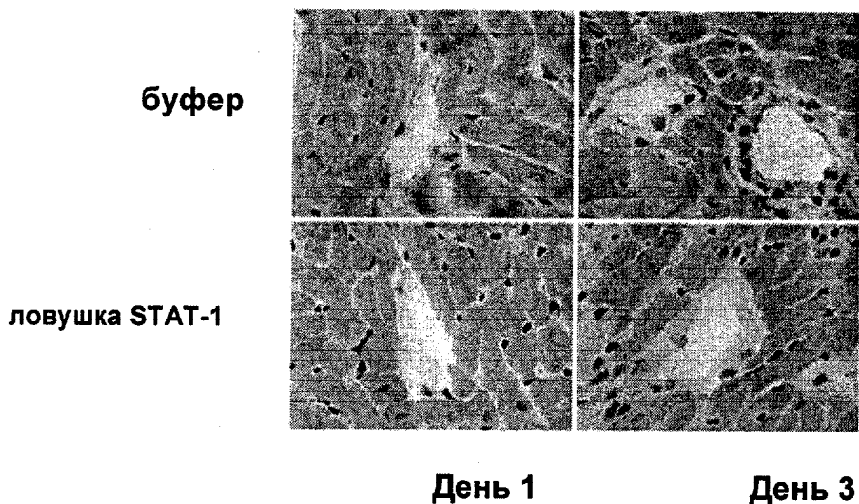


Иммуногистохимия в дни 1, 3 и 6 аллотрансплантатов в отношении ED-1-позитивных моноцитов и макрофагов (a) или R-73-позитивных Т-клеток (b), выявила значительно уменьшенное количество инфильтрующих клеток во всех временных точках для аллотрансплантатов, обработанных олигонуклеотидом-ловушкой STAT-1. Увеличение x400

Фиг.9

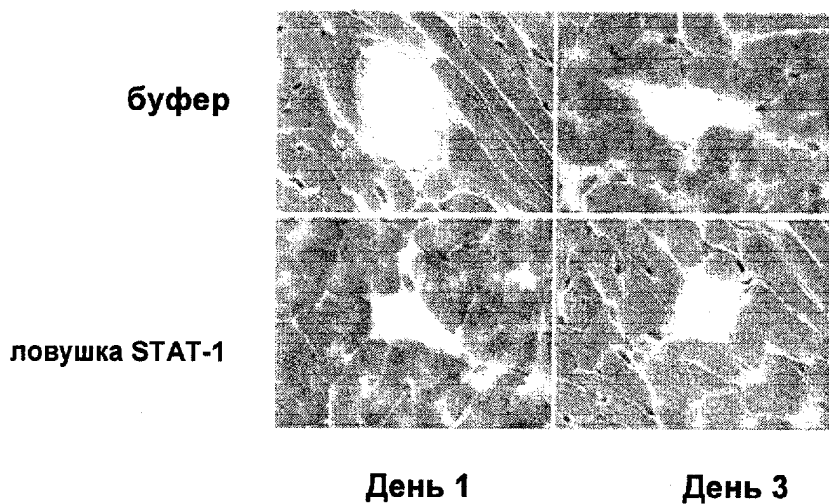
a

ICAM-1



b

VCAM-1



Присутствие ICAM-1 и VCAM-1 антигена. Иммуногистохимический анализ аллотрансплантатов в Дни 1 и 3 выявил значительное ослабление экспрессии ICAM-1 и VCAM-1 в сердечных аллотрансплантатах, обработанных олигонуклеотидом-ловушкой STAT-1. Увеличение x400

Фиг.10