

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202090857 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.09.01

(22) Дата подачи заявки
2018.10.05

(51) Int. Cl. C12N 9/12 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)
A61K 31/00 (2006.01)
A61K 31/437 (2006.01)
A61K 31/4418 (2006.01)
A61K 31/4439 (2006.01)
A61K 31/416 (2006.01)
A61K 31/496 (2006.01)
A61K 31/519 (2006.01)
A61K 31/53 (2006.01)
A61K 31/5377 (2006.01)
G01N 33/15 (2006.01)
A61P 21/00 (2006.01)

(54) ПРИМЕНЕНИЕ ИНГИБИТОРОВ p38 ДЛЯ СНИЖЕНИЯ ЭКСПРЕССИИ DUX4

(31) 62/568,673; 62/568,754; 62/682,565;
62/682,563

(32) 2017.10.05; 2017.10.05; 2018.06.08;
2018.06.08

(33) US

(86) PCT/US2018/054638

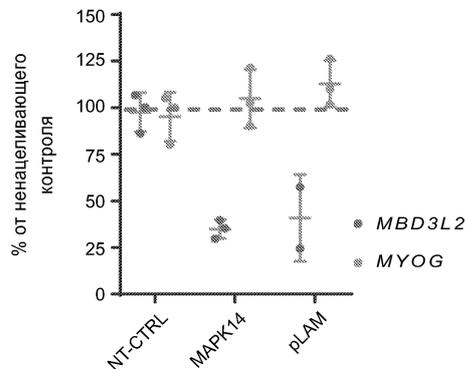
(87) WO 2019/071144 2019.04.11

(71) Заявитель:
ФУЛКРАМ ТЕРАПЬЮТИКС, ИНК.
(US)

(72) Изобретатель:
Какейс Анджела Мари, Рохас Сото
Луис Густаво Алехандро, Томпсон
Лорин А. III, Уоллес Оуэн Брендан,
Ронко Люсьен В., Шэнь Нин,
Робертсон Алан Скотт, Чан Аарон
Наквон (US)

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

(57) Настоящее изобретение относится к композициям и способам ингибирования киназы p38 для снижения экспрессии гена и белка DUX4 и последующих генов, регулируемых DUX4. Настоящее изобретение также относится к способам лечения пациентов, страдающих заболеваниями, ассоциированными с повышенной экспрессией DUX4 или экспрессией aberrантной формы DUX4, такими как плече-лопаточно-лицевая мышечная дистрофия (FSHD).



202090857 A1

202090857

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-562594EA/085

ПРИМЕНЕНИЕ ИНГИБИТОРОВ P38 ДЛЯ СНИЖЕНИЯ ЭКСПРЕССИИ DUX4

Перекрестные ссылки на родственные заявки

[0001] Настоящая заявка испрашивает приоритет по предварительной заявке на патент США №62/568673, поданной 5 октября 2017 г.; предварительной заявке на патент США №62/568754, поданной 5 октября 2017 г.; предварительной заявке на патент США №62/682563, поданной 8 июня 2018 г.; и предварительной заявке на патент США №62/682565, поданной 8 июня 2018 г.; содержание каждой из которых полностью включено в настоящий документ посредством ссылок.

Перечень последовательностей

[0002] Настоящая заявка включает перечень последовательностей, поданный в электронном виде в формате ASCII и включенный в настоящий документ полностью посредством ссылки. Указанная копия в формате ASCII, созданная 4 октября 2018 г., имеет название FULC_027_02WO_ST25.txt и размер 27 KB.

Область техники

[0003] Настоящее изобретение относится к композициям и способам ингибирования киназы p38 для снижения экспрессии гена и белка DUX4 и последующих генов, регулируемых DUX4. Настоящее изобретение также относится к способам лечения субъектов с заболеваниями и расстройствами, ассоциированными с повышенной экспрессией DUX4 или экспрессией aberrантной формы DUX4, такими как плече-лопаточно-лицевая мышечная дистрофия (FSHD).

Уровень техники

[0004] Мышечные дистрофии (МД) представляют собой группу из более чем 30 разных генетических заболеваний, характеризующихся прогрессирующей слабостью и дегенерацией скелетных мышц, контролирующих движения. Некоторые формы МД возникают в младенчестве или детстве, тогда как другие могут не появляться до среднего или старшего возраста. Различные МД-заболевания различаются распределением и степенью мышечной слабости (некоторые формы МД также поражают сердечную мышцу), возрастом начала, скоростью прогрессирования и паттерном наследования.

[0005] Плече-лопаточно-лицевая мышечная дистрофия (FSHD) представляет собой третью по распространенности форму мышечной дистрофии и поражает приблизительно 1 из 15 000 человек по всему миру. FSHD вызывают генетические мутации, которые приводят к эпигенетической дерепрессии гена DUX4, что делает указанное заболевание уникальным среди мышечных дистрофий. Первичные проявления FSHD представлены слабостью и потерей массы мышц лица, предплечья, плеча и туловища; в более тяжелых случаях заболевание затрагивает и нижние конечности.

[0006] Генетические мутации, ассоциированные с FSHD, приводят к частичному разуплотнению структуры хроматина D4Z4 и, в результате, к отсутствию репрессии DUX4, транскрипционного фактора, кодируемого единицей D4Z4, в скелетных мышцах.

FSHD1, составляющая приблизительно 95% описанных случаев FSHD, ассоциирована с делециями макросателлитных повторов D4Z4 в субтеломерной области хромосомы 4q35, где остается 1-10 повторов D4Z4 (описание приведено в источнике: Tawil et. al., 2014). FSHD2 вызывает мутации в гене содержащего гибкий шарнирный домен белка поддержания структуры хромосом 1 (SMCHD1) на хромосоме 18 (описание приведено в источнике: van der Maarel et. al., 2007). Обе мутации, FSHD1 и FSHD2, приводят к утрате репрессии в массиве повторов D4Z4 4q35, что позволяет aberrантную транскрипцию в мышцах полноразмерной формы «двойного гомеобокса 4», DUX4, мРНК (DUX4-fl), которая кодирует транскрипционный фактор «двойной гомеобокс 4» («Double homeobox 4», DUX4) (Tawil et. al., 2014). Изоформы РНК DUX4-fl которые, как было обнаружено, ассоциированы с FSHD, варьируют только в нетранслируемой 3' области и не имеют идентифицированных функциональных различий.

[0007] В настоящее время отсутствуют одобренные способы лечения, способные приостанавливать или обращать эффекты FSHD, хотя часто для повышения комфортности и мобильности прописывают нестероидные противовоспалительные лекарственные средства. Таким образом, очевидно, что в данной области техники имеется потребность в новых способах снижения уровней экспрессии DUX4, например, мРНК DUX4-fl и/или белка DUX4, например, для лечения FSHD и других заболеваний. Настоящее изобретение удовлетворяет указанную потребность.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

[0008] На фиг. 1А и 1В показана экспрессия РНК и белка DUX4 в пораженных FSHD мышечных трубочках. Фиг. 1А включает микрофотографии пораженных FSHD мышечных трубочек, окрашенных с применением антитела, которое связывает белок DUX4, и/или 4',6-диамидино-2-фенилиндола (DAPI; для детекции ядер). Зрелые пораженные FSHD мышечные трубочки демонстрировали актиновую исчерченность в культуре (не показано) и экспрессировали белок DUX4 в дискретных наборах ядер, содержащихся в дифференцированной мышечной трубочке (фиг. 1А). На фиг. 1В приведен график, отражающий относительную экспрессию мРНК DUX4 в пораженных FSHD мышечных трубочках и мышечных трубочках от изогенного контроля дикого типа (здоровых).

[0009] На фиг. 2 приведен график, отражающий экспрессию мРНК заданных регулируемых DUX4 генов в мышечных трубочках дикого типа, обработанных ДМСО, или пораженных FSHD мышечных трубочках, обработанных FTX-2 или ДМСО. Для каждого указанного гена столбцы, в направлении слева направо, относятся к мышечным трубочкам дикого типа, обработанным ДМСО, пораженным FSHD мышечным трубочкам, обработанным ДМСО, и пораженным FSHD мышечным трубочкам, обработанным FTX-2 (DUX4-нацеленный АСО).

[0010] На фиг. 3А-3С показано снижение уровня мРНК MBD3L2 в пораженных FSHD мышечных трубочках, обработанных DUX4-нацеленных АСО. MBD3L2 нормировали по мРНК POLR2A с применением кПЦР. На фиг. 3А приведен график,

отражающий сгруппированные по планшетам данные контроля качества со сравнением экспрессии MBD3L2 в пораженных FSHD мышечных трубочках, обработанных контролем - ДМСО или 1 мкМ DUX4-нацеленных АСО, и нормальных здоровых изогенных мышечных трубочках дикого типа (WT). На фиг. 3B приведен график, отражающий дозозависимое снижение экспрессии мРНК MBD3L2 в пораженных FSHD мышечных трубочках, обработанных DUX4-нацеленным АСО (FTX-2) в разных разведениях. На фиг. 3C приведена статистика анализа на планшетах со сравнением сигнала MBD3L2 в пораженных FSHD мышечных трубочках, обработанных ДМСО и DUX4-нацеленными АСО, и в мышечных трубочках дикого типа, обработанных ДМСО.

[0011] На фиг. 4A-4D приведены графики, отражающие уровни экспрессии мРНК MBD3L2 и мРНК MYOG в пораженных FSHD мышечных трубочках, обработанных заданными ингибиторами p38 α/β по сравнению с обработкой контролем - ДМСО. Ингибиторы p38 α/β включали SB 239063 (фиг. 4A), VX-702 (фиг. 4B), памапимод (фиг. 4C) и TAK-715 (фиг. 4D). Также приведены структуры указанных ингибиторов.

[0012] На фиг. 5A и 5B приведены данные для пораженных FSHD мышечных трубочек, обработанных памапимодом. На фиг. 5A приведен график, отражающий дозозависимое снижение уровня мРНК DUX4-fl (закрашенные кружки) и MBD3L2 мРНК (незакрашенные кружки). На фиг. 5B приведены микрофотографии пораженных FSHD мышечных трубочек, обработанных либо ДМСО, либо памапимодом.

[0013] На фиг. 6A-6C приведены графики, отражающие уровни мРНК MAPK14 (фиг. 6A) и MBD3L2 (фиг. 6B и фиг. 6C) в пораженных FSHD мышечных трубочках, обработанных миРНК, нацеленными на p38a MAPK14 (siMAPK14 85 и siMAPK14 86; фиг. 6A и фиг. 6B), или обработанных Cas9/огРНК РНП для киназы p38a (MAPK14 и DUX4 pLAM) (фиг. 6C), по сравнению с ненацеливающим контролем (NT CTRL). На фиг. 6C, для каждой обработки, приведенные в направлении слева направо результаты соответствуют MBD3L2 и MYOG, соответственно.

[0014] На фиг. 7 приведен график, отражающий уровни экспрессии белка DUX4, MBD3L2 мРНК, а также белка p-HSP27 в пораженных FSHD мышечных трубочках после обработки FTX-1821 в возрастающих дозировках (показана структура), как процент от уровней при обработке контролем - ДМСО. Планками обозначено стандартное отклонение.

[0015] На фиг. 8A и 8B показан эффект FTX-1821 на образование мышечных трубочек. На фиг. 8A приведены репрезентативные изображения морфологии иммортализованных пораженных FSHD мышечных трубочек, полученных после обработки основой (ДМСО) или FTX-1821 в заданных концентрациях, и окрашивания антителами против МНС и DAPI (окрашивание ядер). На фиг. 8B приведен график, отражающий количественное определение ядер в мышечных трубочках по результатам окрашивания МНС, после обработки FTX-1821 в протестированных концентрациях. Планками обозначено стандартное отклонение для трех повторностей.

[0016] На фиг. 9A и 9B представлены результаты анализов апоптоза в пораженных

FSHD мышечных трубочках *in vitro*. На фиг. 9А приведены микрофотографии пораженных FSHD мышечных трубочек, окрашенных на активную каспазу-3 (в качестве маркера апоптоза) или окрашенных DAPI. Апоптоз детектировали спорадически в подгруппе мышечных трубочек в культуре, что отмечено белыми кружками на левой панели и на увеличенной области справа. На фиг. 9В приведен график, отражающий количественное определение сигнала активной каспазы-3 в пораженных FSHD мышечных трубочках, обработанных FTX 1821 в указанных концентрациях.

[0017] Фиг. 10А и 10В иллюстрируют идентификацию генов, понижающая регуляция которых происходит в пораженных FSHD мышечных трубочках, с применением FTX-1821. На фиг. 10А приведена тепловая карта, иллюстрирующая дифференциально экспрессируемые гены, идентифицированные путем профилирования с применением РНК-секвенирования. Каждое условие анализировали в трех повторностях с применением РНК-секвенирования, и гены кластеризовали по направлению и интенсивности изменения согласно указанному. Цветным столбцом обозначены наблюдаемые нормированные различия, например, генами, понижающую регуляцию которых обеспечивал FTX-1821, обогащены образцы, обработанные только ДМСО. Гены, подвергающиеся понижающей регуляции, перечислены на фиг. 10А. На фиг. 10В приведен график, отражающий нормированный уровень экспрессии ридов целевых генов DUX4, понижающая регуляция которых происходит при обработке FTX-1821, в клетках дикого типа, обработанных контролем - основой ДМСО, пораженных FSHD клетках, обработанных ДМСО, или пораженных FSHD клетках, обработанных FTX-1821.

[0018] На фиг. 11 приведен график, отражающий уровни экспрессии мРНК по оценке с применением ОТ-кПЦР целевого гена DUX4, MBD3L2 (нормированной по POLR2A), в мышечных трубочках, происходящих из четырех различных линий миобластов от пациентов с FSHD, FTCE-016, -020, -197, -196, и двух контрольных линий дикого типа (WT), после указанной обработки, контролем - основой ДМСО, FTX-1821 или FTX-839.

[0019] На фиг. 12А и 12В приведена информация о различных ингибиторах p38. На фиг. 12А приведена таблица данных с обобщенными фармакологическими данными для указанных ингибиторов p38 α и p38 β , в том числе IC₅₀ для уменьшения экспрессии MBD3L2 в пораженных FSHD клетках. Приведены сопоставимые значения IC₅₀ для MBD3L2, указывающие на ингибирование экспрессии последующих относительно DUX4 генов в пораженных FSHD мышечных трубочках панелью ингибиторов p38 α и p38 β разнообразной структуры, по сообщениям, обладающим аналогичной ферментной мощностью. Данные показывают, что ингибирование p38 приводит к снижению уровней целевого гена DUX4, MBD3L2, со значениями IC₅₀ в диапазоне ~6-68 нМ. На фиг. 12В приведены структуры соединений ингибиторов p38, перечисленных на фиг. 12А.

[0020] На фиг. 13 приведена таблица с перечислением различных линий клеток, используемых в «клиническом испытании в сосуде» («CSID»), отражающая разнообразие генотипов и включающая как первичные, так и иммортализованные линии, а также линии,

полученные от пациентов с FSHD1 и FSHD2.

[0021] На фиг. 14А и 14В приведены графики, отражающие экспрессию мРНК MBD3L2, нормированную по POLR2A (с применением ОТ-кПЦР) (фиг. 14А), и апоптоз на основании уровней расщепленной каспазы-3 (фиг. 14В), определенных в мышечных трубочках от девяти пациентов с FSHD1 и трех пациентов с FSHD2 (перечислены в таблице 2, фиг. 14В включает только 2 линии клеток FSHD2) после обработки FTX-1821, FTX-839 или контролем - основой ДМСО.

[0022] На фиг. 15 приведен график, отражающий временную динамику экспозиции в плазме, экспозиции в трапециевидных мышцах и вовлечения мишени p38 (отношение фосфорилированная p38 α : общая p38 α) у крыс после перорального введения 0,3 мг/кг FTX-1821.

[0023] На фиг. 16 приведен график, отражающий уровни мРНК MBD3L2 в ТА-мышцах с ксенотрансплантированными А4 и С6.

[0024] На фиг. 17 приведен график, отражающий отношение фосфорилированной/общей MC2 в трапециевидных мышцах мышей после обработки контролем - основой или ингибитором p38, FTX-2865.

[0025] На фиг. 18 приведен график, отражающий уровни мРНК MBD3L2 в ТА-мышцах с ксенотрансплантированными С6 после обработки контролем - основой или ингибитором p38, FTX-2865.

Краткое описание изобретения

[0026] Согласно настоящему изобретению предложены способы снижения экспрессии мРНК DUX4-fl, полипептида DUX4 или полипептида, кодируемого последующим целевым геном DUX4, в клетках, включающий приведение указанных клеток в контакт с агентом, который обеспечивает снижение уровня активного белка p38 в клетке, со снижением таким образом экспрессии полипептида DUX4 или полипептида, кодируемого последующим целевым геном DUX4. Указанные способы могут быть реализованы с применением ряда разных типов агентов для модуляции ряда разных биологических процессов в клетке, а также для лечения у субъектов заболеваний, ассоциированных с aberrантной экспрессией DUX4, таких как FSHD.

[0027] Согласно определенным вариантам реализации любых способов, описанных в настоящем документе, указанная клетка представляет собой мышечную клетку, необязательно, терминально дифференцированную мышечную клетку. Согласно некоторым вариантам реализации указанная клетка отличается повышенным уровнем экспрессии мРНК DUX4-fl, полипептида DUX4 или полипептида, кодируемого последующим целевым геном, по сравнению с уровнем экспрессии мРНК DUX4-fl, полипептида DUX4 или полипептида, кодируемого последующим целевым геном, в контрольной клетке, например, в клетке, полученной от здорового субъекта. Согласно некоторым вариантам реализации указанный повышенный уровень экспрессии мРНК DUX4-fl, полипептида DUX4 или полипептида, кодируемого последующим целевым геном, обусловлен сниженной репрессией в локусе D4Z4 в клетке. Согласно некоторым

вариантам реализации указанная клетка ассоциирована с плече-лопаточно-лицевой мышечной дистрофией (FSHD), например, получена от субъекта, у которого диагностирована FSHD, или присутствует у субъекта, у которого диагностирована FSHD. Согласно некоторым вариантам реализации указанная клетка содержит делецию одного или более макросателлитных повторов D4Z4 в субтеломерной области хромосомы 4q35, необязательно при этом указанная клетка содержит ≤ 7 макросателлитных повторов D4Z4 в субтеломерной области хромосомы 4q35. Согласно некоторым вариантам реализации указанная клетка содержит одну или более мутаций в гене *содержащего гибкий шарнирный домен белка поддержания структуры хромосом 1 (SMCHD1)*. Согласно некоторым вариантам реализации указанная клетка содержит по меньшей мере один неделетированный аллель 4qA.

[0028] Согласно определенным вариантам реализации способов, описанных в настоящем документе, указанный агент ингибирует экспрессию или активность, или уменьшает количество белка p38, причем указанная активность необязательно представляет собой киназную активность.

[0029] Согласно некоторым вариантам реализации указанный агент ингибирует экспрессию белка p38. Согласно конкретным вариантам реализации указанный агент связывает полинуклеотид, кодирующий указанный белок p38, или связывает его антисмысловой полинуклеотид. Согласно конкретным вариантам реализации указанный агент содержит нуклеиновую кислоту или состоит из нуклеиновой кислоты, которая необязательно представляет собой ДНК, РНК, гРНК, мшРНК, миРНК или антисмысловой олигонуклеотид.

[0030] Согласно некоторым вариантам реализации указанный агент ингибирует активность белка p38. Согласно конкретным вариантам реализации указанный агент связывает белок p38. Согласно конкретным вариантам реализации указанный агент содержит полипептид или состоит из полипептида, необязательно, белка, пептида, миметика белка, пептидомиметика, или антитела или его функционального фрагмента. Согласно некоторым вариантам реализации указанный агент содержит малую молекулу, необязательно, малую органическую молекулу или малую неорганическую молекулу.

[0031] Согласно определенным вариантам реализации любых способов, описанных в настоящем документе, последующий целевой ген представляет собой RFPL2, CCNA1, SLC34A2, TPRX1, KHDC1L, ZSCAN4, PRAMEF20, TRIM49, PRAMEF4, PRAME6, PRAMEF15 или ZNF280A.

[0032] Согласно конкретным вариантам реализации любых способов, описанных в настоящем документе, экспрессия или активность белка p38, или количество белка p38 снижается по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100%.

[0033] Согласно родственному варианту реализации настоящего изобретения

предложен способ лечения или предотвращения заболевания или расстройства, ассоциированного с повышенной экспрессией мРНК DUX4-fl, белка DUX4 или полипептида, кодируемого последующим целевым геном DUX4, у нуждающегося в этом субъекта, включающий обеспечение субъекта фармацевтической композицией, содержащей агент, который обеспечивает снижение количества активного белка p38 в одной или более тканях указанного субъекта, со снижением таким образом экспрессии мРНК DUX4-fl, белка DUX4 или полипептида, кодирующего последующий целевой ген в одной или более тканях указанного субъекта. Согласно некоторым вариантам реализации указанное заболевание или расстройство представляет собой плече-лопаточно-лицевую мышечную дистрофию (FSHD), необязательно FSHD1 или FSHD2. Согласно некоторым вариантам реализации у указанного субъекта снижена репрессия в локусе D4Z4. Согласно некоторым вариантам реализации у указанного субъекта имеется делеция одного или более макросателлитных повторов D4Z4 в субтеломерной области хромосомы 4q35, необязательно при этом указанная клетка содержит ≤ 7 макросателлитных повторов D4Z4 в субтеломерной области хромосомы 4q35. Согласно некоторым вариантам реализации у указанного субъекта имеется одна или более мутаций в гене *содержащего гибкий шарнирный домен белка поддержания структуры хромосом 1 (SMCHD1)*. Согласно некоторым вариантам реализации у указанного субъекта имеется по меньшей мере один неделементированный аллель 4qA. Согласно некоторым вариантам реализации указанные экспрессия или активность, или количество белка p38 снижается по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% в мышечной ткани указанного субъекта. Согласно некоторым вариантам реализации указанный способ уменьшает мышечную дегенерацию у субъекта. Согласно некоторым вариантам реализации указанный способ уменьшает апоптоз мышечных клеток у субъекта. Согласно некоторым вариантам реализации указанная мышечная ткань является терминально дифференцированной. Согласно конкретным вариантам реализации указанную фармацевтическую композицию вводят субъекту парентерально или перорально. Согласно некоторым вариантам реализации указанную фармацевтическую композицию вводят в мышечную ткань субъекта, необязательно, парентерально или внутримышечно. Согласно конкретным вариантам реализации указанный способ дополнительно включает введение субъекту второго агента или терапии для лечения указанного заболевания или расстройства, ассоциированного с повышенной экспрессией белка DUX4 или полипептида, кодируемого последующим целевым геном DUX4.

[0034] Согласно настоящему изобретению также предложена единичная лекарственная форма фармацевтической композиции, содержащая агент, который обеспечивает снижение количества активного белка p38 в клетке, и фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или эксципиент, причем указанная единичная

лекарственная форма эффективна для снижения экспрессии или активности мРНК DUX4-fl, полипептида DUX4 или полипептида, кодируемого последующим целевым геном DUX4, в одной или более клетке или ткани у субъекта, которому вводят указанную единичную лекарственную форму. Согласно конкретным вариантам реализации указанный агент связывает полипептид DUX4 или связывает полинуклеотид, кодирующий указанный полипептид DUX4. Согласно некоторым вариантам реализации указанный агент содержит нуклеиновую кислоту или состоит из нуклеиновой кислоты, которая необязательно представляет собой ДНК, РНК, гРНК, мшРНК, миРНК или антисмысловой олигонуклеотид. Согласно некоторым вариантам реализации указанный агент содержит полипептид или состоит из полипептида, необязательно, белка, пептида, миметика белка, пептидомиметика, или антитела или его функционального фрагмента. Согласно некоторым вариантам реализации указанный агент содержит малую молекулу, необязательно, органическую молекулу или неорганическую молекулу. Согласно некоторым вариантам реализации указанная ткань представляет собой мышечную ткань, причем указанная ткань содержит клетки, содержащие мутацию, ассоциированную с плече-лопаточно-лицевой мышечной дистрофией (FSHD).

[0035] Согласно дополнительному родственному варианту реализации настоящего изобретения предложен способ уменьшения апоптоза клетки, например, мышечной клетки, включающий приведение указанной клетки в контакт с агентом, который обеспечивает снижение количества активного белка p38 в указанной клетке, при этом указанная мышечная клетка необязательно является терминально дифференцированной, со снижением таким образом экспрессии мРНК DUX4-fl, белка DUX4 или полипептида, кодируемого последующим целевым геном DUX4, в клетке. Согласно некоторым вариантам реализации указанная клетка отличается повышенным уровнем экспрессии мРНК DUX4-fl, полипептида DUX4 или полипептида, кодируемого последующим целевым геном, по сравнению с уровнем экспрессии указанного полипептида DUX4 или полипептида, кодируемого последующим целевым геном, в контрольной клетке. Согласно некоторым вариантам реализации указанный повышенный уровень экспрессии мРНК DUX4-fl, полипептида DUX4 или полипептида, кодируемого последующим целевым геном, обусловлен сниженной репрессией в локусе D4Z4 в клетке. Согласно конкретным вариантам реализации указанная клетка содержит одну или более мутаций, ассоциированных с FSHD. Согласно некоторым вариантам реализации указанный агент ингибирует экспрессию белка p38, при этом необязательно указанный агент связывает полинуклеотид, кодирующий указанный белок p38, или его антисмысловой полинуклеотид. Например, согласно некоторым вариантам реализации указанный агент содержит нуклеиновую кислоту или состоит из нуклеиновой кислоты, которая необязательно представляет собой ДНК, РНК, мшРНК, миРНК или антисмысловой олигонуклеотид, например, нацеленную на p38. Согласно некоторым вариантам реализации указанный агент ингибирует активность белка p38, при этом указанный агент необязательно связывает белок p38. Согласно некоторым вариантам реализации

указанный агент содержит полипептид или состоит из полипептида, необязательно, белка, пептида, миметика белка, пептидомиметика, или антитела или его функционального фрагмента. Согласно некоторым вариантам реализации указанный агент содержит малую молекулу, необязательно, малую органическую молекулу или малую неорганическую молекулу. Согласно конкретным вариантам реализации экспрессия или активность белка p38, белка DUX4 или полипептида, кодируемого последующим относительно DUX4 геном, снижается по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100%. Согласно конкретным вариантам реализации указанный способ уменьшает апоптоз мышечных клеток в мышечной ткани по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% по сравнению с контролем, например, с необработанной клеткой.

[0036] Согласно определенным вариантам реализации любых способов, описанных в настоящем документе, указанный агент снижает экспрессию DUX4 или последующего целевого гена. Согласно некоторым вариантам реализации указанный агент связывает белок p38, например, p38- α или p38- β или полинуклеотид, кодирующий указанный белок p38, например, p38- α или p38- β , или его антисмысловой полинуклеотид. Согласно конкретным вариантам реализации указанный агент содержит нуклеиновую кислоту или состоит из нуклеиновой кислоты, которая необязательно представляет собой ДНК, РНК, мшРНК, миРНК, CRISPR-гРНК или антисмысловой олигонуклеотид. Согласно конкретным вариантам реализации указанный агент содержит полипептид или состоит из полипептида, необязательно, белка, пептида, миметика белка, пептидомиметика, или антитела или его функционального фрагмента. Согласно конкретным вариантам реализации указанный агент содержит: малую молекулу, необязательно, органическую молекулу или неорганическую молекулу. Согласно некоторым вариантам реализации указанный последующий целевой ген представляет собой RFPL2, CCNA1, SLC34A2, TPRX1, KHDC1L, ZSCAN4, PRAMEF20, TRIM49, PRAMEF4, PRAME6, PRAMEF15 или ZNF280A. Согласно конкретным вариантам реализации указанный последующий целевой ген представляет собой MBD3L2, ZSCAN4, LEUTX, PRAMEF2, TRIM43 или KHDC1L.

[0037] Согласно определенным вариантам реализации любых способов, описанных в настоящем документе, указанный агент связывает белок p38, например, p38- α или p38- β , или связывает полинуклеотид, кодирующий белок p38, например, p38- α или p38- β . Согласно некоторым вариантам реализации указанный агент содержит нуклеиновую кислоту или состоит из нуклеиновой кислоты, которая необязательно представляет собой ДНК, РНК, мшРНК, миРНК, мРНК, CRISPR-гРНК, модифицированную мРНК, морфолиновый или антисмысловой олигонуклеотид. Согласно некоторым вариантам

реализации указанная мРНК или модифицированная мРНК кодирует антитело или его функциональный фрагмент. Согласно некоторым вариантам реализации указанный агент содержит полипептид или состоит из полипептида, необязательно, белка, пептида, миметика белка, пептидомиметика, или антитела или его функционального фрагмента. Согласно некоторым вариантам реализации указанный агент содержит вектор для генной терапии или состоит из вектора для генной терапии, например, вирусного вектора, содержащего последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую полинуклеотидный или полипептидный ингибитор p38, например, p38- α или p38- β или другой мишени. Согласно некоторым вариантам реализации указанный агент содержит малую молекулу или состоит из малой молекулы, которая необязательно представляет собой органическую молекулу или неорганическую молекулу. Согласно некоторым вариантам реализации указанная последующая мишень представляет собой RFPL2, CCNA1, SLC34A2, TPRX1, KHDC1L, ZSCAN4, PRAMEF20, TRIM49, PRAMEF4, PRAME6, PRAMEF15 или ZNF280A. Согласно некоторым вариантам реализации указанный последующий целевой ген представляет собой MBD3L2, ZSCAN4, LEUTX, PRAMEF2, TRIM43, или KHDC1L. Согласно некоторым вариантам реализации указанный последующий целевой ген представляет собой CCNA1.

Подробное описание изобретения

[0038] Настоящее изобретение основано отчасти на открытии того, что ингибирование киназы p38, например, p38- α , приводит к снижению экспрессии DUX4 и последующих генов, регулируемых DUX4. Соответственно, настоящее изобретение включает способы и композиции, связанные с применением ингибитора p38, например, p38- α (по отдельности или в комбинации с другим агентом), для снижения уровней экспрессии и/или активности DUX4 и/или любого из его последующих целевых генов, например, при лечении или предотвращении заболеваний, ассоциированных с aberrантной экспрессией DUX4, таких как FSHD, тип мышечной дистрофии. Это может быть осуществлено различными способами, например, путем снижения экспрессии мРНК DUX4-fl, снижения экспрессии белка DUX4, ингибирования активности белка DUX4; редактирования генома с использованием CRISPR и/или индукции разложения белка DUX4.

[0039] Мышечные дистрофии представляют собой разнородную группу генетических заболеваний, вызывающих прогрессирующую слабость мышц тела. При некоторых типах мышечной дистрофии симптомы проявляются в раннем детстве, тогда как другие появляются во взрослом возрасте. Также в зависимости от типа мышечной дистрофии могут быть поражены разные группы мышц. См., например, информацию у Isin Dalkilic и Louis M Kunkel. Известно, что почти 30 генов обуславливают различные формы мышечной дистрофии, различающиеся возрастом возникновения, тяжестью и поражаемыми группами мышц. Количество идентифицированных генов увеличивается ежегодно, улучшая наше понимание, а также выявляя общую сложность патогенеза указанных заболеваний.

[0040] Например, два распространенных вида мышечной дистрофии - мышечная дистрофия Дюшенна (DMD) и плече-лопаточно-лицевая дистрофия (FSHD) - считают уникальными заболеваниями с некоторыми общими характеристиками. Сходство DMD и FSHD включает то, что оба заболевания являются генетическими, а симптомы включают дистрофию мышечной ткани при мышечной слабости, ведущей к инвалидности (соответственно, и DMD, и FSHD относят к большой категории мышечных дистрофий, которые подразумевают дегенерацию мышц). Однако DMD и FSHD сильно различаются в отношении этиологии и диагностики заболевания (утрата дистрофина при DMD и экспрессия DUX4-миотоксина при FSHD). Например, при DMD мутации в гене DMD (известно более 2000 мутаций) приводят к дисфункции или отсутствию дистрофина. При FSHD заболевание обусловлено избыточной экспрессией гена DUX4 в мышечной ткани; это не связано с точечными мутациями в гене (белок DUX4 экспрессируется, когда число повторов D4Z4 в гене DUX4 составляет от 1 до 8, или если утрачена репрессия в D4Z4 за счет мутаций других механизмов сайленсинга). Другие различия включают то, что в FSHD вовлечены только скелетные мышцы, тогда как при DMD поражаются и скелетные мышцы, и сердечная мышца; диафрагма вовлечена в DMD, но не в FSHD; начало DMD, как правило, приходится на детский возраст, а начало FSHD - на взрослый и подростковый возраст; DMD свойственно начало с вовлечением двигательной функции, а FSHD - с вовлечением лица и проксимальной части предплечья/плеч. Другое важное различие заключается в том, что на стероиды есть ответ при DMD, но не при FSHD. Кроме того, одобренное лечение DMD (Экзондис-51 в США; Аталурен в ЕС) не оказывает никакого действия при FSHD. Наконец, DMD страдают только мужчины, тогда как FSHD в равной степени затрагивает оба пола.

[0041] Кроме того, патология при FSHD необычна и уникальна среди мышечных дистрофий тем, что для ее развития требуются как генетические, так и эпигенетические условия. Генетическим условием является присутствие полного гена DUX4. Ген DUX4 представляет собой ретроду, обычно экспрессируемый в зародышевой линии и в ранних эмбриональных клетках, однако он репрессирован за счет D4Z4 повтор-индуцированного сайленсинга во взрослых тканях (Ehrlich and Lacey, 2012). Каждый элемент D4Z4 содержит промотор и ORF DUX4, однако в нем отсутствует сигнал полиаденилирования (PAS), что приводит к быстрому разложению мРНК DUX4. Напротив, транскрипты, инициированные в дистальной единице D4Z4 на пермиссивном аллеле 4qA, выходят за пределы массива повторов и достигают PAS во фланкирующей последовательности рLAM (описание приведено в источнике: Tawil et al., 2014; Himeda et al., 2015). Итоговый поли(А)-«хвост» стабилизирует мРНК DUX4 и позволяет им транслироваться в белок, в норме не экспрессируемый в здоровых мышцах и токсичный для функции скелетных мышц. Была описана регуляция двумя энхансерами, миогенным энхансером DUX4 1 (DME1) и DME2, которые активируют экспрессию DUX4-fl в скелетных миоцитах, экспрессии DUX4-fl при FSHD (Himeda et al., 2014).

[0042] FSHD1, FSHD2 и стадии раннего развития, а также стадии формирования

зародышевой линии, по-видимому, придают транскрипционно-пермиссивную конформацию хроматину D4Z4. На это указывают изменения модификации гистонов, частичное, но варьируемое гипометилирование D4Z4 при FSHD1, и более обширное гипометилирование при FSHD2 (Himeda et al., 2015). Однако гипометилирование D4Z4 не является достаточным условием для развития этого заболевания, поскольку симптомы мышечной дистрофии отсутствуют у пациентов с ICF (иммунодефицит, нестабильность центромерных областей хромосом и лицевые аномалии), редким, не родственным ассоциированным с гипометилированием ДНК заболеванием, при котором D4Z4 выраженно гипометилирован (номер в OMIM: 614069).

[0043] DUX4 представляет собой гомеобоксный белок - транскрипционный фактор, и экспрессия DUX4 в мышцах индуцирует транскрипционную программу, которая приводит к экспрессии последующих генов и белковых продуктов, в норме не экспрессируемых в скелетных мышцах. Например, экспрессия DUX4 приводит к индукции нескольких генов зародышевой линии в пораженных FSHD скелетных мышцах и в трансфицированных клетках (Yao et al., 2014; Ehrlich and Lacey, 2012). Многие из указанных новых транскриптов экспрессируются в пораженных FSHD мышечных клетках, но не в контрольных мышечных клетках (Yao et al., 2014; Homma et al., 2015; Shadle et al., 2017; Bosnakovski et al., 2014). Поскольку некоторые из последующих целевых генов DUX4 кодируют транскрипционные факторы, патологическая активация DUX4 приводит к каскаду значительной разрегуляции геной экспрессии в мышцах, что вызывает заболевание (Yao et al., 2014; Homma et al., 2015; Shadle et al., 2017; Bosnakovski et al., 2014).

[0044] Эндогенная (в пораженном FSHD мышечном волокне) и принудительная экспрессия DUX4 в мышечных клетках в мышечных клетках является токсичной, приводит к апоптозу и окислительному стрессу, и нарушает миогенез и функцию саркомеров (Rickard et al., 2015; Homma et al., 2015; Bosnakovski et al., 2014; Tawil et al., 2014; Himeda et al., 2015). Клиническая гетерогенность как прогрессирования заболевания, так и возраста его начала может отчасти объясняться эпигенетической нестабильностью, приводящей к прогрессирующим изменениям в транскрипции DUX4. Роль гипометилирования ДНК и пермиссивной транскрипции DUX4 подтверждает значительная клиническая тяжесть, наблюдаемая у пациентов, наследующих сочетанные дефекты FSHD1 и 2 (описание приведено в источнике: Tawil et al., 2014; van der Maarel et al., 2007). Клиническая гетерогенность также объясняется различиями в тяжести укорочения повторов D4Z4, причем более тяжелый фенотип и более ранний возраст начала наблюдается у пациентов с более короткими повторами (1-3) по сравнению с пациентами с менее выраженным сокращением повторов (4-7).

[0045] DUX4 в настоящее время признан причиной патологии при FSHD, поскольку активация его целевых генов является главной молекулярной сигнатурой в мышцах, пораженных FSHD (описание приведено в источнике: Tawil et al., 2014; Himeda et al., 2015). Основные последующие целевые гены являются представителями семейств

высокогомологичных генов, которые пространственно кластеризованы на хромосомах, в том числе семейств PRAMEF (преимущественно экспрессируются в меланоме), TRIM (содержащие трехчастный мотив), MBDL (подобный метил-CpG-связывающему белку), ZSCAN (содержащий домен с цинковыми пальцами и SCAN) и RFPL («Ret Finger Protein-Like») (Geng et al., 2012; Yao et al., 2014; Shadle et al., 2017; Ehrlich and Lacey, 2012; Tawil et al., 2014; van der Maarel et al., 2007). Различить пораженные FSHD и контрольные скелетные мышцы можно с использованием ZSCAN4, LEUTX, PRAMEF2, TRIM43, MBD3L2, KHDC1L, RFPL2, CCNA1, SLC34A2, TPRX1, PRAMEF20, TRIM49, PRAMEF4, PRAME6, PRAMEF15, ZNF280A и т.п. (см. описания, например, но не ограничиваясь перечисленными, в источниках: Yao et al., 2014; Shadle et al., 2017; Ehrlich and Lacey, 2012).

[0046] Проводился скрининг аннотированных химических зондов на наличие модифицирующих заболевание низкомолекулярных целевых лекарственных средств, которые снижают экспрессию DUX4 в пораженных FSHD мышечных трубочках. Указанный скрининг идентифицировал несколько химических скаффолдов, которые ингибируют активность митоген-активируемой протеинкиназы p38 альфа (MAPK14, или p38 α). Как описано в приведенных примерах, было показано, что нокдаун гена MAPK14 с применением технологии малых интерферирующих РНК (миРНК) или опосредованного CRISPR редактирования генома со специфическими гидовыми РНК (гРНК), которые селективно нацелены на альфа-изоформу киназы p38, также снижает экспрессию DUX4 и связанных с последующих относительно DUX4 генов в пораженных FSHD мышечных трубочках. Было также обнаружено, что селективные ингибиторы киназ p38 α и β специфическим образом снижали уровни DUX4 и его последующих генов в пораженных FSHD мышечных трубочках, влияя таким образом на патофизиологическое ядро болезненного процесса при FSHD (примеры данных приведены в настоящем документе). Те же эксперименты показали, что ингибиторы киназ p38 α и β не влияют на экспрессию миогенина или других миогенных факторов, а также на пролиферацию миобластов или дифференцировку миобластов, на что указывает миогенное слияние в пораженных FSHD мышечных трубочках, демонстрируя таким образом то, что указанный эффект не обусловлен общей токсичностью для мышц. Указанные низкомолекулярные ингибиторы киназы p38 снижают экспрессию DUX4 и связанных с ним последующих генов, таким образом влияя на патофизиологию болезненного процесса при FSHD, в том числе снижая уровень апоптотической смерти клеток. Опосредованное p38 снижение уровней DUX4 предположительно влияет на последующие воспалительную жировую инфильтрацию и фиброзные процессы при FSHD.

[0047] Представители семейства p38 MAPK, состоящие из α , β , γ и δ изоформ, закодированы отдельными генами, которые играют важнейшую роль в клеточных ответах, необходимых для адаптации к стрессу и выживанию (описание приведено в источнике: Whitmarsh 2010; Martin et al., 2014; Kremontsov et al., 2013). При многих воспалительных заболеваниях, в том числе заболеваниях сердечно-сосудистой системы и других

хронических заболеваниях, те же самые стресс-индуцированные сигналы MAPK p38 могут запускать неадекватные адаптивные ответы, которые усугубляют, а не облегчают заболевание (описание приведено в источнике: Whitmarsh 2010; Martin et al., 2014). Так, в скелетных мышцах различные клеточные стрессы, в том числе хронические физические нагрузки, воздействие инсулина и измененные эндокринные состояния, дифференцировка миобластов в миоциты, активные формы кислорода, а также апоптоз - все эти стрессы, как было показано, индуцируют путь киназы p38 (Keren, et.al., 2006; Zarubin et al., 2006). Фактически, путь киназы p38 может быть активирован рядом внешних стимулов, в том числе провоспалительными цитокинами и клеточным стрессом, что приводит к активации MAPK-киназ с двойной специфичностью MKK3 и MKK6. Активация MKK3 и MKK6, которые, в свою очередь, фосфорилируют p38 в петле активации, запускает последующие события фосфорилирования. Они включают фосфорилирование HSP27, MAPKAPK2 (MK2) и различных транскрипционных факторов, что заканчивается транскрипционными изменениями в ядре. Было идентифицировано умеренное число p38-регулируемых транскриптов и значительное число последующих эффекторных киназ p38 (описание приведено в источниках: Cuenda et al., 2007 и Kyriakis et.al., 2001, Viemann et al. 2004).

[0048] Были начаты клинические испытания применения нескольких соединений из разных химических скаффолдов, которые ингибируют сигнальный путь MAPK p38 α , при разнообразных (не нейромышечных) показаниях, в том числе ревматоидном артрите, хронической обструктивной болезни легких, болевом синдроме, заболеваниях сердечно-сосудистой системы и раке. Была подтверждена безопасность ингибирования p38 α и β в клинических испытаниях. Фармакологические характеристики *in vitro* и *in vivo* предполагают, что вовлечение мишени p38 α в указанных клинических исследованиях было устойчивым, что продемонстрировано путем измерения снижения фосфорилирования HSP27 (непрямая мишень) и pMK2 (прямая мишень).

[0049] Известно, что MAPK p38 α играет критически важные роли в биологии скелетных мышц, в частности, в подавлении дифференцировки пролиферирующих миобластов с последующим слиянием с образованием многоядерных мышечных трубочек. Лечение пациентов с мышечной дистрофией, у которых постоянно идут процессы дегенерации и регенерации, ингибиторами p38 α , не является тривиальным. Полный нокдаун (КО) p38 α летален на стадии эмбриона. «Спасение» экспрессии у эмбрионов обеспечивает выживание детенышей в течение нескольких дней после рождения и позволяет выделить спутниковые клетки для изучения миогенных предшественников с отсутствующей p38 α . В миобластах, в которых полностью отсутствует p38 α , значимо ниже экспрессия критически важных для дифференцировки генов и наблюдаются тяжелые дефекты слияния. Гистологическое исследование у P2-детенышей выявляет значимо повышенные уровни циклирующих спутниковых клеток и распределение волокон со сдвигом влево (Perdiguero et. al, 2007). Важно отметить, что КО p38 α в зрелых мышцах (Cre, управляемая промотором Myl1) не наблюдается дефектов в точках времени раннего периода, при этом у мышей, дефицитных по p38 α , в возрасте 6

месяцев наблюдается значимо более высокий уровень регенерации и волокон типа I, а также менее выраженное распределение волокон по сравнению с контролями (Wissing et. al, 2014). Указанные данные предполагают, что ингибирование p38 α запускает регенерацию скелетных мышц при заболеваниях, связанных с недостаточностью регенерации, наряду с FSHD, за счет механизма, независимого от регуляции экспрессии DUX4.

[0050] В скелетных мышцах p38, как было показано, регулирует генную экспрессию во время миогенеза. p38 γ , как было показано, необходим для миогенеза с применением способов нокаута как специфических генов, так и нокаута в заданных условиях (Cuenda et.al., 2007; Kerin et.al., 2006; Aouadi et.al., 2006). Во взрослом возрасте селективные ингибиторы p38 α и β позволяют избежать связанного с p38 γ нарушения миогенеза.

[0051] Согласно настоящему изобретению было обнаружено, что p38 активируется во время миогенеза, а ингибирование p38 α и β молекулами, примеры которых приведены в настоящем документе, в том числе FTX-839, FTX-1821 и т.п., выражено снижает экспрессию DUX4 и последующей генной программы в пораженных FSHD мышечных трубочках (примеры данных приведены в настоящем документе). Без ограничения конкретной теорией, p38 α , предположительно, прямо регулирует экспрессию DUX4, влияя на активность критически важных миогенных энхансеров, необходимых для патологической экспрессии DUX4 на уровне мутированного локуса D4Z4 с более короткими повторами (FSHD1) или мутаций SMCHD1 (FSHD2), или при утрате репрессии за счет других механизмов в мышцах страдающих FSHD пациентов. Указанный механизм отличается от механизма, использованного в более ранних клинических исследованиях, нацеленного на функции p38 в цитоплазме и не показавшего эффективности при многочисленных заболеваниях, в том числе ревматоидном артрите, болевом синдроме, депрессии, хронической обструктивной болезни легких и заболеваний сердечно-сосудистой системы. Клинические исследования применения ингибиторов p38 при FSHD никогда не проводились.

[0052] В настоящем описании и прилагаемой формуле изобретения термины в единственном числе, в том числе сопровождаемые определением «указанный(ая, ое)», включают и множественное число, если иное явным образом не следует из контекста.

[0053] В настоящем описании термин «и/или» используют в качестве «и» или «или», если не указано иное.

[0054] В тексте настоящего документа, за исключением случаев, когда контекст подразумевает иное, выражение «содержать» или его варианты, такие как «содержит» или «содержащий», подразумевают включение указанного элемента или целочисленного значения, или группы элементов или целочисленных значений, но без исключения любого другого элемента или целочисленного значения, или группы элементов или целочисленных значений.

[0055] В настоящем документе термины «приблизительно» и «приблизительно»

используют как эквиваленты. Любые численные величины в настоящем документе, сопровождаемые или не сопровождаемые уточнением «приблизительно/примерно» включают любые обычные колебания, очевидные для специалиста в соответствующей области техники. Согласно некоторым вариантам реализации термин «приблизительно» или «примерно» относится к диапазону значений в пределах 25%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% или менее в любом направлении (больше или меньше) от указанного референсного значения, если иное не указано или по иным причинам не очевидно из контекста (кроме случаев, когда такое число будет превышать 100% от возможного значения).

[0056] «Введение» относится в настоящем документе к введению агента или композиции субъекту или приведению агента или композиции в контакт с клеткой и/или тканью.

[0057] Согласно определенным аспектам настоящее изобретение включает способ снижения экспрессии или активности гена, мРНК или полипептида DUX4, или снижения экспрессии или активности последующего относительно DUX4 гена или полипептида, в том числе, но не ограничиваясь перечисленными, любого гена или полипептида согласно описанию в настоящем документе, в клетке, ткани, органе или у субъекта. Согласно конкретным вариантам реализации мРНК DUX4 представляет собой DUX4-fl. В настоящем документе термин «последующий относительно DUX4 ген» относится к гену, который DUX4 транскрипционно активирует (т.е. повышает его экспрессию), а термин «последующий относительно DUX4 полипептид» относится к кодируемому полипептиду. Иллюстративные примеры последующих относительно DUX4 генов приведены в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам реализации указанный последующий относительно DUX4 ген выбран из представленных на фиг. 10А.

[0058] Описанные здесь способы могут быть реализованы *in vitro* или *in vivo*, и согласно некоторым вариантам реализации указанные способы включают приведение в контакт клетки, ткани, органа или субъекта с ингибитором p38, которое приводит к снижению количества активного белка p38 в указанных клетке, ткани, органе или у субъекта. Термин «ингибитор p38» может относиться к любым агентам, обеспечивающим снижение количества активного белка p38 в клетке, ткани, органе или у субъекта. Количество активного белка p38 в клетке может быть снижено с применением различных способов, в том числе, но не ограничиваясь перечисленным, снижения общего количества белка p38 или ингибирования одной или более из активностей белка p38. Согласно различным вариантам реализации ингибитор p38 может ингибировать экспрессию гена p38, мРНК p38 или белка p38, и/или ингибитор p38 может ингибировать биологическую активность белка p38. Согласно некоторым вариантам реализации указанная биологическая активность представляет собой киназную активность. Например, ингибитор p38 может конкурентно связываться с сайтом связывания АТФ МАРК p38 и ингибировать киназную активность, или он может аллостерически блокировать киназную активность p38 МАРК. Согласно некоторым вариантам реализации ингибитор p38

вызывает усиленное разложение белка p38. Согласно конкретным вариантам реализации ген p38 или белок p38 представляет собой ген p38 млекопитающих или белок p38 млекопитающих, например, ген p38 человека или белок p38 человека, например, ген или белок p38- α (MAPK14) или p38- β (MAPK11) человека.

[0059] p38 MAP-киназа (MAPK), также называемая RK или CSBP (цитокинин-специфический связывающий белок), представляет собой ортолог млекопитающих дрожжевой MAP-киназы Hog1p, которая принимает участие в сигнальном каскаде, контролирующем клеточные ответы на цитокины и стресс. Были идентифицированы четыре MAP-киназы p38, p38- α (MAPK14), - β (MAPK11), - γ (MAPK12/ERK6) и - δ (MAPK13/SAPK4). Указанные киназы включают различные изоформы. Согласно конкретным вариантам реализации нацеливание на любые из них может осуществляться с применением способов согласно описанию в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам реализации указанный ингибитор p38 ингибирует p38- α (MAPK14) или p38- β (MAPK11), например, варианты указанных генов или белков человека.

[0060] Согласно определенному варианту реализации указанный целевой белок p38 содержит последовательность аминокислот, приведенную ниже или представленную в GenBank под номером доступа NP_001306.1 для киназы p38 (митоген-активируемая протеинкиназа 14, изоформа 1, Homo sapiens):

MSQERPTFYRQELNKTIWEVPERYQNLSPVGSAYGSVCAAFDTKTGLRVAVK
KLSRPFQSIHAKRTYRELRLKHKHENVIGLLDVFTPARSLEEFNDVYLVTHLMGAD
LNNIVKCQKLTDDHVQFLIYQILRGLKYIHSADIHRDLKPSNLAVNEDCELKILDFGLAR
HTDDEMTGYVATRWRAPPEIMLNWMHYNQTVDIWSVGCIMAELLTGRTLFPGTDHID
QLKLILRLVGTPGAELLKKISSESARNYIQSLTQMPKMNANVFIGNPLAVDLLEKMLV
LDSDKRITAAQALAHAYFAQYHDPDDEPVADPYDQSFESRDLLIDEWKSLTYDEVISFV
PPPLDQEEMES (SEQ ID NO:1).

[0061] Согласно некоторым вариантам реализации указанные целевой ген, кДНК, мРНК или кодирующая последовательность p38 содержат последовательность нуклеиновой кислоты p38- α , приведенную ниже или представленную в GenBank под номером доступа NM_001315.2, или ее комплемент:

TTCTCTCACGAAGCCCCGCCGCGGAGAGGTTCCATATTGGGTAAAATCTCG
GCTCTCGGAGAGTCCCGGGAGCTGTTCTCGCGAGAGTACTGCGGGAGGCTCCCGTTT
GCTGGCTCTTGGAACCGCGACCACTGGAGCCTTAGCGGGCGCAGCAGCTGGAACGG
GAGTACTGCGACGCAGCCCGGAGTCGGCCTTGTAGGGGCGAAGGTGCAGGGAGATC
GCGGCGGGCGCAGTCTTGAGCGCCGGAGCGCGTCCCTGCCCTTAGCGGGGCTTGCC
CCAGTCGCAGGGGCACATCCAGCCGCTGCGGGCTGACAGCAGCCGCGCGCGGGGAG
TCTGCGGGGTCGCGGCAGCCGCACCTGCGCGGGCGACCAGCGCAAGGTCCCCGCCC
GGCTGGGCGGGCAGCAAGGGCCGGGAGAGGGTGCGGGTGCAGGCGGGGGCCCCA
CAGGGCCACCTTCTTGCCCGGCGGCTGCCGCTGGAAAATGTCTCAGGAGAGGCCCA
CGTTCTACCGGCAGGAGCTGAACAAGACAATCTGGGAGGTGCCCGAGCGTTACCAG
AACCTGTCTCCAGTGGGCTCTGGCGCCTATGGCTCTGTGTGTGCTGCTTTTGACACA

AAAACGGGGTTACGTGTGGCAGTGAAGAAGCTCTCCAGACCATTTTCAGTCCATCATT
CATGCGAAAAGAACCTACAGAGAACTGCGGTTACTTAAACATATGAAACATGAAAA
TGTGATTGGTCTGTTGGACGTTTTTACACCTGCAAGGTCTCTGGAGGAATTCAATGA
TGTGTATCTGGTGACCCATCTCATGGGGGCAGATCTGAACAACATTGTGAAATGTCA
GAAGCTTACAGATGACCATGTTTCAGTTCCTTATCTACCAAATTCTCCGAGGTCTAAA
GTATATACATTCAGCTGACATAATTCACAGGGACCTAAAACCTAGTAATCTAGCTGT
GAATGAAGACTGTGAGCTGAAGATTCTGGATTTTGGACTGGCTCGGCACACAGATG
ATGAAATGACAGGCTACGTGGCCACTAGGTGGTACAGGGCTCCTGAGATCATGCTG
AACTGGATGCATTACAACCAGACAGTTGATATTTGGTCAGTGGGATGCATAATGGCC
GAGCTGTTGACTGGAAGAACATTGTTTCCTGGTACAGACCATATTAACCAGCTTCAG
CAGATTATGCGTCTGACAGGAACACCCCCGCTTATCTCATTAAACAGGATGCCAAGC
CATGAGGCAAGAACTATATTCAGTCTTTGACTCAGATGCCGAAGATGAACTTTGCG
AATGTATTTATTGGTGCCAATCCCCTGGCTGTGACTTGCTGGAGAAGATGCTTGTA
TTGGACTCAGATAAGAGAATTACAGCGGCCCAAGCCCTTGCACATGCCTACTTTGCT
CAGTACCACGATCCTGATGATGAACCAGTGGCCGATCCTTATGATCAGTCCTTTGAA
AGCAGGGACCTCCTTATAGATGAGTGGAAAAGCCTGACCTATGATGAAGTCATCAG
CTTTGTGCCACCACCCCTTGACCAAGAAGAGATGGAGTCCTGAGCACCTGGTTTCTG
TTCTGTTGATCCCCTTCACTGTGAGGGGAAGGCCTTTTCACGGGAACTCTCCAAAT
ATTATTCAAGTGCCTCTTGTGTCAGAGATTTCCCTCCATGGTGGAAAGGGGGTGTGCGT
GCGTGTGCGTGCGTGTTAGTGTGTGTGCATGTGTGTGTCTGTCTTTGTGGGAGGGTA
AGACAATATGAACAAACTATGATCACAGTGACTTTACAGGAGGTTGTGGATGCTCC
AGGGCAGCCTCCACCTTGCTCTTCTTTCTGAGAGTTGGCTCAGGCAGACAAGAGCTG
CTGTCCTTTTAGGAATATGTTCAATGCAAAGTAAAAAATATGAATTGTCCCCAATC
CCGGTCATGCTTTTGCCACTTTGGCTTCTCCTGTGACCCACCTTGACGGTGGGGCGT
AGACTTGACAACATCCCACAGTGGCACGGAGAGAAGGCCATAACCTTCTGGTTGCTT
CAGACCTGACACCGTCCCTCAGTGATACGTACAGCCAAAAAGGACCAACTGGCTTC
TGTGCACTAGCCTGTGATTAACTTGCTTAGTATGGTTCTCAGATCTTGACAGTATATT
TGAAACTGTAAATATGTTTGTGCCTTAAAAGGAGAGAAGAAAGTGTAGATAGTTAA
AAGACTGCAGCTGCTGAAGTTCTGAGCCGGGCAAGTCGAGAGGGCTGTTGGACAGC
TGCTTGTGGGCCCGGAGTAATCAGGCAGCCTTCATAGGCGGTCATGTGTGCATGTGA
GCACATGCGTATATGTGCGTCTCTCTTTCTCCCTCACCCCCAGGTGTTGCCATTTCTC
TGCTTACCCTTACCTTTGGTGCAGAGGTTTCTTGAATATCTGCCCCAGTAGTCAGAA
GCAGGTTCTTGATGTCATGTACTTCCTGTGTACTCTTTATTTCTAGCAGAGTGAGGAT
GTGTTTTGCACGTCTTGCTATTTGAGCATGCACAGCTGCTTGTCTGCTCTCTTCAGG
AGGCCCTGGTGTGAGGCAGGTTTGCCAGTGAAGACTTCTTGGGTAGTTTLAGATCCCA
TGTCACCTCAGCTGATATTATGGCAAGTGATATCACCTCTCTTCAGCCCCTAGTGCTA
TTCTGTGTTGAACACAATTGATACTTCAGGTGCTTTTGTATGTGAAAATCATGAAAAG
AGGAACAGGTGGATGTATAGCATTTTTTATTCATGCCATCTGTTTTCAACCAACTATTT
TTGAGGAATTATCATGGGAAAAGACCAGGGCTTTTCCCAGGAATATCCCAAACCTTCG
GAAACAAGTTATTCTCTTCACTCCCAATAACTAATGCTAAGAAATGCTGAAAATCAA

AGTAAAAAATTAAGCCCATAAAGGCCAGAACTCCTTTTGCTGTCTTTCTCTAAATA
 TGATTACTTTAAAATAAAAAAGTAACAAGGTGTCTTTTCCACTCCTATGGAAAAGGG
 TCTTCTTGGCAGCTTAACATTGACTTCTTGGTTTGGGGAGAAATAAATTTTGTTCAG
 AATTTTGTATATTGTAGGAATCCTTTGAGAATGTGATTCCTTTTGATGGGGAGAAAG
 GGCAAATTATTTAATATTTTGTATTTTCAACTTTATAAAGATAAAATATCCTCAGGG
 GTGGAGAAGTGTCGTTTTTCATAACTTGCTGAATTCAGGCATTTTGTCTACATGAG
 GACTCATATATTTAAGCCTTTTGTGTAATAAGAAAGTATAAAGTCACTTCCAGTGTT
 GGCTGTGTGACAGAATCTTGTATTTGGGCCAAGGTGTTTCCATTTCTCAATCAGTGC
 AGTGATACATGTACTCCAGAGGGACAGGGTGGACCCCTGAGTCAACTGGAGCAAG
 AAGGAAGGAGGCAGACTGATGGCGATTCCCTCTCACCCGGGACTCTCCCCCTTCAA
 GGAAAGTGAACCTTTAAAGTAAAGGCCTCATCTCCTTTATTGCAGTTCAAATCCTCA
 CCATCCACAGCAAGATGAATTTTATCAGCCATGTTTGGTTGTAAATGCTCGTGTGAT
 TTCCTACAGAAATACTGCTCTGAATATTTTGTAAATAAAGGTCTTTCACATGTGACC
 ACATACGTGTTAGGAGGCTGCATGCTCTGGAAGCCTGGACTCTAAGCTGGAGCTCTT
 GGAAGAGCTCTTCGGTTTCTGAGCATAATGCTCCCATCTCCTGATTTCTCTGAACAG
 AAAACAAAAGAGAGAATGAGGGAAATTGCTATTTTATTTGTATTCATGAACTTGGCT
 GTAATCAGTTATGCCGTATAGGATGTCAGACAATACCACTGGTTAAAATAAAGCCTA
 TTTTCAAATTTAGTGAGTTTCTCAAGTTTATTATATTTTCTCTTGTTTTTATTTAAT
 GCACAATATGGCATTATATCAATATCCTTTAAACTGTGACCTGGCATACTTGTCTGA
 CAGATCTTAATACTACTCCTAACATTTAGAAAATGTTGATAAAGCTTCTTAGTTGTA
 CATTTTTTGGTGAAGAGTATCCAGGTCTTTGCTGTGGATGGGTAAAGCAAAGAGCAA
 ATGAACGAAGTATTAAGCATTGGGGCCTGTCTTATCTACACTCGAGTGTAAGAGTGG
 CCGAAATGACAGGGCTCAGCAGACTGTGGCCTGAGGGCCAAATCTGGCCCACCACC
 TGTTTGGTGTAGCCTGCTAAGAATGGCTTTTACATTTTAAATGGTTGGGAAAGAAA
 AAAAAAGAAGTAGTAGATTTTGTAGCATGTGATGTAAGTAATGTAAACTTAAATT
 CCAGTATCCATAAATAAAGTTTTATGAGAACAGA (SEQ ID NO:2).

[0062] Согласно определенному варианту реализации указанный целевой белок p38 содержит последовательность аминокислот, приведенную ниже или представленную в GenBank под номером доступа NP_002742.3 для киназы p38 (митоген-активируемая протеинкиназа 11, изоформа 1, Homo sapiens):

MSGPRAGFYRQELNKTVWEVPQRLQGLRPVGSYAGSVCSAYDARLRQKVAV
 KKLSRPFQSLIHARRTYRELRLKHLKHENVIGLLDVFTPATSIEDFSEVYLVTTLMGAD
 LNNIVKCQALSDEHVQFLVYQLLRGLKYIHSAGIHRDLKPSNVAVNEDCELRIIDFGLA
 RQADEEMTGYVATRWRAPPEIMLNWMHYNQTVDIWSVGCIMAELLQGKALFPGSDYI
 DQLKRIMEVVGTPSPEVLAKISSEHARTYIQSLPMPQKDLSSIFRGANPLAIDLLGRMLV
 LDSDQRVSAEALAHAYFSQYHDPEDPEPEAEPEYDESVEAKERTLEEWKELTYQEVLSFK
 PPEPPKPPGSLEIEQ (SEQ ID NO:3).

[0063] Согласно некоторым вариантам реализации указанный целевой ген, кДНК, мРНК или кодирующая последовательность p38 содержат последовательность нуклеиновой кислоты p38-β, приведенную ниже или представленную в GenBank под

номером доступа NM_002751.6, или ее комплемент:

CGCCGCCTCCGCCGCCCTCCGCTCCGCTCGGCTCGGGCTCGGCTCGGGCGCG
GGCGCGGGGCGCGGGGCTGGGCCCGGGCGGAGCGGCGGCTGCTCCGGACATGTCCG
GCCCTCGCGCCGGCTTCTACCGGCAGGAGCTGAACAAGACCGTGTGGGAGGTGCCG
CAGCGGCTGCAGGGGCTGCGCCCGGTGGGCTCCGGCGCCTACGGCTCCGTCTGTTCG
GCCTACGACGCCCCGGCTGCGCCAGAAGGTGGCGGTGAAGAAGCTGTCGCGCCCCCTT
CCAGTCGCTGATCCACGCGCGCAGAACGTACCGGGAGCTGCGGCTGCTCAAGCACC
TGAAGCACGAGAACGTCATCGGGCTTCTGGACGTCTTCACGCCGGCCACGTCCATCG
AGGACTTCAGCGAAGTGTACTTGGTGACCACCCTGATGGGCGCCGACCTGAACAAC
ATCGTCAAGTGCCAGGCGCTGAGCGACGAGCACGTTCAATTCCTGGTTTACCAGCTG
CTGCGCGGGCTGAAGTACATCCACTCGGCCGGGATCATCCACCGGGACCTGAAGCC
CAGCAACGTGGCTGTGAACGAGGACTGTGAGCTCAGGATCCTGGATTCGGGCTGG
CGCGCCAGGCGGACGAGGAGATGACCGGCTATGTGGCCACGCGCTGGTACCGGGCA
CCTGAGATCATGCTCAACTGGATGCATTACAACCAAACAGTGGATATCTGGTCCGTG
GGCTGCATCATGGCTGAGCTGCTCCAGGGCAAGGCCCTCTTCCCGGGAAGCGACTA
CATTGACCAGCTGAAGCGCATCATGGAAGTGGTGGGCACACCCAGCCCTGAGGTTC
TGGCAAAAATCTCCTCAGAACACGCCCGGACATATATCCAGTCCCTGCCCCCCATGC
CCCAGAAGGACCTGAGCAGCATCTTCCGTGGAGCCAACCCCTGGCCATAGACCTC
CTTGAAGGATGCTGGTGCTGGACAGTGACCAGAGGGTCAGTGCAGCTGAGGCACT
GGCCACGCCTACTTCAGCCAGTACCACGACCCCGAGGATGAGCCAGAGGCCGAGC
CATATGATGAGAGCGTTGAGGCCAAGGAGCGCACGCTGGAGGAGTGGAAGGAGCT
CACTTACCAGGAAGTCCTCAGCTTCAAGCCCCAGAGCCACCGAAGCCACCTGGCA
GCCTGGAGATTGAGCAGTGAGGTGCTGCCCAGCAGCCCCTGAGAGCCTGTGGAGGG
GCTTGGGCCTGCACCCTTCCACAGCTGGCCTGGTTTCCTCGAGAGGCACCTCCCACA
CTCCTATGGTCACAGACTTCTGGCCTAGGACCCCTCGCCTTCAGGAGAATCTACACG
CATGTATGCATGCACAAACATGTGTGTACATGTGCTTGCCATGTGTAGGAGTCTGGG
CACAAGTGTCCCTGGGCCTACCTTGGTCCTCCTGTCTTCTTGCTACTGCACTCTC
CACTGGGACCTGACTGTGGGGTCCTAGATGCCAAAGGGGTTCCTGCGGAGTTCCC
CTGTCTGTCCCAGGCCGACCCAAGGGAGTGTGAGCCTTGGGCTCTCTTCTGTCCCAG
GGCTTTCTGGAGGACGCGCTGGGGCCGGGACCCCGGGAGACTCAAAGGGAGAGGTC
TCAGTGGTTAGAGCTGCTCAGCCTGGAGGTAGGGGGCTGTCTTGGTCACTGCTGAGA
CCCACAGGTCTAAGAGGAGAGGCAGAGCCAGTGTGCCACCAGGCTGGGCAGGGAC
AACCACCAGGTGTCAAATGAGAAAAGCTGCCTGGAGTCTTGTGTTACCCGTGGGT
GTGTGTGGGCACGTGTGGATGAGCGTGCACTCCCCGTGTTTCATATGTCAGGGCACAT
GTGATGTGGTGCGTGTGAATCTGTGGGCGCCAAGGCCAGCAGCCATATCTGGCAA
GAAGCTGGAGCCGGGGTGGGTGTGCTGTTGCCTTCCCTCTCCTCGGTTCCCTGATGCC
TTGAGGGGTGTTTCAGACTGGCGGCTCCAGTGGGCCAAAGGGCAACCACATGAGCA
TGGGCAGGGGCTTTCTCCTTGGATGTGGGACCCACAGCAGCTTCCCTGAGGCTGGGGG
TGGGTGGGTGGGTGGTTTGGCCTTGAAGGACGCTAGGGCAGGCAGCACACCTGGATG
TGGACTTGGACTCGGACACTTCTGCCCTGCACCCTGGCCCGCTCTCTACCTCTGCCCA

CCGTTGTGGCCCTGCAGCCGGAGATCTGAGGTGCTCTGGTCTGTGGGTTCAGTCCTCT
 TTCCTTGTCCCAGGATGGAGCTGATCCAGTAACCTCGGAGACGGGACCCTGCCCAGA
 GCTGAGTTGGGGGTGTGGCTCTGCCCTGGAAAGGGGGTGACCTCTTGCCTCGAGGG
 GCCCAGGGAAGCCTGGGTGTCAAGTGCCTGCACCAGGGGTGCACAATAAAGGGGGT
 TCTCTCTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA (SEQ ID NO:4)

[0064] Согласно некоторым вариантам реализации способы согласно описанию в настоящем документе, включающие приведение клетки, ткани, органа или субъекта в контакт с ингибитором р38, реализуют для ингибирования или снижения экспрессии или активности DUX4 или одного или более последующих относительно DUX4 генов. Согласно некоторым вариантам реализации указанный ген DUX4 или последующий относительно DUX4 ген представляет собой ген человека. Например, ген двойного гомеобокса 4 DUX4 (*Homo sapiens*) может содержать последовательность нуклеотидов, приведенную ниже или представленную в GenBank под номером доступа NG_034189.2, или ее комплемент:

ATGGCCCTCCCGACACCCTCGGACAGCACCCCTCCCCGCGGAAGCCCGGGGAC
 GAGGACGGCGACGGAGACTCGTTTGGACCCCGAGCCAAAGCGAGGCCCTGCGAGCC
 TGCTTTGAGCGGAACCCGTACCCGGGCATCGCCACCAGAGAACGGCTGGCCCAGGC
 CATCGGCATTCCGGAGCCCAGGGTCCAGATTTGGTTTCAGAATGAGAGGTACGCC
 AGCTGAGGCAGCACCGGCGGGAATCTCGGCCCTGGCCCAGGAGACGCGGCCCGCCA
 GAAGGCCGGCGAAAGCGGACCGCCGTCACCGGATCCCAGACCGCCCTGCTCCTCCG
 AGCCTTTGAGAAGGATCGCTTTCCAGGCATCGCCGCCCGGGAGGAGCTGGCCAGAG
 AGACGGGCCTCCCGGAGTCCAGGATTCAGATCTGGTTTCAGAATCGAAGGGCCAGG
 CACCCGGGACAGGGTGGCAGGGCGCCCGCGCAGGCAGGCGGCCTGTGCAGCGCGG
 CCCCCGGCGGGGGTACCCTGCTCCCTCGTGGGTGCGCTTCGCCCACACCGGCGCGT
 GGGGAACGGGGCTTCCCGCACCCACAGTGCCTGCGCGCCTGGGGCTCTCCACAG
 GGGGCTTTCGTGAGCCAGGCAGCGAGGGCCGCCCCGCGCTGCAGCCCAGCCAGGC
 CGCGCCCGCAGAGGGGATCTCCAACCTGCCCGGGCGCGCGGGGATTTGCGCTACG
 CCGCCCCGGCTCCTCCGGACGGGGCGCTCTCCACCCCTCAGGCTCCTCGCTGGCCTC
 CGCACCCGGGCAAAAGCCGGGAGGACCGGGACCCGCAGCGCGACGGCCTGCCGGG
 CCCCTGCGCGGTGGCACAGCCTGGGCCCGCTCAAGCGGGGCCGAGGGCCAAGGGG
 TGCTTGCGCCACCCACGTCCCAGGGGAGTCCGTGGTGGGGCTGGGGCCGGGGTCCC
 CAGGTGCGCCGGGGCGGCGTGGGAACCCCAAGCCGGGGCAGCTCCACCTCCCCAGCC
 CGCGCCCCCGGACGCCTCCGCCTCCGCGCGGCAGGGGCAGATGCAAGGCATCCCGG
 CGCCCTCCCAGGCGCTCCAGGAGCCGGCGCCCTGGTCTGCACTCCCCTGCGGCCTGC
 TGCTGGATGAGCTCCTGGCGAGCCCGGAGTTTCTGCAGCAGGCGCAACCTCTCCTAG
 AAACGGAGGCCCCCGGGGAGCTGGAGGCCTCGGAAGAGGCCGCCTCGCTGGAAGC
 ACCCTCAGCGAGGAAGAATAACGGGCTCTGCTGGAGGAGCTTTAGGACGCGGGGT
 TGGGACGGGGTTCGGGTGGTTCGGGGCAGGGCGGTGGCCTCTCTTTCGCGGGGAACA
 CCTGGCTGGCTACGGAGGGGCGTGTCTCCGCCCCGCCCTCCACCGGGCTGACCGG
 CCTGGGATTCCTGCCTTCTAGGTCTAGGCCCGGTGAGAGACTCCACACCGCGGAGAA

CTGCCATTCTTTCCTGGGCATCCCGGGGATCCCAGAGCCGGCCAGGTACCAGCAGG
 TGGGCCGCCTACTGCGCACGCGCGGGTTTGCGGGCAGCCGCCTGGGCTGTGGGAGC
 AGCCCGGGCAGAGCTCTCCTGCCTCTCCACCAGCCCACCCCGCCGCCTGACCGCCCC
 CTCCCCACCCCCACCCCCACCCCCGGAAAACGCGTCGTCCCCTGGGCTGGGTGGAG
 ACCCCCGTCCC GCGAAACACCGGGCCCCGCGCAGCGTCCGGGCCTGACACCGCTCC
 GGCGGCTCGCCTCCTCTGCGCCCCCGCGCCACCGTCGCCCCGCCCGGGCCCCCTG
 CAGCCTCCCAGCTGCCAGCACGGAGCGCCTGGCGGTCAAAGCATAACCTCTGTCTGT
 CTTTGCCCCGCTTCTGGCTAGACCTGCGCGCAGTGCGCACCCCGGCTGACGTGCAAG
 GGAGCTCGCTGGCCTCTCTGTGCCCTTGTCTTCCGTGAAATTCTGGCTGAATGTCTC
 CCCCCACCTTCCGACGCTGTCTAGGCAAACCTGGATTAGAGTTACATCTCCTGGATG
 ATTAGTTCAGAGATATATTAATAAATGCCCCCTCCCTGTGGATCCTATAG (SEQ ID
 NO:5).

[0065] Например, мРНК-ген двойного гомеобокса 4 DUX4 [Homo sapiens] может содержать последовательность нуклеотидов, приведенную ниже или представленную в GenBank под номером доступа NM_001293798.2, или ее комплемент:

ATGGCCCTCCCGACACCCTCGGACAGCACCTCCCCGCGGAAGCCCGGGGAC
 GAGGACGGCGACGGAGACTCGTTTGACCCCGAGCCAAAGCGAGGCCCTGCGAGCC
 TGCTTTGAGCGGAACCCGTACCCGGGCATCGCCACCAGAGAACGGCTGGCCCAGGC
 CATCGGCATTCGGAGCCCAGGGTCCAGATTTGGTTTCAGAATGAGAGGTCACGCC
 AGCTGAGGCAGCACCGGCGGGAATCTCGGCCCTGGCCCCGGGAGACGCGGCCCGCCA
 GAAGGCCGGCGAAAGCGGACCGCCGTCACCGGATCCCAGACCGCCCTGCTCCTCCG
 AGCCTTTGAGAAGGATCGCTTTCCAGGCATCGCCGCCCGGGAGGAGCTGGCCAGAG
 AGACGGGCCTCCCGGAGTCCAGGATTCAGATCTGGTTTCAGAATCGAAGGGCCAGG
 CACCCGGGACAGGGTGGCAGGGCGCCCGCGCAGGCAGGCGGCCTGTGCAGCGCGG
 CCCCCGGCGGGGGTACCCTGCTCCCTCGTGGGTGCGCTTCGCCCACACCGGCGCGT
 GGGGAACGGGGCTTCCCGCACCCACGTGCCCTGCGCGCCTGGGGCTCTCCACAG
 GGGGCTTTCGTGAGCCAGGCAGCGAGGGCCGCCCCCGCGCTGCAGCCCAGCCAGGC
 CGCGCCCGGCAGAGGGGATCTCCCAACCTGCCCCGGCGCGCGGGGATTTGCGCTACG
 CCGCCCCGGCTCCTCCGGACGGGGCGCTCTCCACCCCTCAGGCTCCTCGCTGGCCTC
 CGCACCCGGGCAAAGCCGGGAGGACCGGGACCCGCAGCGCGACGGCCTGCCGGG
 CCCCTGCGCGGTGGCACAGCCTGGGCCCCGCTCAAGCGGGGCCGAGGGCCAAGGGG
 TGCTTGCGCCACCCACGTCCCAGGGGAGTCCGTGGTGGGGCTGGGGCCGGGGTCCC
 CAGGTGCGCCGGGGCGGCGTGGGAACCCCAAGCCGGGGCAGCTCCACCTCCCCAGCC
 CGCGCCCCCGGACGCCTCCGCCTCCGCGCGGCAGGGGCAGATGCAAGGCATCCCGG
 CGCCCTCCCAGGCGCTCCAGGAGCCGGCGCCCTGGTCTGCACTCCCCTGCGGCCTGC
 TGCTGGATGAGCTCCTGGCGAGCCCGGAGTTTCTGCAGCAGGCGCAACCTCTCCTAG
 AAACGGAGGCCCCGGGGGAGCTGGAGGCCTCGGAAGAGGCCGCTCGCTGGAAGC
 ACCCCTCAGCGAGGAAGAATACCGGGCTCTGCTGGAGGAGCTTTAGGACGCGGGGT
 CTAGGCCCCGGTGAGAGACTCCACACCGCGGAGAACTGCCATTCTTTCTGGGCATCC
 CGGGGATCCCAGAGCCGGCCCAGGTACCAGCAGACCTGCGCGCAGTGCGCACCCCG

GCTGACGTGCAAGGGAGCTCGCTGGCCTCTCTGTGCCCTTGTTCTTCCGTGAAATTCT
 GGCTGAATGTCTCCCCCACCTTCCGACGCTGTCTAGGCAAACCTGGATTAGAGTTA
 CATCTCCTGGATGATTAGTTCAGAGATATATTAATAATGCCCCCTCCCTGTGGATCCT
 ATAG (SEQ ID NO:6).

[0066] Согласно конкретному варианту реализации последовательность полипептида DUX4 соответствует приведенной ниже или представленной в GenBank под номером доступа NP_001280727.1:

MALPTPSDSTLPAEARGRGRRRRLVWTPSQSEALRACFERNPYPGIATRERLAQA
 IGIPEPRVQIWFQNERSRQLRQHRRESRPWPGRRGPEGRRKRTAVTGSQTALLLRAFEK
 DRFPGIAAREELARETGLPESRIQIWFQNRARRHPGQGGRAPAQAGGLCSAAPGGGHPA
 PSWVAFANTGAWGTGLPAPHVPCAPGALPQGAFVSQAARAAPALQPSQAAPAEGISQP
 APARGDFAYAAPAPPDGALSHPQAPRWPPHPGKSREDRDPQRDGLPGPCAVAQPGPAQ
 AGPQGQGVLPPTSQGSPWWGWRGPQVAGAAWEPQAGAAPPQPAPPDASASARQG
 QMQGIPAPSQALQEPAPWSALPCGLLLDELLASPEFLQQAQPLLETEAPGELEASEEAAS
 LEAPLSEEEYRALLEEL (SEQ ID NO:7).

[0067] Последовательности последующих относительно DUX4 генов или мишеней известны в данной области техники и иллюстративные последующие относительно DUX4 гены приведены под номерами доступа, перечисленными ниже:

MBD3L2:

Геномный нуклеотид, номер доступа NC_000019.10 (7049340..7051735)

мРНК-нуклеотид, номер доступа NM_144614.3

белковый полипептид, номер доступа NP_653215.2

ZSCAN4:

NC_000019.10 (57651497..57679152)

NM_152677.2

NP_689890.1

LEUTX:

NC_000019.10 (39776594..39786135)

NM_001143832.1

NP_001137304.1

PRAMEF2:

NC_000001.11 (12857086..12861909)

NM_023014.1

NP_075390.1

TRIM43:

NC_000002.12 (95592018..95599723)

NM_138800.2

NP_620155.1

KHDC1L:

NC_000006.12 (73223544..73225452, комплемент)

NM_001126063.2

NP_001119535.1

[0068] Способы определения уровня экспрессии гена или полипептида p38, DUX4 или последующего относительно DUX4 гена или полипептида в биологическом образце, например, ткани, известны в данной области техники и включают, например, ОТ-ПЦР и FACS.

[0069] Согласно одному варианту реализации способ снижения экспрессии мРНК DUX4 (например, DUX4-fl), полипептида DUX4 или полипептида, кодируемого последующим целевым геном DUX4, в клетке, ткани, органе или у субъекта включает приведение указанных клетки, ткани, органа или субъекта в контакт с агентом, который обеспечивает снижение количества активного белка p38 (также называемым в настоящем документе ингибитором p38), например, ингибитором p38- α и/или p38- β . Согласно некоторым вариантам реализации указанный агент ингибирует экспрессию или активность белка p38. Согласно некоторым вариантам реализации указанный агент вызывает усиленное разложение белка p38, например, p38- α и/или p38- β . Согласно конкретным вариантам реализации указанную клетку или ткань приводят в контакт с количеством агента, эффективным для снижения экспрессии или активности полипептида DUX4, или полипептида, кодируемого последующим целевым геном DUX4, в указанной клетке или ткани. Согласно некоторым вариантам реализации указанную клетку или ткань приводят в контакт с количеством указанного агента, эффективным для снижения количества активного белка p38 в указанной клетке или ткани. Согласно конкретным вариантам реализации указанные клетки представляют собой мышечные клетки. Согласно некоторым вариантам реализации указанные клетки являются терминально дифференцированными, например, терминально дифференцированными мышечными клетками. Согласно некоторым вариантам реализации в указанных клетках повышен уровень экспрессии полипептида DUX4, или полипептида, кодируемого последующим целевым геном, по сравнению с уровнем экспрессии в контрольной клетке. Согласно некоторым вариантам реализации указанные клетки ассоциированы с плече-лопаточно-лицевой мышечной дистрофией (FSHD), например, FSHD1 или FSHD2. Например, указанные клетки могут происходить или быть получены из клеток или ткани от субъекта с диагностированной FSHD. Описанные здесь способы могут быть реализованы *in vitro* или *in vivo*.

[0070] Согласно варианту реализации настоящего изобретения предложен способ уменьшения апоптоза клетки или ткани, включающий приведение указанной клетки или ткани в контакт с агентом, который ингибирует экспрессию или активность белка p38 (также называемым в настоящем документе ингибитором p38), например, ингибитором p38- α и/или p38- β . Согласно конкретным вариантам реализации указанную клетку или ткань приводят в контакт с количеством указанного агента, эффективным для снижения экспрессии или активности полипептида DUX4, или полипептида, кодируемого последующим целевым геном DUX4, в указанной клетке или ткани. Согласно некоторым

вариантам реализации указанную клетку или ткань приводят в контакт с количеством указанного агента, эффективным для снижения количества активного белка p38 в указанной клетке или ткани. Согласно конкретным вариантам реализации указанные клетки представляют собой мышечные клетки. Согласно некоторым вариантам реализации указанные клетки являются терминально дифференцированными, например, терминально дифференцированными мышечными клетками. Согласно некоторым вариантам реализации в указанных клетках повышен уровень экспрессии полипептида DUX4, или полипептида, кодируемого последующим целевым геном, по сравнению с уровнем экспрессии в контрольной клетке (т.е. до обработки). Согласно некоторым вариантам реализации указанные клетки ассоциированы с плече-лопаточно-лицевой мышечной дистрофией (FSHD), например, FSHD1 или FSHD2. Например, указанные клетки могут происходить или быть получены из клеток или ткани от субъекта с диагностированной FSHD. Описанные здесь способы могут быть реализованы *in vitro* или *in vivo*.

[0071] Согласно родственному аспекту настоящее изобретение включает способ лечения или предотвращения заболевания или расстройства, ассоциированного с повышенной активностью или экспрессией белка DUX4 или последующего целевого гена DUX4 у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту фармацевтической композиции, содержащей эффективное количество агента, который уменьшает количество активного белка p38 (например, p38- α и/или p38- β) у субъекта, или в определенных клетках или ткани указанного субъекта. Согласно некоторым вариантам реализации указанный агент ингибирует экспрессию или активность белка p38, например, p38- α и/или p38- β . Согласно некоторым вариантам реализации указанный агент индуцирует разложение белка p38. Согласно некоторым вариантам реализации указанный агент ингибирует активность белка p38, например, ингибирует киназную активность белка p38. Согласно конкретным вариантам реализации любых из указанных способов ингибитор p38 снижает экспрессию DUX4 и/или одного или более последующих относительно DUX4 генов в клетках или ткани указанного субъекта.

[0072] Согласно конкретным вариантам реализации способов обработки, описанных в настоящем документе, указанное заболевание или расстройство выбрано из FSHD 1, FSHD2, иммунодефицита, синдрома нестабильности центромер и аномалий лица (ICF), амиотрофического бокового склероза (ALS), миозита с тельцами включений (IBM), саркомы Юинга, саркомы мягких тканей, рабдомиосаркомы и В-клеточного острого лимфобластного лейкоза взрослого или детского возраста.

[0073] Согласно конкретным вариантам реализации любых способов, описанных в настоящем документе, у указанного субъекта диагностирована FSHD1 или FSHD2, и согласно некоторым вариантам реализации у указанного субъекта имеется одна или более генетических мутаций, ассоциированных с FSHD1 и/или FSHD2. Согласно некоторым вариантам реализации у указанного субъекта снижена репрессия в локусе D4Z4.

[0074] Согласно определенным вариантам реализации любых способов, описанных

в настоящем документе, у субъекта диагностирована FSHD на основании присутствия транскрипционно активного DUX4. Согласно другому варианту реализации у субъекта диагностирована FSHD на основании повышенных уровней экспрессии одного или более последующих генов, например, ZSCAN4, LEUTX, PRAMEF2, TRIM43, MBD3L2, KHDC1L, RFPL2, CCNA1, SLC34A2, TPRX1, PRAMEF20, TRIM49, PRAMEF4, PRAME6, PRAMEF15 или ZNF280A относительно здорового контроля. Согласно другому варианту реализации у субъекта диагностирована FSHD на основании присутствия транскрипционно активного DUX4 и повышенных уровней экспрессии одного или более последующих относительно DUX4 генов, например, ZSCAN4, LEUTX, PRAMEF2, TRIM43, MBD3L2, KHDC1L, RFPL2, CCNA1, SLC34A2, TPRX1, PRAMEF20, TRIM49, PRAMEF4, PRAME6, PRAMEF15 или ZNF280A.

[0075] Согласно другому варианту реализации указанный способ может включать измерение уровня экспрессии одного или более генов из DUX4 и последующих относительно DUX4 генов, например, DUX4, ZSCAN4, LEUTX, PRAMEF2, TRIM43, MBD3L2, KHDC1L, RFPL2, CCNA1, SLC34A2, TPRX1, PRAMEF20, TRIM49, PRAMEF4, PRAME6, PRAMEF15 или ZNF280A, у субъекта перед введением ингибитора киназы p38. Указанный способ может дополнительно включать определение того, что указанный субъект нуждается в лечении, если уровень экспрессии одного или более генов из DUX4 и последующих относительно DUX4 генов, например, DUX4, ZSCAN4, LEUTX, PRAMEF2, TRIM43, MBD3L2, KHDC1L, RFPL2, CCNA1, SLC34A2, TPRX1, PRAMEF20, TRIM49, PRAMEF4, PRAME6, PRAMEF15 и ZNF280A KHDC1L, повышен относительно здорового контроля.

[0076] Согласно другому варианту реализации указанный способ может включать измерение уровня экспрессии одного или более генов из DUX 4 и последующих относительно DUX4 генов, например, DUX4, ZSCAN4, LEUTX, PRAMEF2, TRIM43, MBD3L2, KHDC1L, RFPL2, CCNA1, SLC34A2, TPRX1, PRAMEF20, TRIM49, PRAMEF4, PRAME6, PRAMEF15 или ZNF280A, в клетках субъекта до и после введения ингибитора киназы p38. Указанный способ может включать сравнение уровня экспрессии одного или более генов из DUX 4 и последующих относительно DUX4 генов, например, DUX4, ZSCAN4, LEUTX, PRAMEF2, TRIM43, MBD3L2, KHDC1L, RFPL2, CCNA1, SLC34A2, TPRX1, PRAMEF20, TRIM49, PRAMEF4, PRAME6, PRAMEF15 или ZNF280A, у субъекта до и после введения ингибитора киназы p38. Указанный способ может включать определение эффективности лечения путем сравнения уровня экспрессии одного или более генов из DUX 4 и последующих относительно DUX4 генов, например, DUX4, ZSCAN4, LEUTX, PRAMEF2, TRIM43, MBD3L2, KHDC1L, RFPL2, CCNA1, SLC34A2, TPRX1, PRAMEF20, TRIM49, PRAMEF4, PRAME6, PRAMEF15 и ZNF280A, до и после введения ингибитора киназы p38, причем снижение уровня экспрессии указывает на эффективность лечения.

[0077] Согласно некоторым вариантам реализации указанный ингибитор киназы p38 подавляет один или более последующих генов, выбранных из ZSCAN4, LEUTX,

PRAMEF2, TRIM43, MBD3L2, KHDC1L, RFPL2, CCNA1, SLC34A2, TPRX1, PRAMEF20, TRIM49, PRAMEF4, PRAME6, PRAMEF15 и ZNF280A.

[0078] Согласно одному варианту реализации транскрипционный модулятор DUX4 и последующих генов ZSCAN4, LEUTX, PRAMEF2, TRIM43, MBD3L2, KHDC1L, RFPL2, CCNA1, SLC34A2, TPRX1, PRAMEF20, TRIM49, PRAMEF4, PRAME6, PRAMEF15 и ZNF280A ингибирует киназа p38.

[0079] Согласно конкретным вариантам реализации у указанного субъекта сокращен массив 4q35A D4Z4, таким образом, что у субъекта содержится ≤ 10 или ≤ 7 повторов (FSHD1). Согласно некоторым вариантам реализации у указанного субъекта, или в одной или более клетках или тканях указанного субъекта содержится делеция одного или более макросателлитных повторов D4Z4 в субтеломерной области хромосомы 4q35, необязательно при этом указанная клетка содержит ≤ 7 макросателлитных повторов D4Z4 в субтеломерной области хромосомы 4q35. Согласно некоторым вариантам реализации у указанного субъекта имеется одна или более мутаций в гене *содержащего гибкий шарнирный домен белка поддержания структуры хромосом 1 (SMCHD1)*. Согласно некоторым вариантам реализации у указанного субъекта имеется по меньшей мере один неделетированный аллель 4qA. Согласно некоторым вариантам реализации у указанного субъекта имеется по меньшей мере один неделетированный аллель 4qA и мутация SMCHD1 (FSHD2). Согласно некоторым вариантам реализации указанный субъект прикован к инвалидной коляске (например, с показателем по клинической шкале тяжести заболевания (CSS) 4.5 и 5). Согласно некоторым вариантам реализации во время или после лечения у указанного субъекта наблюдается понижение или уменьшение величины или скорости мышечной дегенерации, например, у субъекта с диагностированной FSHD1 или FSHD2. Согласно некоторым вариантам реализации во время или после лечения у указанного субъекта наблюдается снижение замещения скелетных мышц жировой тканью, например, определенной с применением количественного MPT, например, снижение по меньшей мере на 5%, по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 50% или по меньшей мере на 70%. Согласно некоторым вариантам реализации во время или после лечения у указанного субъекта наблюдаются свидетельства благоприятного действия на одну или более из следующих оценок клинического исхода:

Функция плеча/предплечья по результатам измерения доступного рабочего пространства («Reachable Work Space», RWS) с нагрузкой/без нагрузки;

Подвижность по оценке с применением теста «Timed Up and Go» (TUG) или аналогичного анализа;

Отчеты пациентов об активности в повседневной жизни (ADL) и качестве жизни (QOL); и

Количественная оценка силы скелетных мышц с применением динамометрии.

[0080] Согласно некоторым вариантам реализации у указанного субъекта наблюдаются любые из перечисленных улучшений на протяжении по меньшей мере

некоторого времени, например, на протяжении по меньшей мере одной недели, одного месяца, двух месяцев, шести месяцев или одного года после начала либо прекращения лечения.

[0081] Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложены описанные способы применения ингибиторов р38, например, ингибитора р38- α или р38- β , для лечения FSHD1, FSHD2, ICF, а также заболеваний, при которых наблюдаются аналогичные патологические изменения, таких как ALS и IBM (Tawil et al., 2014).

[0082] Согласно конкретным вариантам реализации любых из способов, описанных в настоящем документе, фармацевтическую композицию вводят субъекту парентерально.

[0083] Согласно конкретным вариантам реализации любых из способов, описанных в настоящем документе, фармацевтическую композицию вводят в мышечную ткань указанного субъекта.

[0084] Согласно некоторым определенным вариантам реализации любые из способов, описанных в настоящем документе, включающих обеспечение субъекта ингибитором р38, могут дополнительно включать содержать обеспечение субъекта дополнительной терапией.

[0085] Согласно конкретным вариантам реализации указанная дополнительная терапия включает клиническое ведение. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения предложен способ лечения или предотвращения FSHD 1, FSHD2, ICF, ALS, IBM, саркомы Юинга, саркомы мягких тканей, рабдомиосаркомы и В-клеточного острого лимфобластного лейкоза взрослого или детского возраста, где используют ингибиторы р38 для снижения экспрессии и/или активности гена и/или белка DUX4 и/или последующего гена и/или белка, которые могут быть скомбинированы с клиническим ведением, включающим физическую терапию, аэробные упражнения, терапию дыхательной функции и/или ортопедические вмешательства.

[0086] Согласно конкретным вариантам реализации указанная дополнительная терапия включает обеспечение субъекта одним или более ингибиторами миостатина, противовоспалительными агентами или векторами для генной терапии, например, для снижения продуцирования патогенного белка DUX4 при FSHD за счет контроля метилирования D4Z4, супрессии *mPHK DUX4* и/или ингибирования сигнальных путей DUX4. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения предложен способ лечения FSHD 1, FSHD2, ICF, ALS или IBM у нуждающегося в этом субъекта, где используют ингибиторы р38, например, ингибиторы р38- α или р38- β , для снижения экспрессии гена и/или белка DUX4 и последующего гена и/или белка, которые могут быть скомбинированы с введением ингибиторов миостатинов, противовоспалительных агентов и/или генной терапией, например, для снижения продуцирования патогенного белка DUX4 при FSHD за счет контроля метилирования D4Z4, супрессии *mPHK DUX4* и ингибирования путей DUX4. Согласно некоторым вариантам реализации указанные способы реализуют с применением ингибитора р38 и ингибитора миостатина. Согласно определенным вариантам реализации могут быть использованы конкретные ингибиторы

пути миостатина, действующие внеклеточно, либо непосредственно связывая миостатин (Fstl3, фоллистатин, антитело к миостатину, GASP1, пропептид миостатина, декориновые пептиды, ActRIIB-Fc), либо связывая его рецепторный комплекс (антитело к ActRIIB), блокируя вовлечение миостатина его рецепторным комплексом и активируя последующую сигнализацию. Некоторые из ингибиторов миостатина встречаются в природе (пропептид миостатина, Gasp1, фоллистатин, Fstl3), тогда как другие являются сконструированными (антитело к миостатину, антитело к ActRIIB, ActRIIB-Fc).

[0087] Согласно конкретным вариантам реализации указанная дополнительная терапия включает обеспечение субъекта ингибитором DUX4 или ингибитором последующей относительно DUX4 мишени или гена, например, ингибитором, который ингибирует экспрессию мРНК DUX-4fl и/или белка DUX4 (или экспрессии мРНК или белка последующей относительно DUX4 мишени), или ингибитором, который ингибирует активность DUX4, например, его активность как транскрипционного активатора, или активность последующей относительно DUX4 мишени. Согласно конкретным вариантам реализации указанный ингибитор индуцирует разложение полипептида DUX4 или последующего относительно DUX4 целевого полипептида. Согласно конкретным вариантам реализации указанный ингибитор представляет собой миРНК, микроРНК, гРНК, мшРНК или антисмысловой олигонуклеотид, который специфически связывает последовательность нуклеиновой кислоты или антисмысловую последовательность DUX4 или последующего относительно DUX4 целевого гена. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения предложен способ лечения FSHD 1, FSHD2, ICF, ALS или IBM, где используют ингибиторы p38 для снижения экспрессии DUX4 и последующих генов и белков, которые могут быть скомбинированы с ингибитором DUX4 или последующей относительно DUX4 мишени, например, малой интерферирующей РНК (миРНК), малой шпилечной РНК (мшРНК), гидовой РНК (гРНК), микроРНК и антисмысловыми олигонуклеотидами, направленными на DUX4 и/или один или более последующих относительно DUX4 целевых транскриптов (например, ДНК или мРНК).

[0088] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложен способ применения низкомолекулярных ингибиторов киназы p38, например, ингибитора p38- α или p38- β для снижения экспрессии DUX4 и последующих генов в мышечных трубочках пораженных FSHD скелетных мышц для лечения FSHD или любого другого заболевания или расстройства согласно описанию в настоящем документе, и/или связанного с aberrантной экспрессией или активностью DUX4.

[0089] Согласно некоторым вариантам реализации p38, например, p38- α и/или p38- β , ингибирует любая из малых молекул или других агентов согласно описанию в настоящем документе.

[0090] Составы с ингибиторами p38 и/или другими агентами и композициями (например, ингибиторами), описанными в настоящем документе, могут быть получены любым способом, подходящим для требуемого маршрута введения (например, парентерального или перорального введения). Согласно некоторым вариантам реализации

приведение в контакт агента или композиции с клеткой и/или тканью представляет собой результат введения или обеспечения агента или композиции субъекту. Согласно некоторым вариантам реализации агент или композицию (например, ингибитор р38) вводят по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20 или более раз. Согласно некоторым вариантам реализации комбинированной терапии введение первого агента или композиции происходит после введения второго агента или композиции, или перекрывается с введением второго агента или композиции, или происходит одновременно с введением второго агента или композиции. Указанные первый и второй агент или композиция могут быть одинаковыми или разными. Согласно некоторым вариантам реализации указанные первый и второй агенты или композиции вводятся одним и тем же лицом и/или в одном и том же географическом местоположении. Согласно некоторым вариантам реализации указанные первый и второй агенты или композиции вводятся разными лицами и/или в разных географических местоположениях. Согласно некоторым вариантам реализации несколько агентов, описанных в настоящем документе, вводят в составе одной композиции.

[0091] Для ингибиторов р38 могут быть использованы разнообразные способы введения, согласующиеся со способами, раскрытыми в настоящем документе. Например, ингибиторы р38 могут быть введены или совместно введены местно, перорально, внутривенно, внутримышечно, внутривенно, внутриартериально, чрескожно, сублингвально, внутримышечно, ректально, трансбуккально, интраназально, липосомально, путем ингаляции, вагинально, интраокулярно, путем локальной доставки (например, с помощью катетера или стента), подкожно, интраадипозно, внутрисуставно, интратекально, трансмукозально, в легкие или парентерально, например, путем инъекции, в том числе подкожной, внутрикожной, внутримышечной, внутривенной, внутриартериальной, внутрисердечной, интратекальной, интраспинальной, интракапсулярной, субкапсулярной, интраорбитальной, внутривенной, внутритрахеальной, внутрикожной, внутрисуставной, субарахноидальной и интрастеральной; путем имплантации депо или резервуара, например, подкожно или внутримышечно.

[0092] «Субъекты» включают животных (например, млекопитающих, животных семейства свиней, рыб, птиц, насекомых и т.п.). Согласно некоторым вариантам реализации субъекты представляют собой млекопитающих, в частности, приматов, в частности, человека. Согласно некоторым вариантам реализации субъекты представляют собой домашний скот, такой как крупный рогатый скот, овцы, козы, коровы, свиньи, и т.п.; домашнюю птицу, например, куриц, уток, гусей, индеек и т.п.; и одомашненных животных, таких как собаки и кошки. Согласно некоторым вариантам реализации (например, в частности, в контексте исследований) субъекты представляют собой грызунов (например, мышей, крыс, хомяков), кроликов, приматов или животных семейства свиней, таких как инбредных свиней и т.п. Термины «субъект» и «пациент» используются в настоящем документе взаимозаменяемо.

[0093] «Ткань» представляет собой ансамбль аналогичных клеток единого

происхождения, совместно выполняющих специфическую функцию. Согласно некоторым вариантам реализации ткань представляет собой мышечную ткань.

[0094] Описанные здесь способы могут быть реализованы с применением любого агента, способного ингибировать экспрессию или активность гена или белка р38, например, ингибитора гена или белка р38- α или р38- β в том числе, но не ограничиваясь перечисленными, любых агентов согласно описанию в настоящем документе.

[0095] Согласно конкретным вариантам реализации способы согласно описанию в настоящем документе обеспечивают снижение уровня экспрессии или активности DUX4 и/или одного или более последующих относительно DUX4 генов в клетках или тканях (например, у субъекта), например, по сравнению с уровнем экспрессии или активностью в контрольных клетках или ткани, которые не приводили в контакт с ингибитором р38, или с референсным уровнем. «Снижение» относится к снижению по меньшей мере на 5%, например, по меньшей мере на 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 99 или 100%, например, по сравнению с референсным уровнем. Снижение также означает по меньшей мере 1-кратное снижение, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 500, 1000-кратное или более, например, по сравнению с уровнем референсных или контрольных клеток или ткани.

[0096] Способы, описанные в настоящем документе, могут быть реализованы с применением любого типа ингибитора, который обеспечивает снижение количества или уровня активного белка р38, например, в клетке или ткани, например, в клетке или ткани у субъекта. Согласно конкретным вариантам реализации ингибитор р38 вызывает понижение уровня активного белка р38 (например, активного р38- α и/или р38- β), понижение общего уровня белка р38 (например, общего уровня белка р38- α и/или р38- β), понижение уровня р38 мРНК (например, р38- α и/или р38- β мРНК) и/или понижение активности белка р38 (например, киназной активности р38- α и/или р38- β) в клетке или ткани, приведенной в контакт с ингибитором р38. Согласно конкретным вариантам реализации ингибитор р38 вызывает понижение активности или экспрессии р38- α и/или сигнального пути р38- β . Согласно некоторым вариантам реализации указанное понижение составляет по меньшей мере 5%, по меньшей мере 10%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80% или по меньшей мере 90% по сравнению с уровнем в том же типе клеток или ткани, которые не приводили в контакт с ингибитором р38. Способы измерения в клетке общих уровней белка р38, или уровней мРНК, или активности киназы р38 известны в данной области техники. Согласно некоторым вариантам реализации указанный ингибитор ингибирует или уменьшает активность или экспрессию р38, например, экспрессию мРНК и/или белка. Согласно некоторым вариантам реализации указанный ингибитор вызывает усиленное разложение белка р38, что приводит к меньшим количествам белка р38 в клетке или ткани. Конкретные способы могут также задействовать любой тип ингибитора экспрессии или активности DUX4 или последующего относительно DUX4 гена. В некоторых случаях указанный ингибитор

ингибирует белки и p38- α , и p38- β , тогда как в других случаях указанный ингибитор селективно или преимущественно ингибирует p38- α или p38- β . Согласно некоторым вариантам реализации указанный ингибитор не ингибирует p38- γ .

[0097] Ингибиторы, которые могут быть использованы для практической реализации раскрытых способов, включают, но не ограничиваясь указанными, агенты, которые ингибируют, или понижают, или снижают экспрессию или активность биомолекулы, (например, белка или нуклеиновой кислоты), например, но не ограничиваясь перечисленными, гена, мРНК или белка p38- α или p38- β . Согласно некоторым вариантам реализации ингибитор может вызывать усиленное разложение биомолекулы. Согласно конкретным вариантам реализации ингибитор может ингибировать биомолекулу конкурентным, бесконкурентным или неконкурентным способом. Примеры ингибиторов включают, не ограничиваясь перечисленными, нуклеиновые кислоты, ДНК, РНК, гРНК, мшРНК, миРНК, модифицированную мРНК (мРНК), микроРНК, белки, миметики белков, пептиды, пептидомиметики, антитела, малые молекулы, малые органические молекулы, неорганические молекул, химические вещества, аналоги, имитирующие сайт связывания фермента, рецептора или другого белка, например, вовлеченного в передачу сигналов, терапевтические агенты, фармацевтические композиции, лекарственные средства и комбинации перечисленного. Согласно некоторым вариантам реализации указанный ингибитор может представлять собой молекулу нуклеиновой кислоты, в том числе, но не ограничиваясь указанным, миРНК, которые уменьшают количество функционального белка в клетке. Соответственно, соединения или агенты, указанные как «способные ингибировать» конкретный белок, например, p38, включают ингибиторы любого типа. Согласно некоторым вариантам реализации ингибитор p38 или ингибитор DUX4 или последующего относительно DUX4 целевого гена представляет собой любой ингибитор из различных классов ингибиторов согласно описанию в настоящем документе, или любой другой.

[0098] Согласно конкретным вариантам реализации ингибитор p38 (или другой ингибитор) содержит нуклеиновую кислоту, которая связывается с геном или мРНК p38 (например, геном MAPK14 или MAPK11) (или другим целевым геном или мРНК). Соответственно, ингибитор - нуклеиновая кислота может содержать последовательность, комплементарную целевой последовательности полинуклеотидов, например, последовательности p38- α согласно описанию в настоящем документе, или ее область или антисмысловую последовательность. Согласно конкретным вариантам реализации ингибитор - нуклеиновая кислота содержит по меньшей мере 8, по меньшей мере 10, по меньшей мере 12, по меньшей мере 14, по меньшей мере 16, по меньшей мере 20, по меньшей мере 24, или по меньшей мере 30 последовательность нуклеотидов, соответствующую или комплементарную целевой последовательности полинуклеотидов или ее антисмысловой последовательности.

[0099] Согласно некоторым вариантам реализации ингибитор - нуклеиновая кислота представляет собой РНК-интерференцию или антисмысловой РНК-агент или его

часть, или миметик, или морфолиновый вариант, который снижает экспрессию целевого гена при введении в клетку. Как правило, ингибитор - нуклеиновая кислота содержит по меньшей мере часть целевой молекулы нуклеиновой кислоты или ее ортолог, или содержит по меньшей мере часть комплементарной цепи целевой молекулы нуклеиновой кислоты. Согласно некоторым вариантам реализации экспрессия целевого гена снижается на 10%, 25%, 50%, 75% или даже на 90-100%.

[0100] «Комплементарная» последовательность нуклеиновой кислоты представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты, способную к гибридизации с другой последовательностью нуклеиновой кислоты, состоящей из комплементарных пар нуклеиновых оснований. Под термином «гибридизоваться» понимают спаривание комплементарных нуклеотидных оснований с образованием двуцепочечной молекулы (например, аденин (A) образует пару оснований с тиминном (T), а гуанин (G) с цитозином (C) в ДНК) в подходящих жестких условиях. (См., например, Wahl, G. M. and S. L. Berger (1987) *Methods Enzymol.* 152:399; Kimmel, A. R. (1987) *Methods Enzymol.* 152:507).

[0101] «Антисмысловой» относится к последовательности нуклеиновой кислоты, независимо от ее длины, которая комплементарна некоторой последовательности нуклеиновой кислоты. Согласно некоторым вариантам реализации антисмысловая РНК относится к одноцепочечным молекулам РНК, которые могут быть введены в индивидуальную клетку, ткань или введены субъекту, и обеспечивает сниженную экспрессию целевого гена за счет механизмов, не основанных на эндогенных путях сайленсинга генов. Антисмысловая нуклеиновая кислота может содержать модифицированный остов, например, фосфотиоат, фосфодитиоат или другие, известные в данной области техники, или может содержать не встречающиеся в природе межнуклеозидные связи. Антисмысловая нуклеиновая кислота может содержать, например, закрытые нуклеиновые кислоты (ЗНК).

[0102] «РНК-интерференция» в настоящем документе относится к применению агентов, которые снижают экспрессию целевого гена путем разложения целевой мРНК за счет эндогенных путей сайленсинга генов (например, Dicer и индуцированный РНК комплекс сайленсинга (RISC)). РНК-интерференция может осуществляться с применением различных агентов, в том числе мшРНК и миРНК. «Малая шпилечная РНК», или «мшРНК» относится к двуцепочечной искусственной молекуле РНК со шпилечным изгибом, которая может быть использована для сайленсинга экспрессия целевого гена посредством РНК-интерференции (RNAi). Экспрессия мшРНК в клетках, как правило, осуществляется путем доставки плазмид или с помощью вирусных или бактериальных векторов. мшРНК представляет собой благоприятный посредник для РНК-интерференции, поскольку отличается относительно низкой скоростью разложения и оборота. Малая интерферирующая РНК (миРНК) представляет собой класс двуцепочечных HYPERLINK "<https://en.wikipedia.org/wiki/Molecule>" \o "Molecule" молекул РНК, обычно имеющих длину 20-25 пар оснований, аналогичных микроРНК, и функционирующих в пути РНК-интерференции (RNAi). миРНК взаимодействует с экспрессией специфических генов с

комплементарными последовательностями нуклеотидов путем разрушения мРНК после транскрипции, предотвращая трансляцию. Согласно некоторым вариантам реализации длина миРНК составляет 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24 нуклеотидов и она содержит «липкий конец» размером 2 основания на 3'-конце. миРНК могут быть введены в индивидуальную клетку и/или культуральную систему и приводят к разложению последовательностей целевых мРНК. «Морфолиновый вариант» в настоящем документе относится к модифицированному олигомеру нуклеиновой кислоты, в котором стандартные для нуклеиновых кислот основания связаны с морфолиновыми кольцами и соединены фосфородиамидатными связями. Аналогично миРНК и мшРНК, морфолиновые варианты связываются с комплементарными последовательностями мРНК. Однако морфолиновые варианты функционируют путем стерического ингибирования трансляции мРНК и изменения сплайсинга мРНК, а не нацеливания на комплементарные последовательности мРНК для их разложения.

[0103] Согласно некоторым вариантам реализации ингибитор - нуклеиновая кислота представляет собой матричную РНК, которая может быть введена в клетку, причем она кодирует полипептидный ингибитор р38 или другой мишени согласно описанию в настоящем документе. Согласно конкретным вариантам реализации указанная мРНК модифицирована, например, для повышения стабильности или снижения иммуногенности, например, путем включения одного или более модифицированных нуклеозидов. Подходящие модификации известны в данной области техники.

[0104] Согласно некоторым вариантам реализации ингибитор содержит экспрессионную кассету, которая кодирует полинуклеотидный или полипептидный ингибитор р38 или другой мишени согласно описанию в настоящем документе. Согласно конкретным вариантам реализации указанный экспрессионная кассета находится в векторе для генной терапии, например, вирусном векторе для генной терапии. Различные векторы для генной терапии, в том числе вирусные векторы для генной терапии, известны в данной области техники, включая, например, векторы для генной терапии на основе вируса AAV.

[0105] Согласно некоторым вариантам реализации ингибитор представляет собой полипептидный ингибитор. Согласно конкретным вариантам реализации полипептидный ингибитор связывается с целевым полипептидом, таким как р38, ингибируя таким образом его активность, например, киназную активность. Примеры полипептидных ингибиторов включают полипептиды любых типов (например, пептиды и белки), такие как антитела и их фрагменты.

[0106] «Антитело» представляет собой молекулу иммуноглобулина (Ig), способную к специфическому связыванию с мишенью, такой как углевод, полинуклеотид, липид или полипептид, через по меньшей мере один сайт распознавания эпитопов, локализованный в варибельной области молекулы Ig. В настоящем документе указанный термин охватывает не только интактные поликлональные или моноклональные антитела, однако также их фрагменты, такие как dAb, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, одноцепочечные фрагменты

(scFv), синтетические варианты, встречающиеся в природе варианты, слитые белки, содержащие часть антитела с антигенсвязывающим фрагментом, обладающим требуемой специфичностью, химерные антитела, нанотела и любые другие молекулы иммуноглобулинов с модифицированной конфигурацией, которые содержат сайт связывания антигена или фрагмент, обладающий требуемой специфичностью.

[0107] «Фрагмент» относится к части полипептида или молекулы нуклеиновой кислоты. Длина указанной части составляет, предпочтительно, по меньшей мере 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% от полной длины референсной молекулы нуклеиновой кислоты или полипептида. Фрагмент может содержать 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, или 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 или 1000 нуклеотидов или аминокислот. «Функциональный фрагмент» антитела представляет собой фрагмент, который сохраняет один или более видов активности указанного антитела, например, он связывает тот же эпитоп и/или обладает биологической активностью указанного антитела. Согласно конкретным вариантам реализации функциональный фрагмент содержит шесть CDR, присутствующих в указанном антителе.

[0108] Согласно некоторым вариантам реализации указанный ингибитор индуцирует разложение целевого полипептида, например, белка p38. Например, ингибиторы включают нацеливающие протеолиз химеры (PROTAC), которые индуцируют селективный внутриклеточный протеолиз целевых белков. PROTAC содержат функциональные домены, которые могут представлять собой ковалентно связанные связывающие белки молекулы: одна из них способна задействовать убиквитинлигазу E3, а другая связывается с целевым белком, разложение которого требуется осуществить. Рекрутинг лигазы E3 к целевому белку приводит к убиквитинированию и последующему разложению указанного целевого белка протеасомой. Согласно конкретным вариантам реализации ингибитор представляет собой PROTAC, нацеленный на белок p38 (например, p38- α и/или p38- β).

[0109] Согласно некоторым вариантам реализации ингибитор представляет собой низкомолекулярный ингибитор или его стереоизомер, энантиомер, диастереоизомер, изотопно-обогащенное соединение, пролекарство или фармацевтически приемлемую соль. Согласно конкретным вариантам реализации ингибитор p38 ингибирует p38- α и/или p38- β . Согласно конкретным вариантам реализации он значимо не ингибирует p38- γ . Согласно конкретным вариантам реализации низкомолекулярный ингибитор p38 включает, не ограничиваясь перечисленными, любые из низкомолекулярных соединений, описанных в настоящем документе, включая показанные на фиг. 12B, но не ограничиваясь ими. Различные ингибиторы p38 известны и доступны; некоторые находятся в клинической разработке. Могут быть использованы любые из указанных ингибиторов. Они включают, не ограничиваясь перечисленными, ARRY-797, VX-745, VX-702, RO-4402257, SCIO-469, BIRB-796, SD-0006, PH-797804, AMG-548, LY2228820, SB-681323 и GW-856553. Иллюстративные ингибиторные соединения также включают, не ограничиваясь перечисленными:

N-(4-(2-этил-4-(м-толил)тиазол-5-ил)пиридин-2-ил)бензамид;
 2-(2,4-дифторфенил)-6-(1-(2,6-дифторфенил)уреидо)никотинамид;
 6-(2,4-дифторфенокси)-8-метил-2-((тетрагидро-2H-пиран-4-ил)амино)пиридо[2,3-d]пиримидин-7(8H)-он;
 6-(2,4-дифторфенокси)-2-((1,5-дигидроксипентан-3-ил)амино)-8-метилпиридо[2,3-d]пиримидин-7(8H)-он;
 (R)-6-(2-(4-фторфенил)-6-(гидроксиметил)-4,5,6,7-тетрагидропиразоло[1,5-a]пиримидин-3-ил)-2-(о-толил)пиридазин-3(2H)-он;
 6-(5-(циклопропилкарбамоил)-3-фтор-2-метилфенил)-N-неопентилникотинамид;
 5-(2-(трет-бутил)-4-(4-фторфенил)-1H-имидазол-5-ил)-3-неопентил-3H-имидазо[4,5-b]пиридин-2-амин;
 2-(6-хлор-5-((2R,5S)-4-(4-фторбензил)-2,5-диметилпиперазин-1-карбонил)-1-метил-1H-индол-3-ил)-N, N-диметил-2-оксоацетамид;
 1-(3-(трет-бутил)-1-(п-толил)-1H-пиразол-5-ил)-3-(4-(2-морфолиноэтокси)нафтален-1-ил)мочевина;
 4-((5-(циклопропилкарбамоил)-2-метилфенил)амино)-5-метил-N-пропилпирроло[2,1-f][1,2,4]триазин-6-карбоксамид;
 3-(3-бром-4-((2,4-дифторбензил)окси)-6-метил-2-оксопиридин-1(2H)-ил)-N,4-диметилбензамид;
 1-(3-(трет-бутил)-1-(п-толил)-1H-пиразол-5-ил)-3-(5-фтор-2-((1-(2-гидроксиэтил)-1H-индазол-5-ил)окси)бензил)мочевину;
 8-(2,6-дифторфенил)-2-((1,3-дигидроксипропан-2-ил)амино)-4-(4-фтор-2-метилфенил)пиридо[2,3-d]пиримидин-7(8H)-он;
 5-(2,6-дихлорфенил)-2-((2,4-дифторфенил)тио)-6H-пиримидо[1,6-b]пиридазин-6-он;
 (5-(2,4-дифторфенокси)-1-изобутил-1H-индазол-6-ил)((2-(диметиламино)этил)-12-азанеил)метанон; и
 (R)-2-((2,4-дифторфенил)амино)-7-(2,3-дигидроксипропоксид)-10,11-дигидро-5H-добензо[а, d][7]аннулен-5-он.

[0110] Определенные ингибиторные соединения согласно настоящему изобретению могут существовать в стереоизомерных формах (например, они могут содержать один или более асимметрических атомов углерода или могут проявлять цис-транс-изомерию). Некоторые соединения могут включать более одного асимметрического атома углерода. «Стереоизомер» относится к соединению, которое отличается ориентацией (R/S) относительно одного или более асимметрических атомов углерода, или отличается ориентацией (цис:транс) относительно двойной связи. Термин стереоизомер может также охватывать атропоизомеры, которые возникают из-за затрудненного вращения относительно одинарной связи, например, в соединениях, содержащих замещенный бифенильный фрагмент. «Энантиомер» представляет собой соединение, которое является зеркальным отражением другого соединения, т.е. все асимметрические

атомы углерода энантиомера находятся в противоположной ориентации (R/S) относительно другого соединения. «Диастереоизомер» представляет собой соединение, которое не является зеркальным отражением другого соединения, однако включает один или более асимметрических атомов углерода в противоположной ориентации (R/S) относительно другого соединения. Варианты реализации настоящего изобретения могут включать смеси стереоизомеров или могут включать один стереоизомер. Одиночные энантиомеры или диастереомеры могут быть получены из хиральных реагентов, или с применением стереоселективных или стереоспецифических методик синтеза. Как вариант, одиночные энантиомеры или диастереомеры могут быть выделены из смесей с использованием стандартных методик хиральной хроматографии или кристаллизации. «Изотопно-обогащенный» относится к соединению, отличающемуся тем, что один или более атомов обогащен по изотопу в степени, превышающей его относительное содержание в природе. Например, относительное содержание дейтерия в природе составляет 0,015%. Специалисту в данной области техники будет понятно, что во всех химических соединениях с атомом H указанный атом H фактически представляет собой смесь H и D, причем приблизительно 0,015% представлено D. Изотопно-обогащенное соединение может содержать один или более специфических химических сайтов, отличающихся отношением H/D, превышающим 0,015%. Изотопно-обогащенное соединение может называться «меченым изотопом».

[0111] Согласно некоторым вариантам реализации указанный ингибитор содержит один или более компонентов системы редактирования генома. В настоящем документе термин «система редактирования генома» относится к белку, нуклеиновой кислоте или их комбинации, способным модифицировать целевой локус эндогенной последовательности ДНК при введении в клетку. Многочисленные системы редактирования генома, подходящие для применения в способах согласно настоящему изобретению, известны в данной области техники, и включают в том числе, но не ограничиваясь перечисленными, системы нуклеаз с цинковыми пальцами, системы TALEN и системы CRISPR/Cas.

[0112] Согласно некоторым вариантам реализации система редактирования генома, используемая в способах, описанных в настоящем документе, представляет собой систему CRISPR (кластерные короткие палиндромные повторы, разделенные регулярными промежутками)/Cas (CRISPR-ассоциированная) нуклеаза, представляющую собой систему сконструированных нуклеаз на основе бактериальной системы, которая может быть использована для конструирования генома млекопитающих. Обычно указанная система содержит CRISPR-ассоциированную эндонуклеазу (например, эндонуклеазу Cas) и гидовую РНК (гРНК). гРНК состоит из двух частей; crispr-РНК (crRNA), специфической в отношении целевой последовательности геномной ДНК, и транс-активирующей РНК (tracrRNA), которая облегчает связывание эндонуклеазы с ДНК в целевом сайте инсерции. Согласно некоторым вариантам реализации указанные crRNA и tracrRNA могут входить в состав одного РНК-олигонуклеотида, называемого одиночной гидовой РНК (огРНК). Согласно некоторым вариантам реализации указанные crRNA и tracrRNA могут быть

представлены отдельными РНК-олигонуклеотидами. Согласно таким вариантам реализации указанная гРНК состоит из олигонуклеотида crRNA и олигонуклеотида tracrRNA, которые связываются с образованием дуплекса crRNA:tracrRNA. В настоящем документе термин «гидовая РНК» или «гРНК» относится к комбинации tracrRNA и crRNA, представленных в виде либо оРНК, либо дуплекса crRNA:tracrRNA.

[0113] Согласно некоторым вариантам реализации системы CRISPR/Cas содержат белок Cas, crRNA и tracrRNA. Согласно некоторым вариантам реализации указанные crRNA и tracrRNA скомбинированы с получением дуплексной молекулы РНК, образуя гРНК. Согласно некоторым вариантам реализации указанный дуплекс crRNA:tracrRNA получают *in vitro* перед введением в клетку. Согласно некоторым вариантам реализации указанные crRNA и tracrRNA вводят в клетку в виде отдельных молекул РНК, а дуплекс crRNA:tracrRNA затем формируется внутри клетки. Согласно некоторым вариантам реализации предложены полинуклеотиды, кодирующие указанные crRNA и tracrRNA. Согласно таким вариантам реализации полинуклеотиды, кодирующие crRNA и tracrRNA, вводят в клетку, а затем молекулы указанных crRNA и tracrRNA транскрибируются внутри клетки. Согласно некоторым вариантам реализации указанные crRNA и tracrRNA кодируют единственные полинуклеотиды. Согласно некоторым вариантам реализации указанные crRNA и tracrRNA кодируют отдельные полинуклеотиды.

[0114] Согласно некоторым вариантам реализации эндонуклеаза Cas направлена на целевой сайт инсерции за счет специфичности последовательности crRNA-части гРНК, которая может включать последовательность протоспейсерного мотива (PAM) возле указанного целевого сайта инсерции. Различные последовательности PAM, подходящие для применения с конкретной эндонуклеазой (например, эндонуклеазой Cas9), известны в данной области техники (см., например, источники: Nat Methods. 2013 Nov; 10(11): 1116-1121 и Sci Rep. 2014; 4: 5405).

[0115] Специфичность гРНК в отношении целевого локуса опосредована последовательностью crRNA, которая содержит последовательность длиной приблизительно 20 нуклеотидов, комплементарных последовательности ДНК в целевом локусе, например, комплементарных последовательности ДНК p38- α или p-38- β . Согласно некоторым вариантам реализации последовательности crRNA, используемые в способах согласно настоящему изобретению, по меньшей мере на 90% комплементарны последовательности ДНК целевого локуса. Согласно некоторым вариантам реализации последовательности crRNA, используемые в способах согласно настоящему изобретению, по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% комплементарны последовательности ДНК целевого локуса. Согласно некоторым вариантам реализации последовательности crRNA, используемые в способах согласно настоящему изобретению, на 100% комплементарны последовательности ДНК целевого локуса, например, гена MAPK14 или MAPK11. Согласно некоторым вариантам реализации последовательности crRNA, описанные в настоящем документе, разработаны для минимизации нецелевого связывания, с применением алгоритмов, известных в данной области техники (например,

алгоритма Cas-OFFinder), для идентификации целевых последовательностей, уникальных для конкретного целевого локуса или целевого гена.

[0116] Согласно некоторым вариантам реализации указанная эндонуклеаза представляет собой белок или ортолог Cas. Согласно некоторым вариантам реализации указанный эндонуклеаза представляет собой белок Cas9. Согласно некоторым вариантам реализации указанный белок Cas9 происходит из *Streptococcus pyogenes* (например, SpCas9), *Staphylococcus aureus* (например, SaCas9) или *Neisseria meningitidis* (NmeCas9). Согласно некоторым вариантам реализации указанная эндонуклеаза Cas представляет собой белок Cas9 или ортолог Cas9 и выбрана из группы, состоящей из SpCas9, SpCas9-HF1, SpCas9-HF2, SpCas9-HF3, SpCas9-HF4, SaCas9, FnCpf, FnCas9, eSpCas9 и NmeCas9. Согласно некоторым вариантам реализации указанная эндонуклеаза выбрана из группы, состоящей из C2C1, C2C3, Cpf1 (также называемой Cas12a), Cas1, Cas1B, Cas2, Cas3, Cas4, Cas5, Cas6, Cas7, Cas8, Cas9 (также известной как Csn1 и Csx12), Cas10, Csy1, Csy2, Csy3, Cse1, Cse2, Cse1, Cse2, Csa5, Csn2, Csm2, Csm3, Csm4, Csm5, Csm6, Cmr1, Cmr3, Cmr4, Cmr5, Cmr6, Csb1, Csb2, Csb3, Csx17, Csx14, Csx10, Csx16, CsaX, Csx3, Csx1, Csx15, Csf1, Csf2, Csf3 и Csf4. Согласно некоторым вариантам реализации указанная Cas9 представляет собой никазный мутант Cas9. Никазные мутанты Cas9 содержат только один каталитически активный домен (либо домен HNH, либо домен RuvC).

[0117] Согласно конкретным аспектам настоящее изобретение включает композиции, например, фармацевтические композиции, содержащие ингибитор p38, в том числе любые из различных классов ингибиторов, описанных в настоящем документе. Настоящим изобретением охвачены фармацевтические композиции, содержащие ингибитор p38 и фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или эксципиент. Любое инертное эксципиент, обычно используемое в качестве носителя или разбавителя, может быть использовано в композициях согласно настоящему изобретению, например, сахара, многоатомные спирты, растворимые полимеры, соли и липиды. Сахара и многоатомные спирты, которые могут быть использованы, включают, без ограничения, лактозу, сахарозу, маннит и сорбит. Иллюстративными примерами растворимых полимеров, которые могут быть использованы, являются полиоксиэтилен, полочсамеры, поливинилпирролидон и декстран. Подходящие соли включают, без ограничения, хлорид натрия, хлорид магния и хлорид кальция. Липиды, которые могут быть использованы, включают, без ограничения, жирные кислоты, сложные эфиры жирных кислот и глицерина, гликолипиды и фосфолипиды.

[0118] Кроме того, указанные фармацевтические композиции могут дополнительно содержать связующие вещества (например, аравийскую камедь, кукурузный крахмал, желатин, карбомер, этилцеллюлозу, гуаровую камедь, гидроксипропилцеллюлозу, гидроксипропилметилцеллюлозу, повидон), агенты для улучшения распадаемости (например, кукурузный крахмал, картофельный крахмал, альгиновую кислоту, диоксид кремния, кроскармеллозу натрия, кросповидон, гуаровую камедь, натрия крахмал гликолят, примогель), буферы (например, трис-HCL, ацетатный, фосфатный) с

различными значениями рН и ионной силы, добавки, такие как альбумин или желатин, для предотвращения абсорбции на поверхностях, детергенты (например, Tween 20, Tween 80, плюроник F68, соли желчных кислот), ингибиторы протеазы, поверхностно-активные вещества (например, лаурилсульфат натрия), усилители проницаемости, солюбилизующие агенты (например, глицерин, полиэтилен глицерина, циклодекстрины), скользящее вещество (например, коллоидный диоксид кремния), антиоксиданты (например, аскорбиновую кислоту, метабисульфит натрия, бутилированный гидроксианизол), стабилизаторы (например, гидроксипропилцеллюлозу, гидроксипропилметилцеллюлозу), увеличивающие вязкость агенты (например, карбомер, коллоидный диоксид кремния, этилцеллюлозу, гуаровую камедь), подсластители (например, сахароза, аспартам, лимонную кислоту), вкусоароматические агенты (например, перечную мяту, метилсалицилат или апельсиновый ароматизатор), консерванты (например, тимеросал, бензиловый спирт, парабены), смазывающие вещества (например, стеариновую кислоту, стеарат магния, полиэтиленгликоль, лаурилсульфат натрия), агенты для увеличения текучести (например, коллоидный диоксид кремния), пластификаторы (например, диэтилфталат, триэтилцитрат), эмульгаторы (например, карбомер, гидроксипропилцеллюлозу, лаурилсульфат натрия, метилцеллюлозу, гидроксиэтилцеллюлозу, карбоксиметилцеллюлозу натрия), полимерные покрытия (например, полоксамеры или полоксамины), образующие покрытия и пленки агенты (например, этилцеллюлозу, акрилаты, полиметакрилаты) и/или адьюванты.

[0119] Согласно одному варианту реализации получают фармацевтические композиции с носителями, которые защищают ингибитор р38 от быстрой элиминации из организма, такие как состав для контролируемого высвобождения, в том числе имплантаты и микроинкапсулированные системы доставки. Могут быть использованы биоразлагаемые, биосовместимые полимеры, такие как этиленвинилацетат, полиангидриды, полигликолевая кислота, коллаген, полиортоэферы и полимолочная кислота. Способы получения таких составы очевидны специалистам в данной области техники. Указанные материалы могут также быть приобретены у Alza Corporation и Nova Pharmaceuticals, Inc. Липосомальные суспензии (в том числе липосомы, нацеленные на инфицированные клетки, с моноклональными антителами к вирусным антигенам) могут также быть использованы в качестве фармацевтически приемлемых носителей. Указанные суспензии могут быть получены в соответствии со способами, известными специалистам в данной области техники, например, согласно описанию в патенте США №4522811.

[0120] Кроме того, настоящим изобретением охвачены фармацевтические композиции, содержащие любую твердую или жидкую физическую форму ингибитора р38. Например, ингибитор р38 может находиться в кристаллической форме, в аморфной форме, и содержать частицы любого размера. Частицы могут быть микронизированы, или могут быть агломерированы, представлены дисперсными гранулами, порошками, маслами, масляными суспензиями или любой другой твердой или жидкой физической формой.

[0121] В тех случаях, когда ингибиторы р38 проявляют недостаточную растворимость, могут быть использованы способы солюбилизации указанных соединений. Такие способы известны специалистам в данной области техники, и включают, не ограничиваясь перечисленными, коррекцию рН и получение солей, применение соразтворителей, таких как этанол, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль (ПЭГ) 300, ПЭГ 400, ДМА (10-30%), ДМСО (10-20%), NMP (10-20%), применение поверхностно-активных веществ, таких как полисорбат 80, полисорбат 20 (1-10%), кремофор EL, кремофор RH40, кремофор RH60 (5-10%), плуроник F68/полоксамер 188 (20-50%), солютол HS15 (20-50%), витамин E TPGS и d-а-токоферил- ПЭГ 1000 сукцинат (20-50%), применение комплексообразования, например, с HP β -CD и SBE β -CD (10-40%), а также применение передовых подходов, например, мицелл, добавление полимера, суспензии наночастиц и получение липосом.

[0122] Ингибиторы р38 могут также быть введены или совместно введены в лекарственных формах для медленного высвобождения. Ингибиторы р38 могут быть представлены в газообразной, жидкой, полужидкой или твердой форме, в составе, подходящем для предполагаемого маршрута введения. В случае перорального введения подходящие для применения твердые составы включают таблетки, капсулы, пилюли, гранулы, пеллеты, саше и шипучие формы, порошки и т.п. Подходящие жидкие составы для перорального применения включают растворы, суспензии, дисперсии, сиропы, эмульсии, масла и т.п. В случае парентерального введения, как правило, проводят восстановление лиофилизированного порошка.

[0123] Подходящие дозы ингибиторов р38 для применения в лечении заболеваний или расстройств, описанных в настоящем документе, могут быть определены специалистами в соответствующей области техники. Терапевтические дозы обычно идентифицируют с помощью исследования диапазона доз на людях, основанного на предварительных данных, полученных в исследованиях на животных. Дозы должны быть достаточными для того, чтобы приводить к требуемому благоприятному терапевтическому эффекту, не вызывая нежелательных побочных эффектов. Способ введения, лекарственные формы и подходящие фармацевтические эксципиенты могут также быть часто употребляемыми и могут легко быть скорректированы специалистами в данной области техники. Все изменения и модификации включены в объем настоящей патентной заявки.

[0124] Согласно некоторым вариантам реализации настоящим изобретением охвачены единичные лекарственные формы фармацевтической композиции, содержащие агент, который ингибирует экспрессию или активность полипептида р38 (или приводит к снижению уровней активного белка р38), и фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или эксципиент, при этом указанная единичная лекарственная форма эффективна для снижения экспрессии полипептида DUX4 или полипептида, кодируемого последующим целевым геном DUX4, в одной или более тканях у субъекта, которому вводят указанную единичную лекарственную форму. Согласно некоторым вариантам

реализации указанный последующий целевой ген представляет собой MBD3L2, ZSCAN4, LEUTX, PRAMEF2, TRIM43 или KHDC1L. Согласно некоторым вариантам реализации указанный последующий целевой ген представляет собой RFPL2, CCNA1, SLC34A2, TPRX1, KHDC1L, ZSCAN4, PRAMEF20, TRIM49, PRAMEF4, PRAME6, PRAMEF15 или ZNF280A. Согласно некоторым вариантам реализации указанная ткань представляет собой мышечную ткань. Согласно некоторым вариантам реализации указанная ткань является терминально дифференцированной, например, терминально дифференцированной мышечной тканью. Согласно некоторым вариантам реализации указанная ткань содержит клетки, содержащие мутацию, ассоциированную с плече-лопаточно-лицевой мышечной дистрофией (FSHD). Согласно конкретным вариантам реализации указанный агент связывает полипептид р38 (например, р38- α или р38- β) или связывает полинуклеотид, кодирующий указанный полипептид р38. Согласно некоторым вариантам реализации указанный агент содержит нуклеиновую кислоту или состоит из нуклеиновой кислоты, которая необязательно представляет собой ДНК, РНК, модифицированную мРНК (ммРНК), мшРНК, миРНК, гидовую РНК (гРНК), микроРНК или антисмысловой олигонуклеотид. Согласно другим вариантам реализации указанный агент содержит полипептид или состоит из полипептида, необязательно, белка, пептида, миметика белка, пептидомиметика, или антитела или его функционального фрагмента. Согласно другим вариантам реализации указанный агент содержит: малую молекулу, необязательно, органическую молекулу или неорганическую молекулу. Согласно другим вариантам реализации указанный агент содержит кассету для генной экспрессии, необязательно, вектор для генной терапии, которые экспрессирует полинуклеотидный или полипептидный агент, ингибирующий экспрессию или активность полипептида р38.

[0125] Согласно конкретным вариантам реализации указанные единичные лекарственные формы содержат эффективное количество, эффективную концентрацию и/или ингибиторную концентрацию ингибитора р38 для лечения заболевания или расстройства, ассоциированного с повышенной активностью или экспрессией DUX4 и/или последующего целевого гена DUX4, в том числе любых заболеваний или расстройств согласно описанию в настоящем документе, например, FSHD.

[0126] «Фармацевтические композиции» включают композиции одного или более агентов, которые могут быть введены или доставлены субъекту и/или в клетку для предотвращения и/или лечения конкретного заболевания или расстройства.

[0127] «Фармацевтически приемлемый» в настоящем документе относится к соединениям, материалам, композициям и/или лекарственным формам, которые, согласно здоровой медицинской оценке, подходят для применения, подразумевающего контакт с тканями человека и животных, без возникновения излишней токсичности, раздражения, аллергического ответа или другой проблемы или осложнения, соответствующие целесообразному отношению преимуществ и риска.

[0128] «Фармацевтически приемлемый носитель» включает, без ограничения, любой адъювант, носитель, эксципиент, скользящее вещество, подслащивающий агент,

разбавитель, консервант, пигмент/краситель, усилитель вкуса и запаха, поверхностно-активное вещество, смачивающий агент, диспергирующий агент, суспендирующий агент, стабилизатор, изотонический агент, растворитель, поверхностно-активное вещество и/или эмульгатор, одобренный Управлением по контролю пищевых продуктов и лекарственных средств США в качестве приемлемого для применения у человека и/или домашних животных. Примеры фармацевтически приемлемых носителей включают, не ограничиваясь перечисленными, сахара, такие как лактоза, глюкоза и сахароза; крахмалы, такие как кукурузный крахмал и картофельный крахмал; целлюлозу и ее производные, такие как карбоксиметилцеллюлоза натрия, этилцеллюлоза и ацетат целлюлозы; трагакант; солод; желатин; тальк; масло какао, воски, животные и растительные жиры, парафины, силиконы, бентониты, кремниевую кислоту, оксид цинка; масла, такие как арахисовое масло, хлопковое масло, сафлоровое масло, кунжутное масло, оливковое масло, кукурузное масло и соевое масло; гликоли, такие как пропиленгликоль; полиолы, такие как глицерин, сорбит, маннит и полиэтиленгликоль; сложные эфиры, такие как этилолеат и этиллаурат; агар-агар; буферные агенты, такие как гидроксид магния и гидроксид алюминия; альгиновую кислоту; апирогенную воду; изотонический солевой раствор; раствор Рингера; этиловый спирт; фосфатные буферные растворы; и любые другие совместимые вещества, используемые в фармацевтических составах. За исключением случаев, когда какая-либо стандартная среда и/или какой-либо стандартный агент несовместимы с агентами согласно настоящему описанию, предусмотрено их применение в терапевтических композициях. Также в указанные композиции могут быть включены дополнительные активные ингредиенты.

[0129] «Эффективное количество» в настоящем документе относится к количеству агента, эффективному для достижения конкретного эффекта, например, снижения уровня мРНК DUX4-fl или белка DUX4, или одного или более последующих относительно DUX4 целевых мРНК или белков в клетке, ткани, органе или у субъекта. В контексте терапевтического лечения субъекта эффективное количество может представлять собой, например, количество, эффективное или достаточное для уменьшения одного или более симптомов заболевания у субъекта, например, субъекта с FSHD. Согласно некоторым вариантам реализации указанное уменьшение составляет по меньшей мере 10%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60% или по меньшей мере 70% по сравнению с величиной до лечения или в отсутствие лечения.

[0130] «Эффективная концентрация» в настоящем документе относится к минимальной концентрации (масса/объем) агента и/или композиции, которая требуется для обеспечения конкретного физиологического эффекта. В настоящем документе эффективная концентрация, как правило, относится к концентрации агента, которая требуется для увеличения, активации и/или усиления конкретного физиологического эффекта.

[0131] «Ингибиторная концентрация». «Ингибиторная концентрация» представляет

собой минимальную концентрацию (масса/объем) агента, которая требуется для ингибирования конкретного физиологического эффекта. В настоящем документе ингибиторная концентрация, как правило, относится к концентрации агента, которая требуется для снижения, ингибирования и/или подавления конкретного физиологического эффекта.

[0132] Согласно некоторым вариантам реализации агент или соединение, описанные в настоящем документе, могут вводиться в дозировке от приблизительно 1 мг/кг до приблизительно 300 мг/кг. Согласно другому варианту реализации агент или соединение, описанные в настоящем документе, могут вводиться в дозировке от приблизительно 1 мг/кг до приблизительно 20 мг/кг. Например, указанные агент или соединение могут быть введены субъекту в дозировке 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 мг/кг, или в дозировке в диапазоне между любыми указанными значениями, например, от приблизительно 10 мг/кг до приблизительно 15 мг/кг, от приблизительно 6 мг/кг до приблизительно 12 мг/кг, и т.п. Согласно другому варианту реализации агент или соединение, описанные в настоящем документе, вводят в дозировке ≤ 15 мг/кг. Например, агент или соединение могут быть введены в дозировке 15 мг/кг в сутки в течение 7 дней, что составляет в общей сложности 105 мг/кг в неделю. Например, соединение может вводиться в дозировке 10 мг/кг два раза в сутки в течение 7 дней, что составляет в общей сложности 140 мг/кг в неделю.

[0133] Согласно многим вариантам реализации дозировки, описанные в настоящем документе, могут относиться к однократной дозировке, ежедневной дозировке или еженедельной дозировке. Согласно одному варианту реализации агент или соединение может вводиться один раз в сутки. Согласно другому варианту реализации соединение может вводиться два раза в сутки. Согласно некоторым вариантам реализации агент или соединение может вводиться три раза в сутки. Согласно некоторым вариантам реализации соединение может вводиться четыре раза в сутки. Согласно некоторым вариантам реализации агент или соединение, описанные в настоящем документе, могут вводиться 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24 раза в неделю. Согласно другим вариантам реализации указанное соединение вводят один раз в две недели.

[0134] Согласно некоторым вариантам реализации агент или соединение, описанные в настоящем документе, могут вводиться перорально. Согласно некоторым вариантам реализации агент или соединение, описанные в настоящем документе, могут быть введены перорально в дозировке ≤ 15 мг/кг один раз в сутки.

[0135] Фактическая использованная дозировка может варьировать в зависимости от потребностей пациента и тяжести состояния, лечение которого проводят. Определение надлежащей схемы дозирования для конкретной ситуации известно на существующем уровне техники. Для удобства общая суточная дозировка может быть разделена и введена по частям в течение дня по мере необходимости.

[0136] Схему дозирования при использовании предложенного соединения

выбирают исходя из различных факторов, включающих тип, вид, возраст, массу тела, пол и медицинское состояние пациента; тяжесть состояния, подлежащего лечению; маршрут введения; функции почек или печени пациента; и конкретное используемое предложенное соединение. Специалист в данной области техники, лечащий врач или ветеринар может легко определить и назначить эффективное количество лекарственного средства, требуемое для предотвращения, противодействия или остановки прогрессирования указанного состояния.

[0137] Количество и частота введения соединений согласно настоящему изобретению и/или их фармацевтически приемлемых солей регулируются в соответствии с решением лечащего врача, с учетом таких факторов, как возраст, состояние и размер пациента, а также степень тяжести симптомов, подлежащих лечению.

[0138] Согласно некоторым аспектам настоящее изобретение относится к способам, применяемым для скрининга с целью идентификации мишеней лекарственных средств с использованием малых молекул и/или геномных инструментов (например, малой интерферирующей РНК (миРНК), малой шпилечной РНК (мшРНК), микроРНК, антисмысловых олигонуклеотидов и генно-терапевтических вирусов), которые снижают экспрессию и/или активность DUX4 и последующих транскриптов, MBD3L2, в пораженных FSHD мышечных трубочках. Согласно конкретным вариантам реализации указанные способы включают приведение мышечной трубочки, содержащей пораженные FSHD клетки, например, клетки с FSHD1- и/или FSHD2-дефектом (например, мутацией), в контакт с одним или более кандидатными агентами, с последующим определением того, происходит ли в мышечных трубочках, приведенных в контакт с указанным кандидатным агентом, снижение активности DUX4, снижение уровней мРНК или белка DUX4, снижение активности одного или более последующих генов, регулируемых DUX4; или снижение уровней одного или более последующих генов, регулируемых DUX4, по сравнению с указанными уровнями в мышечных трубочках, приведенных в контакт с отрицательным контролем, например, только основой. Затем идентифицируют кандидатные агенты, ассоциированные со снижением активности или уровней экспрессии DUX4 и/или последующего относительно DUX4 гена, и могут быть идентифицированы мишени, которые они модулируют. Например, в случае миРНК, целевой миРНК, ассоциированной со снижением экспрессии DUX4 и/или последующего целевого гена DUX4, идентифицируют в качестве мишени лекарственного средства для лечения заболеваний или расстройств, ассоциированных с aberrантной экспрессией DUX4 и/или последующего целевого гена DUX4, в том числе любых описанных в настоящем документе заболеваний или расстройств, например, FSHD. Аналогичным образом, в случае малых молекул мишень лекарственного средства малой молекулы, ассоциированной со снижением активности или экспрессии DUX4 и/или последующего целевого гена DUX4, идентифицируют в качестве мишени лекарственного средства для лечения заболеваний или расстройств, ассоциированных с aberrантной экспрессией DUX4 и/или последующего целевого гена DUX4, в том числе любых описанных в

настоящем документе заболеваний или расстройств, например, FSHD. Согласно некоторым вариантам реализации указанные способы могут быть реализованы путем оценки физического или качественного свойства мышечных трубочек с целью идентификации кандидатного агента и его мишени, которые могут быть использованы для улучшения указанного физического или качественного свойства мышечных трубочек, с идентификацией таким образом мишени в качестве терапевтической мишени для лечения заболеваний или расстройств, ассоциированных с aberrантной экспрессией DUX4 и/или последующего целевого гена DUX4, в том числе любых описанных в настоящем документе заболеваний или расстройств, например, FSHD.

[0139] Согласно некоторым вариантам реализации настоящее изобретение включает способ идентификации агента, который ингибирует экспрессию белка DUX4 или ингибирует экспрессию белка, кодируемого последующим целевым геном DUX4, при этом указанный способ включает: приведение мышечной трубочки, полученной из клеток, ассоциированных с плече-лопаточно-лицевой мышечной дистрофией (FSHD), в контакт с кандидатным агентом; и определение уровня экспрессии белка DUX4, полинуклеотида, кодирующего белок DUX4, последующего целевого гена DUX4 или полинуклеотида, кодирующего последующий целевой ген DUX4, в указанной мышечной трубочке, при этом указанный кандидатный агент идентифицирован как агент, который ингибирует экспрессию белка DUX4 или белка, кодируемого последующим целевым геном, если уровень экспрессии, определенный после указанного приведения в контакт, снижается по сравнению с уровнем экспрессии белка DUX4 или белка, кодируемого последующим целевым геном, в мышечной трубочке, полученной из клеток, ассоциированных с FSHD, которые не приводили в контакт с кандидатным агентом или приводили в контакт с агентом для отрицательного контроля.

[0140] Согласно определенным вариантам реализации любых из способов, описанных в настоящем документе, указанный кандидатный агент может быть представлен ингибиторами любого класса согласно описанию в настоящем документе, в том числе малыми молекулами, полипептидами и нуклеиновыми кислотами, например, указанный кандидатный агент содержит нуклеиновую кислоту или состоит из нуклеиновой кислоты, которая необязательно представляет собой ДНК, РНК, гРНК, мшРНК, микроРНК, миРНК или антисмысловый олигонуклеотид; содержит полипептид или состоит из полипептида, необязательно, белка, пептида, миметика белка, пептидомиметика, вектора для генной терапии, или антитела или его функционального фрагмента; или содержит малую молекулу состоит из малой молекулы, необязательно, органической молекулы или неорганической молекулы.

[0141] Согласно определенным вариантам реализации любых из указанных способов последующий целевой ген представляет собой, например, MBD3L2, ZSCAN4, LEUTX, PRAMEF2, TRIM43 или KHDC1L. Согласно некоторым вариантам реализации указанный последующий целевой ген представляет собой, например, ZSCAN4, LEUTX, PRAMEF2, TRIM43, MBD3L2, KHDC1L, RFPL2, CCNA1, SLC34A2, TPRX1, PRAMEF20,

TRIM49, PRAMEF4, PRAME6 или PRAMEF15.

[0142] Согласно некоторым вариантам реализации любые из способов, описанных в настоящем документе, осуществляют путем скрининга библиотеки потенциальных кандидатных агентов. Согласно некоторым вариантам реализации указанные способы осуществляют с использованием анализов с высокой пропускной способностью.

[0143] Согласно некоторым вариантам реализации указанные способы осуществляют с применением зрелых пораженных FSHD полученных от пациентов мышечных трубочек.

[0144] Согласно одному варианту реализации используют библиотеку малых молекул для скрининга на целевые модификаторы экспрессии или активности DUX4 или последующих целевых генов в пораженных FSHD мышечных трубочках. За три дня до обработки клетки высевают с плотностью 15 000 клеток на лунку в желатинизированный 96-луночный планшет с ростовой средой для скелетных мышц (PromoCell, C-23060) с 20% ФБС и пенициллином/стрептомицином (Gibco, 15140148). В день обработки среду заменяют на среду для дифференцировки клеток скелетных мышц (PromoCell, C-23061) с добавлением 20% заменителя сыворотки крови KnockOut(Gibco, 10828010) или среды NbActiv4 (BrainBits Nb4-500) и пенициллином/стрептомицином. Модулирующие р38 агенты добавляют в требуемой концентрации в культуральную среду, содержащую дифференцированные пораженные FSHD мышечные трубочки, и культивируют в течение 3-4 дней в инкубаторе. Мышечные трубочки извлекают из инкубатора и экстрагируют РНК с использованием набора RNeasy Micro Plus Kit (Qiagen Кат. №/ID:74034). Из экстрагированной РНК получают кДНК для проведения анализа генной экспрессии Taqman с целью измерения экспрессии DUX4 или последующих целевых генов. Транскрипт POL2RA применяют в качестве эндогенного контроля.

ПРИМЕРЫ

[0145] Исследования, описанные в приведенных ниже примерах, проводили с использованием материалов и способов, описанных ниже.

Сокращения

АСО антисмысловые олигонуклеотиды

DAPI 4',6-диамидино-2-фенилиндол (дигидрохлорид)

ДМСО диметилсульфоксид

DUX4 двойной гомеобокс 4

DUX4-fl двойной гомеобокс 4, полноразмерный

FSHD плече-лопаточно-лицевая мышечная дистрофия

гРНК гидовая РНК

MBD3L2 метил-CpG связывающий домен белок 3-подобный 2

МНС тяжелая цепь миозина

MPAK14 митоген-активируемая протеинкиназа 14

мРНК матричная РНК

MYOG миогенин (миогенный фактор 4)

pHSP27 фосфорилированный белок теплового шока 27
 ПЦР полимеразная цепная реакция
 pLAM последовательность сигнала полиаденилирования
 POLR2A Субъединица А РНК-полимеразы II
 кПЦР количественная полимеразная цепная реакция
 РНК рибонуклеиновая кислота
 ogРНК одиночная гидовая РНК
 miРНК малая интерферирующая РНК

Общие материалы и способы

Миобласты скелетных мышц человека:

[0146] FTCE-00016-01 (линия иммортализованных пораженных FSDH миобластов, 6,3 повторы) и изогенные линии A4, контрольных здоровых миобластов, и C12, пораженных FSDH миобластов, использовали для всех исследований (согласно описанию в источниках: Mamchaoui et al., 2011; Thorley et al., 2016). Четыре отдельных линии первичных миобластов от пациентов, FTCE-016, -020, -197, -196 были предоставлены R. Tawil. Было показано, что пораженные FSDH миобласты экспрессируют aberrантный DUX4 за счет деметилирования D4Z4 на хромосоме 4q35.

Компоненты среды и материалы для культур тканей:

[0147] Ростовая среда для скелетных мышц (PromoCell, C-23160) с добавлением 15% ФБС (Hyclone, SH30071) и пенициллина/стрептомицина (Gibco, 15140148). NbActiv4 (BrainBits Nb4-500) и пенициллин/стрептомицин (среда для дифференцировки). 0,1% раствор желатина EmbryoMax (EMDmillipore ES-006-B). ФБС (Gibco, 10010023), 96-луночный микропланшет, обработанный для культивирования тканей (Corning, CLS3595), обработанный для культивирования тканей многолуночный планшет для культур клеток (Falcon, 353046).

Реагенты и наборы для ПЦР в реальном времени:

[0148] Буфер для лизиса - Roche Real Time Ready Lysis Buffer, 19,5 мкл (для 20 мкл) (Roche, 07248431001), ДНКаза I (Ambion, AM2222), 0,25 мкл, защитный ингибитор РНКаз (Roche, 3335402001), 0,25 мкл, набор RNeasy Micro Kit (Qiagen, 74004), мастер-миксы Taqman Preamp Master Mix (ThermoFisher Scientific, 4391128) и Taqman Multiplex Master Mix (ThermoFisher Scientific, 4484262), наборы для анализа ZSCAN4 Taqman Assay (ThermoFisher Scientific, Hs00537549_m1, FAM-MGB), MYOG Taqman Assay (ThermoFisher Scientific, Hs01072232_m1, JUN-QSY), RPLP0 Taqman Assay (ThermoFisher Scientific, Hs99999902_m1) и LEUTX Taqman Assay (ThermoFisher Scientific, Hs00418470_m1).

Антисмысловые олигонуклеотиды (ACO):

[0149] ACO приобретали у Exiqon: FTSE-000001 (DUX4 ACO от Exiqon, CAGCGTCGGAAGGTGG (SEQ ID NO:18), 300610)) и ненацеливающий ACO (Exiqon, AACACGTCTATACGC (SEQ ID NO:19), 300610).

Покрытие сосудов для культур тканей желатином:

[0150] За три дня до обработки готовили 0,1% раствор желатина, соединяя 1 г желатина (например, Sigma G9391) и 1 л воды подходящего для культур тканей качества; обрабатывали в автоклаве в течение 30 минут для растворения, и стерилизовали. Достаточное количество 0,1% желатина использовали для покрытия с помощью стерильной пипетки, после чего раствор удаляли аспирацией, и сосуды высушивали на воздухе и хранили при комнатной температуре.

Высевание клеток:

[0151] За три дня до обработки высевали по 10 000 клеток на лунку в желатинизированные 96-луночные планшеты, или по 100 000 клеток в желатинизированные 6-луночные планшеты.

Обработка антисмысловыми олигонуклеотидами и соединениями:

[0152] Для обработки АСО или соединениями клетки высевали в 100 мкл ростовой среды Promocell, содержащей АСО или соединения в описанных концентрациях.

Дифференцировка мышечных трубочек скелетных мышц:

[0153] На 0 день среду заменяли на среду для дифференцировки. Планшеты извлекали из инкубатора и удаляли ростовую среду путем аспирации, планшеты однократно промывали, используя 100 мкл ФСБ для 96-луночных и 1 мл ФСБ для 6-луночного планшета, и добавляли по 100 мкл или 2 мл среды для дифференцировки на лунку в 96-луночные или 6-луночные планшеты, соответственно. Антисмысловые олигонуклеотиды или лекарственное средство добавляли в требуемой концентрации, планшеты убирали обратно в инкубатор и инкубировали в течение 3-4 дней.

Получение РНК:

[0154] Клетки извлекали из инкубатора и удаляли среду путем аспирации. Клетки быстро лизировали, следуя одному из следующих протоколов: для лизиса в 96-луночных планшетах проводили прямой лизис и одноэтапную кПЦР в реальном времени с преамплификацией (RT-Preamp) в соответствии с протоколом, описанным ниже. Для каждого 96-луночного планшета готовили смесь, содержащую: 19,5 мкл буфера для лизиса Roche Real Time Ready Lysis Buffer, 0,25 мкл ингибитора РНКаз, 0,25 мкл ДНКазы I (от Thermo, не включенной в набор). По 20 мкл указанной смеси добавляли в каждую лунку, 5-кратно перемешивали и инкубировали в течение 5 минут при КТ или, как вариант, интенсивно встряхивали в течение 15 минут. Лизис наблюдали под микроскопом. Образцы замораживали при -80°C по меньшей мере в течение 15 минут.

Одноэтапная кПЦР:

[0155] Для проведения кПЦР клеточный лизат разводили 1:10 и использовали 2 мкл для 10 мкл 1-этапной реакции РВ-кПЦР для детекции GAPDH, RPLP0, TBP, MYOG, FRG1, MYH3, ACTN2 и т.п. Реакционная смесь для реакции объемом 10 мкл включала: 2 мкл РНК (разведение в лизате 1:10), 5 мкл мастер-микса Fast Advanced Taqman Master Mix (2X), 0,25 мкл смеси ферментов RT Enzyme Mix (40X), 0,5 мкл набора зондов Taqman (20X) и 2,25 мкл H₂O. Реакцию проводили на QuantStudio 7 по следующему протоколу: 48°C в течение 15 минут, 50°C в течение 2 минут, 95°C в течение 30 секунд, 40x, 95°C в

течение 5 секунд, 60°C в течение 30 секунд, после чего планшеты считывали следуя указаниям производителя (Thermo).

[0156] Одноэтапную РВ-преамплификацию использовали для детекции последующих относительно DUX4 генов, т.е. MBD3L2, ZSCAN4, LEUTX, TRIM43, KHDC1L; POL2RA-VIC использовали в качестве эндогенного контроля. Реакционная смесь для реакции объемом 10 мкл включала: 2,25 мкл РНК (разведение в лизате 1:10), 5 мкл мастер-микса Taqman Pre-Amp Master Mix (2X), 0,25 мкл смеси ферментов RT Enzyme Mix (40X), 2,5 мкл набора зондов Taqman (0,2X)*. * Для объединения наборов для анализа TaqMan использовали равные объемы каждого из наборов для анализа генной экспрессии TaqMan® Gene Expression Assay в концентрации 20X, комбинируя до 100 анализов. Например, для объединения 50 анализов TaqMan по 10 мкл из каждого набора комбинировали в микроцентрифужной пробирке. Объединенные анализы TaqMan разводили с применением 1X ТЕ-буфера, до конечной концентрации каждого набора 0,2X. В случае описанного выше примера 500 мкл 1X ТЕ-буфера добавляли в объединенные анализы TaqMan доводя общий итоговый объем до 1 мл. Использовали протокол QuantStudio7 с 48°C в течение 15 мин, 95°C в течение 10 мин, 10 циклов: 95°C в течение 15 секунд, 60°C в течение 4 мин и 4°C без ограничения. Затем образцы разводили до 50 мкл и переходили к этапу кПЦР. Реакционная смесь для реакции объемом 10 мкл включала: 2 мкл разведения смеси для преамплификации (Preamp), 5 мкл мастер-микса Fast Advanced Taqman Master Mix (2X), 0,5 мкл набора зондов Taqman (20X) и 2,5 мкл H₂O. При мультиплексировании объем довели до общего объема 10 мкл. На QuantStudio7 выполняли следующую программу: 50°C в течение 2 минут, 95°C в течение 30 секунд, 40x, 95°C в течение 5 секунд, 60°C в течение 30 секунд, и планшеты считывали в соответствии с инструкциями производителя (Thermo).

Способы экстракции тотальной РНК из мышечных трубочек с применением набора RNeasy Micro Plus Kit:

[0157] В 6-луночный планшет добавляли 450 мкл буфера RLT Plus. Лизат гомогенизировали, перенося на спин-колонку gDNA Eliminator, помещенную в пробирку для сбора объемом 2 мл (в комплекте), центрифугировали колонку в течение 30 с при $\geq 8000 \times g$ ($\geq 10\ 000$ об/мин), а затем утилизировали колонку с сохранением проточной фракции. В проточную фракцию добавляли 250 мкл этанола (итоговое содержание 35%) и тщательно перемешивали путем пипетирования (не центрифугировали). Затем образцы переносили, вместе с каким-либо осадком, который мог образоваться, на спин-колонку RNeasy MinElute, помещенную в пробирку для сбора объемом 2 мл (в комплекте). Колонки центрифугировали в течение 15 с при $\geq 8000 \times g$. Проточную фракцию утилизировали или собирали для осаждения белка. На спин-колонку RNeasy MinElute добавляли 700 мкл буфера RW1, после чего колонку центрифугировали в течение 15 с при $\geq 8000 \times g$, затем проточную фракцию утилизировали. Проводили обработку ДНКазой путем осторожного перемешивания 10 мкл ДНКазы I с 70 мкл буфера RDD, и итоговый раствор добавляли непосредственно на колонку, который инкубировали при комнатной

температуре в течение 20 минут. Затем добавляли 700 мкл буфера RW1 (следуя инструкции производителя) на спин-колонку RNeasy MinElute, колонку центрифугировали в течение 15 с при $\geq 8000 \times g$, и проточную фракцию утилизировали. 500 мкл буфера RPE добавляли на спин-колонку RNeasy MinElute, которую затем центрифугировали в течение 15 с при $\geq 8000 \times g$, после чего проточную фракцию утилизировали. 500 мкл 80% этанола добавляли на спин-колонку RNeasy MinElute, колонку центрифугировали в течение 2 минут при $\geq 8000 \times g$ для промывания мембраны спин-колонки, и утилизировали пробирку для сбора с проточной фракцией. Спин-колонку RNeasy MinElute помещали в новую пробирку для сбора объемом 2 мл (в комплекте), центрифугировали на полной скорости в течение 5 минут для высушивания мембраны, и утилизировали пробирку для сбора с проточной фракцией. Спин-колонку RNeasy MinElute помещали в новую пробирку для сбора объемом 1,5 мл (в комплекте). 14 мкл не содержащей РНКаз воды добавляли непосредственно в центр мембраны спин-колонки, которую затем центрифугировали в течение 1 минуты на полной скорости для элюирования РНК. Элюировали приблизительно 12 мкл РНК.

Детекция DUX4-fl с применением способа, описанного в источнике: Himeda et al. 2015:

[0158] Получение кДНК. Реакции объемом 10 мкл включали 1 мкл РНК (1 мкг), 0,5 мкл Олиго(dT), 0,5 мкл 10 мМ дНТФ и 4,5 мкл H_2O . Реакционные образцы инкубировали при $65^\circ C$ в течение 2 минут, быстро переносили на лед и выдерживали по меньшей мере 1 минуту перед добавлением смеси ферментов, которая включала 2 мкл 5x буфера для синтеза первой цепи, 0,5 мкл 0,1М ДТТ, 0,5 мкл ингибитора РНКаз, 0,5 мкл обратной транскриптазы SSIV RT. Образцы инкубировали при $55^\circ C$ в течение 20 минут и $80^\circ C$ в течение 10 мин, с последующим охлаждением $4^\circ C$. Преамплификацию DUX4 проводили в 10 мкл реакционной смеси, содержащей 1 мкл смеси для ОТ-реакции, 2 мкл 5X GC-буфера, 0,8 мкл ДМСО, 0,2 мкл 10 мМ дНТФ, 0,2 мкл 10 мкМ TJ38F, 0,2 мкл 10 мкМ TJ40R, 0,1 мкл ДНК-полимеразы Phusion II и 5,5 мкл H_2O . Выполняли следующий протокол на QuantStudio 7: $98^\circ C$ в течение 2 мин, 10 циклов по $98^\circ C$ в течение 15 секунд, $64^\circ C$ в течение 20 секунд, $72^\circ C$ в течение 15 секунд и $4^\circ C$ без ограничения.

[0159] кПЦР DUX4 с вложенными праймерами проводили в реакционном объеме 10 мкл, содержащем 1 мкл преамплифицированной ДНК DUX4, 5 мкл смеси 2X IQ SYBR Mix, 0,4 мкл 10 мкМ TJ38F, 0,4 мкл 10 мкМ TJ41R и 3,2 мкл H_2O . Выполняли следующий протокол на QuantStudio 7: $95^\circ C$ в течение 3 мин, 40 циклов по $95^\circ C$ в течение 10 секунд, $64^\circ C$ в течение 15 секунд, $72^\circ C$ в течение 20 секунд, $86^\circ C$ в течение 10 секунд, после чего планшеты считывали на QuantStudio7, следуя инструкциям производителя (Thermo). Значения Ct получали с использованием программного обеспечения для ПЦР в реальном времени QuantStudio Realtime PCR, и Genedata применяли для вычисления относительных уровней экспрессии с использованием POLR2A в качестве «гена домашнего хозяйства».

Способы секвенирования РНК (RNAseq):

[0160] Односторонние риды размером 40 п.о. от Illumina обладали хорошим

качеством при проверке с использованием FastQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). Риды картировали на hg19 с использованием TopHat v2.1.1 (Kim et al., 2013) с опциями режима «solexa1.3-quals» и «no-novel-juncs». Генную модель для TopHat создавали путем объединения известного гена в формате gtf с таблицей kgXref. И известный ген, и kgXref загружали из табличного браузера UCSC в сборке hg19. Подсчет ридов осуществляли с использованием функции featureCounts пакета Subread со значением опции 'strandness' -r 2. Риды нормировали с использованием DESeq2 (Love et al., 2014).

Иммуноцитохимическое исследование пораженных FSHD мышечных трубочек:

[0161] Вкратце, клетки фиксировали в 4% параформальдегиде и пермеабилizировали в 4% параформальдегиде (ПФА) в течение 10 мин при комнатной температуре. Клетки пермеабилizировали с применением ФСБ-Т (PBST) (1× раствор ФСБ с 0,1% Triton X-100), после чего блокировали 10% нормальной сывороткой осла или 3% БСА (NDS) в PBST. Затем клетки инкубировали с разведенными надлежащим образом первичными антителами в PBST с 5% NDS в течение 1 часа при комнатной температуре или 12 часов при 4 °C, троекратно промывали PBST при комнатной температуре, а затем инкубировали с требуемыми вторичными антителами в TBST с 5% NDS и DAPI для контр-окрашивания ядер. DUX4 детектировали путем иммуноцитохимического исследования с применением антитела E5-5 в дифференцированных пораженных FSHD мышечных трубочках. Активированную каспазу-3 детектировали с применением коммерчески доступного антитела (<https://www.cellsignal.com/products/primary-antibodies/cleaved-caspase-3-asp175-antibody/9661>).

Способы секвенирования РНК:

[0162] Односторонние риды размером 40 п.о. от Illumina обладали хорошим качеством при проверке с использованием FastQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). Риды картировали на hg19 с использованием TopHat v2.1.1. Генную модель для TopHat создавали путем объединения известного гена в формате gtf с таблицей kgXref. И известный ген, и kgXref загружали из табличного браузера UCSC в сборке hg19. Подсчет ридов осуществляли с использованием функции featureCounts пакета Subread со значением опции 'strandness' -r 2. Риды нормировали с использованием DESeq2. Биологические повторности в образцах нейронов, обработанных в разные периоды времени, демонстрируют групповой эффект, на что указывает анализ главных компонентов. Соответственно, для уменьшения указанного группового эффекта использовали Combat. Вычисляли стандартные значения экспрессии в RPKM. Общая генная сигнатура была очень незначительной и была определена с использованием стандартных статистических значений отсечения: 86/19 799 мРНК-генов. Сигнатура DUX4-регулируемых генов составляет большую часть от общей сигнатуры: 77/86 мРНК-генов=90%. Не регулируемые DUX4 гены составляют меньшинство от общей сигнатуры с умеренной кратностью различия: 9/86 мРНК-генов=10%; $2-2,7 \times \log FC$.

Способы трансдукции миРНК и РНП Cas9/огРНК пораженных FSHD мышечных трубочек:

[0163] Синтетические crRNA (CRISPR-РНК) приобретали у Thermo Fisher Scientific и отжигали с tracrRNA (транс-активирующими crRNA) в соответствии с техническими условиями. Вкратце, crRNA и tracrRNA ресуспендировали в ТЕ-буфере до концентрации 100 мкМ, перемешивали и разводили 5-кратно в буфере для отжига. Отжиг проводили в ПЦР-системе ProFlex, следуя рекомендациям производителя. 100 нг собранных crRNA:tracrRNA инкубировали с 500 нг TrueCut Cas9 (ThermoFisher, #A36497) в буфере для ресуспензирования, поставляемом с набором Neon Transfection System (ThermoFisher, #MPK10096). После 15-минутного инкубирования реакционную смесь использовали для трансфекции 50 000 миобластов в соответствии с описанными способами. Последовательности, использованные для нацеливания на MAPK14 (3 огРНК) и область pLAM (последовательность полиаденилирования DUX4, 4 гРНК): NT-CTRL, GTATTACTGATATTGGTGGG (SEQ ID NO:8); MAPK14, GCTGAACAAGACAATCTGGG (SEQ ID NO:9), CTGCTTTTGACACAAAAACG (SEQ ID NO:10), CTTATCTACCAAATTCTCCG (SEQ ID NO:11); pLAM, AGAATTTACGGGAAGAACAA (SEQ ID NO:12), CAGGTTTGCCTAGACAGCGT (SEQ ID NO:13), ATTAAAATGCCCCCTCCCTG (SEQ ID NO:14), AATCTTCTATAGGATCCACA (SEQ ID NO:15) и миРНК MAPK14, антисмысловая: UAGAUUACUAGGUUUUAGGTC (SEQ ID NO:16), смысловая: CCUAAAACCUAGUAAUCUATT (SEQ ID NO:17).

Материалы и способы для применения in vivo

Крысы для исследований ФК/ФД:

[0164] Самцов крыс Спрег-Доули (возрастом 6-8 недель) получали от Hilltop Lab Animals, Inc. (USA). После поступления животных в Wuxi AppTec их общее состояние здоровья оценивал сотрудник ветеринарного или другого специализированного персонала. Животных акклиматизировали на протяжении по меньшей мере 2 суток (после поступления в WuXi AppTec) до начала исследования. В период акклиматизации и на всем протяжении исследования животных содержали в индивидуальных помещениях. Среду в помещении для животных контролировали в соответствии с техническими возможностями (заданные условия: температура 20-26°C, относительная влажность 30-70%, 12-часовой светотемновой цикл). Свет, температуру и относительную влажность непрерывно отслеживают с помощью системы AmegaView Environmental Monitoring System. Питание (Certified Rodent Diet #5002, PMI Feeds, Inc., Брентвуд, Миссури) - облученные гранулы в двойной упаковке; номер партии и спецификации корма регистрируют в рабочем журнале и помещают в архив WuXi AppTec. К воде (очищенной обратным осмосом) животным был предоставлен свободный доступ. Проводили периодические анализы качества воды, результаты которых помещали в архив WuXi AppTec. В корме и воде отсутствуют какие-либо известные загрязняющие примеси, которые на детектируемом уровне, предположительно, могли бы повлиять на результаты исследования. В исследовании # FULTH- 20171120 крысам не давали корм в течение ночи

перед введением лекарственного средства: крысам предоставляли свободный доступ к воде в любой момент и их кормили через 4 часа после дозирования. В исследовании # FULTN-20171228 крысам предоставляли свободный доступ к пище и воде на всем протяжении исследования.

Мыши для исследований на ксенотрансплантатах:

[0165] Самцов мышей NOD.Cg-Rag1tm1Mom Il2rgtm1Wjl/SzJ (Nod-Rag) (возрастом 6-8 недель) получали из колонии для воспроизводства Университета Мэриленда VR (USA). Животных размещали в центральной виварии UMB на территории Howard Hall в Университете Мэриленда. Животные были размещены группами (по 4 на клетку) на период акклиматизации (4-5 дней), на всем протяжении процедуры приживления и на всем протяжении исследования лекарственного лечения. Среду в помещении для животных контролировали в соответствии с техническими возможностями (заданные условия: температура 20-26°C, относительная влажность 30-70%, 12-часовой светотемновой цикл). Свет, температуру и относительную влажность непрерывно отслеживают с помощью системы AmegaView Environmental Monitoring System. В период исследования предоставлялся свободный доступ к питанию (корм для грызунов с 22,5% белка LabDiets 5P76). Предоставлялся свободный доступ к стерилизованной воде. В корме и воде отсутствуют какие-либо известные загрязняющие примеси, которые на детектируемом уровне, предположительно, могли бы повлиять на результаты исследования.

Получение мышей с контрольными ксенотрансплантатами и ксенотрансплантатами FSHD:

[0166] FSHD- и контрольные мышей получали путем ксенотрансплантации клеток C6 и A4 происходящих из ИПСК иммортализованных изогенных линий миобластов человека с двух сторон в передние большеберцовые мышцы (TA) приблизительно 8-недельным самцам мышей Nod-Rag. Для получения ксенотрансплантатов мышц человека создавали нишу для трансплантации клеток A4 или C6 в TA-мышцах задних конечностей мышей путем облучения задних конечностей 8-недельных мышей NRG с иммунодефицитом рентгеновскими лучами для предотвращения регенерации мышцы мышши. Через сутки инъецировали 50 мкл 2% раствора BaCl₂ в каждую TA-мышцу в продольном направлении для элиминации мышечной ткани мышшей. После абляции ткани мышши 2×10⁶ клеток C6 вводили в область каждой TA-мышцы с двух сторон и оставляли для развития на четыре недели. После приживления клеток A4 или C6 животным проводили 4-недельный курс периодической электростимуляции мышц (iNMES) для улучшения приживления клеток человека, согласно описанию в источнике: Sakellariou et al., 2016.

Состав и получение исследуемого средства

[0167] Нужные количества FTX-1821 тщательно взвешивали и смешивали с нужным объемом эксципиентов (0,5% (1% ДМСО:99% метилцеллюлозы) в воде с получением однородной суспензии с конечной концентрацией 0,03 мг/мл. Состав

получали в день исследования и дозирование осуществляли в пределах 1 часа после получения. Объем дозы, вводимый животным, составлял 10 мл/кг. Две аликвоты объемом 20-50 мкл раствора для дозирования отбирали из каждого состава и сохраняли для определения точности дозирования с применением ЖХ-МС/МС.

[0168] Нужные количества FTX-2865 тщательно взвешивали и смешивали с нужным объемом стерильного 0,9% солевого раствора для инъекций с получением прозрачного раствора с конечной концентрацией 1 мг/мл. Состав получали в день исследования и вводили животным с использованием объема дозы 10 мл/кг.

Введение исследуемого средства FTX-1821 и дизайн исследования ФК/ФД

[0169] Раствор для дозирования FTX-1821 (0,03 мг/мл) вводили посредством желудочного зонда в объеме дозы 10 мл/кг до достижения итоговой дозы 0,3 мг/кг, следуя СОП для центра Wuxi. Объем дозы определяли на основании измеренной массы тела перед дозированием. Концентрации в растворе для дозирования (мг/мл), объемы доз (мл/кг) и итоговая доза (мг/кг) для соответствующих групп лечения регистрировали в прилагаемом листе данных исследования Excel. Условия кормления: отсутствие пищи в течение ночи, возобновление кормления через 4 часа после дозирования.

[0170] Введение исследуемого средства FTX-2865 и дизайн исследования ксенотрансплантатов

[0171] Раствор для дозирования FTX-2865 (1 мг/мл) вводили посредством в/б инъекции в объеме дозы 10 мл/кг до достижения итоговой дозы 10 мг/кг (для каждой дозы). 0,9% стерильный солевой раствор вводили посредством в/б инъекции в объеме дозы 10 мл/кг в качестве контрольной основы (для каждой дозы). Объем дозы определяли на основании измеренной массы тела перед утренним дозированием. Концентрации в растворе для дозирования (мг/мл), объемы доз (мл/кг) и итоговая доза (мг/кг) для соответствующих групп лечения регистрировали в прилагаемом листе данных исследования Excel. Осуществляемые два раз в сутки инъекции разносили во времени приблизительно на 12 часов, чтобы максимизировать захват мишени. Исследуемые животные получали в общей сложности 14 инъекций основы или FTX-2865 в течение 8 дней и их умерщвляли приблизительно через 1 час после последней утренней инъекции на 8 день.

Взятие образцов:

[0172] Образцы крови для ФК: образец крови объемом приблизительно 100 мкл брали из яремной вены или хвостовой вены в каждой из заранее заданных точек времени. Образцы крови помещали в предварительно охлажденные пробирки для сбора образцов, обработанные ЭДТК-K2 в качестве антикоагулянта, и помещали на лед до центрифугирования.

[0173] Получение плазмы для оценки ФК: образцы крови для ФК центрифугировали при 4°C, 3000g в течение 15 минут в пределах часа для получения плазмы. Образцы плазмы помещали в полипропиленовые пробирки или 96-луночные планшеты, быстро замораживали на сухом льду и хранили при -70°C до анализа

ЖХ/МС/МС.

[0174] Взятие мышц для оценки ФК и ФД: Передние большеберцовые и трапециевидные мышцы с обеих сторон собирали после взятие крови посредством пункции сердца. Каждую мышцу с левой и с правой стороны быстро взвешивали по отдельности и помещали в отдельные пробирки, после чего мгновенно замораживали на сухом льду. Мышцы с одной стороны использовали для измерения концентрации соединения, а мышцы с другой стороны отправляли спонсору для анализа ФД. Дозирование было распределено таким образом, чтобы отбирать образцы приблизительно в одно и то же время в конце дня.

Обработка образцов для анализа ФК:

[0175] Подготовка образцов плазмы для ЖХ/МС-анализа: из аликвоты образца плазмы объемом 10 мкл осаждали белки с 150 мкл раствора внутреннего стандарта (100 нг/мл лабеталола, 100 нг/мл толбутамида и 100 нг/мл диклофенака в ацетонитриле), смесь тщательно перемешивали на вортексе и центрифугировали на 4000 об/мин в течение 15 минут при 4 °С. Аликвоту супернатанта объемом 80 мкл переносили в чашку для образцов и смешивали с 80 мкл воды, после чего чашку встряхивали на 800 об/мин в течение 10 мин. Затем 1 мкл супернатанта вводили в систему для ЖХ-МС/МС-анализа. Подготовка образцов мышц для ЖХ/МС-анализа: Образцы мышц гомогенизировали в воде в соотношении 1:4 (масса/объем) с помощью гомогенизатора Omni Bead Ruptor. Затем гомогенаты использовали для измерения концентрации лекарственного средства. В аликвоте гомогената мышечной ткани объемом 20 мкл осаждали белки с 200 мкл раствора внутреннего стандарта (100 нг/мл лабеталола, 100 нг/мл толбутамида и 100 нг/мл диклофенака в ацетонитриле), смесь тщательно перемешивали на вортексе и центрифугировали на 4000 об/мин в течение 15 минут при 4 °С. Аликвоту супернатанта объемом 80 мкл переносили чашку для образцов и смешивали с 80 мкл воды, после чего чашку встряхивали на 800 об/мин в течение 10 мин. Затем 0,3 мкл супернатанта вводили в систему для ЖХ-МС/МС-анализа.

Аналитический метод (ЖХ/МС, соблюдение требований GLP не предусмотрено):

[0176] Технические характеристики, использованные при осуществлении аналитических методов, включают: Инструмент: система ЖХ/МС LCMS Triple Quad QTRAP 6500+ (SCIEX, Массачусетс, США), холостые образцы: плазма самцов крыс SD (ЭДТК-К2), внутренний(ие) стандарт(ы): 100 нг/мл лабеталола, 100 нг/мл толбутамида и 100 нг/мл диклофенака в ацетонитриле, условия МС - ЭСИ: положительный режим, SRM-детекция FTX-1821: [мышь+человек]+ м/з 383,838>299,231; лабеталол (BC): [M+Ч]+ м/з 329,2/162,1; толбутамид (BC): [M+Ч]+ м/з 271,1/155; Калибровочная кривая: 1,00-3000 нг/мл для FTX001821-02 в плазме самцов крыс SD (ЭДТК-К2) и гомогенате мышц

Метод количественного определения: площадь пика исследуемого средства в образцах и в образце стандартного раствора определяли методом ЖХ-УФ или ЖХ-МС/МС. Критерии приемлемости для метода: Линейность: для $\geq 75\%$ стандартов значения, определенные путем обратных вычислений, были в пределах $\pm 20\%$ от их номинальных

значений ($\pm 25\%$ для НПКО) в биологических жидкостях и в пределах 25% от их номинальных значений (30% для НПКО) в гомогенате тканей и образце фекалий. QC: для $\geq 67\%$ всех QC-образцов значения, определенные путем обратных вычислений, были в пределах $\pm 20\%$ от их номинальных значений для биологических жидкостей и в пределах 25% от их номинальных значений для образцов тканей и фекалий. Специфичность: средняя расчетная концентрация аналита в одном холостом образце составляла менее $0,5$ от НПКО. Чувствительность: НПКО в биологических жидкостях и гомогенате тканей равен $1-3$ нг/мл. Следовой перенос: средняя расчетная концентрация следового переноса в одном холостом образце непосредственно после введения максимального стандарта была ниже НПКО.

Протокол криодробления, лизиса и подготовки мышечной ткани для иммунологического анализа вовлечения мишени:

[0177] Приблизительно 50 мг мышечной ткани помещали на сухой лед. Образцы мышц разрезали надлежащим образом для получения фрагментов массой 50 мг с использованием чистого бритвенного лезвия для каждого образца. 50 мг мышечной ткани помещали в предварительно подписанный пакет для тканей TT1 от Covaris (Covaris, Массачусетс, США) и держали на сухом льду. Пакет TT1 Covaris погружали в жидкий азот и выполняли криодробление образца на аппарате Covaris cryoPREP (Covaris, Массачусетс, США), установив режим «5». Пакет TT1 поворачивали на 180° и повторяли этапы 2-а. Образец переносили в предварительно взвешенную/подписанную пробирку и держали на сухом льду до окончания обработки всех образцов. Регистрировали массу образцов. Готовили буфер RIPA для лизиса (R0278-500ML, Sigma, Миссури, США). На 10 мл добавляли две таблетки ингибитора фосфатаз PhosSTOP от Roche и одну таблетку ингибитора протеаз без ЭДТК от Roche. в каждую пробирку с измельченным криодроблением материалом добавляли по 8 мкл на мг буфера RIPA и перемешивали содержимое всех пробирок на вортексе до гомогенности лизата. Лизаты держали на льду до окончания обработки всех образцов. Лизат осветляли центрифугированием на $13\ 000g$ в течение 5 минут при $4^\circ C$. Супернатант переносили в новую пробирку и мгновенно замораживали в жидком азоте (оставив 10 мкл для анализа на белки). Для измерения содержания белка в каждом образце проводили анализ на белки детергент-совместимым методом Брэдфорд (5000112, Bio-Rad, Калифорния, США). Образцы разводили $1:20$ в ФСБ для анализа на белки.

Иммунологический анализ на фосфо-МК2 и общую МК2:

[0178] Для изучения гомогенизированного лизата трапециевидных мышц использовали собственный разработанный мультиплексный иммунологический MSD («Meso Scale Discovery») анализ (на фосфо-МК2/общую МК2, Meso Scale Diagnostics, Мэриленд, США). Для каждого образца 50 мкл лизата мышц, соответствующих 50 мкг белка, загружали в систему для MSD-анализа. Концентрации белка в лизатах мышц определяли с применением анализа на белки детергент-совместимым методом Брэдфорд согласно описанию выше. Образцы оценивали в двух повторностях. Образцы мышц

инкубировали в MSD-планшете с предварительным покрытием в течение ночи при 4°C на орбитальном шейкере (300 об/мин) и исследовали на следующее утро.

Протокол криодробления, экстракции РНК и очищения РНК из мышечной ткани, и количественного ПЦР-анализа на MBD3L2 и CDKN1B:

[0179] Приблизительно 3-5 мг мышечной ткани из ТА помещали на сухой лед. Мышечную ткань переносили в предварительно подписанный пакет для ткани TT1 от Covaris (Covaris, Массачусетс, США) и держали на сухом льду. Пакет TT1 Covaris погружали в жидкий азот и выполняли криодробление образца на аппарате Covaris cryoPREP (Covaris, Массачусетс, США), установив режим «5». Пакет TT1 поворачивали на 180° и повторяли этапы 2-а. Образец переносили в предварительно взвешенную/подписанную пробирку и держали на сухом льду до окончания обработки всех образцов. РНК очищали с применением набора Zymo Direct-zol Microprep RNA Kit (Калифорния, США) из 3-5 мг измельченной криодроблением мышечной ткани. кДНК синтезировали с матрицы РНК посредством обратной транскрипции. Затем нацеленные транскрипты преамплифицировали в ходе проведения ПЦР-анализа с 14 циклами с применением разведенных специфических в отношении последовательностей человека зондов TaqMan. Генную экспрессию анализировали в кПЦР-анализе с применением специфических в отношении последовательностей человека зондов TaqMan. Относительный уровень экспрессии нормировали по экспрессии CDKN1B с применением способа $2^{-\Delta Ct}$.

Анализ данных:

[0180] Зависимость концентрации в плазме и мышцах от времени анализировали, выполняя некомпартментный анализ с использованием программного обеспечения Phoenix WinNonlin 6.3 (Cetera, Нью-Джерси, США). Значения C₀, CL_p, V_{dss}, C_{max}, T_{max}, T_{1/2}, AUC(0-t), AUC(0-inf), MRT(0-t), MRT(0-inf), %F, графики профиля зависимости концентрации в плазме и мышцах от времени и конечные точки ФД регистрируют с использованием программного обеспечения GraphPad Prism версии 7 (Калифорния, США). Для оценки ФД в мышцах проводили однофакторный анализ ANOVA с использованием программного обеспечения GraphPad Prism версии 7 (Калифорния, США). Для сравнения эффекта прививки клеток C6 или A4 на мРНК MBD3L2 в ксенотрансплантатах мышц проводили двухвыборочный Т-тест с использованием программного обеспечения GraphPad Prism версии 7 (Калифорния, США). Для сравнения эффекта обработки FTX-2865 или основой на мРНК MBD3L2 в ксенотрансплантатах пораженных FSHD мышц проводили двухвыборочный Т-тест с использованием программного обеспечения GraphPad Prism версии 7 (Калифорния, США).

ПРИМЕР 1

Репрессия DUX4 с применением направленного на последовательность антисмыслового олигонуклеотида снижает уровни последующих целевых генов

[0181] Мышечные трубочки дикого типа обрабатывали контролем - основой ДМСО, а зрелые полученные от пациентов пораженные FSHD мышечные трубочки,

которые экспрессируют белок DUX4, обрабатывали контролем - основой ДМСО или направленным на последовательность DUX4 антисмысловым олигонуклеотидом (АСО; FTX-2) в концентрации 1 мкМ, приобретенным у Exiqon. После обработки мышечные трубочки лизировали в 19, μ л буфера для лизиса Roche Real Time Ready Lysis Buffer, 0,25 мкл ДНКазы 1 (Ambion, AM2222), 0,25 мкл защитного ингибитора РНКаз (Roche, 3335402001), и собирали РНК в мастер-микс RNeasy Micro Kit Master Mix. Уровни экспрессии DUX4-регулируемых последующих генов (ZSCAN4, TRIM43, MBD3L2, LEUTX и KHDC1L) определяли с применением ПЦР в реальном времени (ThermoFisher Scientific, 4484262), наборов для анализа ZSCAN4 Taqman Assay (ThermoFisher Scientific, Hs00537549_m1, FAM-MGB), MYOG Taqman Assay (ThermoFisher Scientific, Hs01072232_m1, JUN-QSY), RPLP0 Taqman Assay (ThermoFisher Scientific, Hs99999902_m1) и/или LEUTX Taqman Assay (ThermoFisher Scientific, Hs00418470_m1). Значения Ct получали с использованием программного обеспечения для ПЦР в реальном времени QuantStudio Realtime PCR, и Genedata применяли для вычисления относительных уровней экспрессии с использованием POLR2A в качестве «гена домашнего хозяйства».

[0182] Результаты показали, что пораженные FSHD мышечные трубочки, обработанные АСО, направленным на последовательность DUX4, экспрессируют пониженные количества DUX4 и последующих относительно DUX4 целевых генов транскрипционных факторов, ZSCAN4, TRIM43, MBD3L2, LEUTX и KHDC1L, по сравнению с пораженными FSHD мышечными трубочками, обработанными контролем - основой ДМСО (фиг. 2).

[0183] Данные на фиг. 3А представляют собой сгруппированные данные контроля качества для планшетов со сравнением экспрессии мРНК MBD3L2 в пораженных FSHD мышечных трубочках, обработанных контролем - ДМСО или 1 мкМ DUX4 АСО, и в нормальных здоровых изогенных контрольных мышечных трубочках. На фиг. 3В приведены данные фармакологического контроля качества и показано дозозависимое снижение уровней DUX4 и последующего гена, MBD3L2, при применении разных разведений DUX4 АСО. На фиг. 3С приведена статистика анализа на планшетах со сравнением пораженных FSHD мышечных трубочек, обработанных ДМСО, и WT: $Z' = 0,512$ и отношение сигнала к шуму (S/N) составляет 5,1; и пораженных FSHD мышечных трубочек, обработанных ДМСО или DUX4 АСО: $Z' = 0,319$ и отношение сигнала к шуму (S/N) составляет 4,6.

ПРИМЕР 2

низкомолекулярные ингибиторы p38 снижают экспрессию мРНК MBD3L2

[0184] Мышечные трубочки дикого типа и зрелые полученные от пациентов пораженные FSHD мышечные трубочки, которые экспрессируют белок DUX4, обрабатывали контролем - основой ДМСО или различными ингибиторами p38 α/β в нескольких концентрациях с разными диапазонами селективности по изоформам и киному, в том числе SB239063 (фиг. 4А), VX-702 (фиг. 4В), памапимодом (фиг. 4С) и

ТАК-715 (фиг. 4D). После обработки контрольные и обработанные клетки подготавливали для количественного определения с помощью ПЦР в реальном времени экспрессии мРНК MBD3L2 (последующего относительно DUX4 гена) и мРНК миогенина (MYOG) (контроль). Указанные ингибиторы p38 α/β продемонстрировали мощное (IC₅₀ приблизительно <10 нМ, фиг. 4A-D) снижение экспрессии мРНК MBD3L2 в отсутствие нарушений экспрессии мРНК MYOG в пораженных FSHD мышечных трубочках.

[0185] В пораженных FSHD мышечных трубочках ингибиторы p38 (например, панапимод) дозозависимым образом снижали экспрессию мРНК DUX4 и мРНК последующего относительно DUX4 гена MBD3L2, не нарушая образование мышечных трубочек. По сравнению с обработкой ДМСО FTX000839 (панапимод) в концентрации 10, 100 и 1000 нМ дозозависимым образом снижал уровни мРНК как DUX4-fl, так и последующего гена MBD3L2, нормированные по мРНК POLR2A, по оценке с применением кПЦР и Taqman, в пораженных FSHD мышечных трубочках (фиг. 5A), не нарушая дифференцировку в мышечные трубочки (фиг. 5B). Эти данные показывают, что ингибиторы p38 дозозависимым образом снижают экспрессию мРНК MBD3L2, не нарушая экспрессию мРНК миогенина.

ПРИМЕР 3

Снижение уровней мРНК p38 MAPK14 и мРНК MBD3L2 путем нокдауна миРНК

[0186] миРНК p38 α MAPK14 85 и p38 α MAPK14 86 трансфицировали пораженные FSHD мышечные трубочки от пациентов согласно описанию в разделе «Материалы и способы». Все из миРНК, миРНК p38 α MAPK14 85 и миРНК p38 α MAPK14 86 (в меньшей степени), снижали экспрессию p38 MAPK14, как показано на фиг. 6A, и экспрессию мРНК MBD3L2 (целевой ген DUX4), как показано на фиг. 6B, по сравнению с нецелевыми контрольными миРНК (NT CTRL 1 и NT CTRL 2). Данные показывают, что геномное снижение уровней p38 α MAPK14 >50% специфическим образом снижало уровни DUX4 и последующих целевых генов, как показано на примере MBD3L2.

ПРИМЕР 4

Понижение уровня мРНК MBD3L2 при применении Cas9/гРНК РНП для киназы p38 α

[0187] Нацеливание CRISPR-гРНК на MAPK14 или pLAM (последовательность сигнала полиаденилирования DUX4) проводили согласно описанию в разделе «Материалы и способы». Нацеливание CRISPR-гРНК на MAPK14 или pLAM (последовательность сигнала полиаденилирования DUX4) приводило к понижению уровня экспрессии MBD3L2, но не MYOG. Данные показывают, что геномное снижение уровня p38 α MAPK14 специфическим образом снижало уровни DUX4 и последующих целевых генов, как показано на примере MBD3L2.

ПРИМЕР 5

FTX-1821 понижающе регулирует белок DUX4 и мРНК MBD3L2

[0188] Полученные от пациентов пораженные FSHD мышечные трубочки (с 6 повторами в массивах D4Z4) обрабатывали контролем - основой ДМСО и FTX-1821 в

разных концентрациях, и определяли уровни белка DUX4 и мРНК MBD3L2 согласно описанию в разделе «Способы и материалы». Для DUX4 и MBD3L2 анализировали по четыре биологических повторности. Кроме того, определяли уровни pHSP27. Для количественного определения pHSP27 получали по три повторности в двух независимых экспериментах.

[0189] Обработка FTX 1821 полученных от пациента с FSHD мышечных трубочек приводило к зависимому от концентраций снижению уровня белка DUX4 ($IC_{50}=25$ нМ) и MBD3L2 мРНК ($IC_{50}=25$ нМ), которое коррелировало с наблюдаемыми изменениями уровней фосфо-HSP27 ($IC_{50}=10$ нМ) что свидетельствует о вовлечении мишени (фиг. 7). Результаты указывают на а зависимое от концентрации снижение уровней белка DUX4 ($IC_{50}=25$ нМ) и мРНК MBD3L2 ($IC_{50}=10$ нМ). Снижение уровней белка DUX4 и MBD3L2 мРНК коррелировало с наблюдаемыми изменениями уровней p-HSP27 ($IC_{50}=10$ нМ) что свидетельствует о вовлечении мишени. Указанные результаты показывают, что ингибирование пути p38 α при применении FTX-1821 приводит к мощной понижающей регуляции белка DUX4 и мРНК MBD3L2.

ПРИМЕР 6

FTX-1821 не влияет на образование мышечных трубочек

[0190] Иммуортиализованные FSHD мышечные трубочки дифференцировали и обрабатывали контролем - основой ДМСО или FTX-1821 в концентрациях 1 мкМ, 0,33 мкМ, 0,11 мкМ или 0,037 мкМ. Через 4 дня клетки фиксировали и окрашивали антителами, направленными против МНС, или DAPI. См. фиг. 8А. Ядра в мышечных трубочках количественно определяли на основании окрашивания МНС (фиг. 8В). Результаты не показали изменений в образовании или слиянии мышечных трубочек после обработки FTX-1821 в протестированных концентрациях.

ПРИМЕР 7

FTX-1821 уменьшает апоптоз в пораженных FSHD мышечных трубочках

[0191] Апоптоз измеряли по уровням активной каспазы-3 в пораженных FSHD мышечных трубочках *in vitro* согласно описанию в разделе «Материалы и способы». Апоптоз детектировали спорадически в подгруппе мышечных трубочек в культуре, как отмечено белыми кружками и показано на увеличенной области на фиг. 9А. Сигнал активной каспазы-3 количественно определяли в пораженных FSHD мышечных трубочках, которые были обработаны FTX-1821 в различных концентрациях (фиг. 9В). Результаты показывают дозозависимое снижение апоптотического сигнала, на что указывает снижение детекции активной каспазы 3 ($IC_{50}=45$ нМ); указанный эффект был специфическим для пораженных FSHD мышечных трубочек по сравнению с контрольными мышечными трубочками. Изменений сигнала активной каспазы-3 после обработки ДМСО не наблюдалось.

ПРИМЕР 8

FTX-1821 Снижает экспрессию патологической транскрипционной программы DUX4

[0192] Проводили исследования согласно описанию в разделе «Способы и материалы» для идентификации генов пути DUX4, понижающая регуляция экспрессии которых происходит в пораженных FSHD мышечных трубочках, обработанных FTX-1821, по сравнению с пораженными FSHD мышечными трубочками, обработанными контролем - основой ДМСО. Кроме того, также определяли генную экспрессию в мышечных трубочках дикого типа, обработанных ДМСО. Каждое условие анализировали в трех повторностях с применением РНК-секвенирования, и гены кластеризовали по направлению и интенсивности изменения.

[0193] Как показано на тепловой карте на фиг. 10А, ряд дифференциально экспрессируемых генов идентифицировали путем профилирования с применением РНК-секвенирования. Планкой обозначены наблюдаемые нормированные различия, например, генами, понижающую регуляцию которых обеспечивал FTX-1821, обогащены образцы, обработанные только ДМСО. Экспрессию указанных генов нормировали после обработки FTX-1821 (1 мкМ), и она была ближе к наблюдениям в клетках дикого типа. Вычисленная с применением стандартных значений экспрессии в RPKM общая генная сигнатура была очень незначительной и определена с использованием стандартных статистических значений отсека: 86/19799 мРНК-генов. Сигнатура DUX4-регулируемых генов составляла большую часть от общей сигнатуры, и указанные гены перечислены на фиг. 10А. Не регулируемые DUX4 гены составляют меньшинство от общей сигнатуры с умеренной кратностью различия: $9/86$ мРНК-генов=10%; $2-2,7 \times \log_{2}FC$. На фиг. 10В показаны нормированные ряды, согласно описанию в разделе «Материалы и способы», целевых генов для DUX4, понижающая регуляция которых происходит при обработке FTX-1821. Анализировали по три независимых повторности на группу.

ПРИМЕР 9

снижение уровня мРНК MBD3L2 при различных генотипах и фенотипах FSHD1

[0194] Способность снижать экспрессию целевых генов DUX4 в клетках, полученных от пациентов с различными генотипами FSHD1, исследовали согласно описанию в разделе «Способы и материалы». Четыре отдельных линии миобластов от пациентов с FSHD, т.е. FTCE-016, -020, -197 и -196 (любезно предоставленные Rabi Tawil), обрабатывали FTX-1821 (1 мкМ) или FTX-839 (1 мкМ), и после обработки определяли уровни мРНК целевого гена для DUX4, MBD3L2.

[0195] Уровни экспрессии MBD3L2 были понижены во всех линиях FSHD, что приводило к уровням, аналогичным измеренным у здоровых контролей, FTCE-396 и FTCE-014 (фиг. 11). Это свидетельствует о снижении уровня целевого для DUX4 гена при применении ингибиторов p38 во всех мышечных трубочках, происходящих из FSHD1 разнообразных генотипов и фенотипов (аналогичные результаты наблюдались для FSHD2, данные не показаны).

ПРИМЕР 10

Снижение уровня мРНК MBD3L2 при генотипах и фенотипах FSHD1 и FSHD2

[0196] Для оценки эффекта обработки, обеспечивающей селективное

ингибирование p38, с применением FTX-1821 в клетках, пораженных FSHD1 и FSHD2, первичные линии миобластов были любезно предоставлены Rabi Tawil из Университета Рочестера. На фиг. 13 обобщены генотипы и фенотипы миобластов от 13 пациентов с FSHD1 и 3 FSHD2, использованных в исследовании. Различные миобласты FSHD1 и FSHD2 обрабатывали ДМСО, FTX-1821 или FTX-839 (1 мкМ), и после обработки определяли уровни экспрессии мРНК целевого гена для DUX4, MBD3L2. Кроме того, определяли апоптоз путем измерения активной каспазы-3 в линиях FSHD1 и FSHD2.

[0197] Все различные пораженные FSHD1 и FSHD2 миобласты продемонстрировали снижение уровня MBD3L2 (фиг. 14А, верхние 11 линий). Указанное снижение приводило к уровням экспрессии, аналогичным уровням в контрольной линии здоровых клеток (CTRL- FTCE-014) (фиг. 14А, нижние 2 линии). Кроме того, при обработке FTX-839 наблюдалось снижение апоптоза в линиях как FSHD1, так и FSHD2, до уровня, аналогичного значению, определенному в контрольных линиях здоровых клеток (CTRL-FTCE-014) (фиг. 14В). Указанные результаты показывают, что в пораженных FSHD миобластах из клинических биоптатов при дифференцировке в мышечные трубочки наблюдается снижение как патологической экспрессии последующих относительно DUX4 генов, так и итоговой смерти клеток с генотипами и фенотипами как FSHD1, так и FSHD2.

ПРИМЕР 11

Вовлечение мишени в мышцах дикого типа у крыс после обработки мощным селективным ингибитором p38

[0198] Фармакокинетические свойства FTX-1821 исследовали в модели на животных. Самцов крыс Спрег-Доули (N=6 животных на точку времени и группу лечения) перорально дозировали FTX-1821 натошак или не натошак и определяли уровни фосфо-p38 α и общие уровни p38 α . Фармакодинамический анализ вовлечения мишени в системе p38 в мышечной ткани проводили путем измерения изменения отношения уровня фосфо-активированной MAP-киназы протеинкиназы 2 (МК2) и общего уровня МК2 до и после лечения лекарственным средством. Все используемые способы описаны в разделе «Материалы и способы».

[0199] FTX-1821 проявлял фармакокинетические свойства в плазме, аналогичные описанным ранее (Aston et al., 2009; данные не показаны). В указанных исследованиях, кроме того, продемонстрировано быстрое распределение FTX-1821 в некоторых мышцах и плазме. Отношение экспозиции в мышцах к экспозиции в плазме составляло ≥ 1 у крыс при достижении клинически релевантных уровней экспозиции в плазме.

[0200] Фармакодинамический анализ продемонстрировал, что однократная пероральная доза FTX-1821 (0,3 мг/кг) обеспечивала клинически релевантные концентрации в плазме (Varbour et al., 2012) и значительно снижала отношение уровня фосфо-МК2 и общего уровня МК2 в трапециевидных мышцах крыс в пределах 1 часа после лечения лекарственным средством (фиг. 15). Вовлечение мишени в системе p38 сохранялось по меньшей мере в течение 12 часов после введения однократной дозы FTX-

1821 (фиг. 15). Вовлечение мишени в системе р38 в трапецевидной мышце было максимальным при концентрациях FTX-1821 в плазме и мышцах, превышающих 20 нг/мл или нг/г, и снижалось в точках времени, когда снижалась экспозиция. Концентрации в мышцах FTX-1821, полученные в исследовании на крысах, по прогнозам, будут приводить к >70% снижению при C_{max} уровней DUX4-зависимых целевых генов в биоптатах мышц от пациента с FSHD на основании данных, полученных *in vitro* на пораженных FSHD мышечных трубочках (выше).

[0201] Указанный фармакокинетический и фармакодинамический анализ показал, что максимальное ингибирование системы р38 в мышцах достигалось при концентрациях FTX-1821 в плазме выше 20 нг/мл, и что значимое ингибирование пути р38 ожидается в мышцах человека при введении клинических доз по 7,5 или 15 мг два раза в сутки (Barbour et al., 2012).

ПРИМЕР 12

Ингибирование геномной программы DUX4 у мышей с ксенотрансплантатами FSHD после обработки мощным селективным ингибитором р38

[0202] Мышей с ксенотрансплантатами FSHD и контрольными ксенотрансплантатами получали путем ксенотрансплантации клеток C6 (FSHD) и A4 (контроль), происходящих из ИПСК иммортализованных изогенных линий миобластов человека, с двух сторон в передние большеберцовые мышцы (ТА) самцов мышей Nod-Rag возрастом приблизительно 8 недель, согласно описанию в источнике: Sakellariou et al., 2016. После 4-недельного периода приживления и проведения процедуры INMES животные с ксенотрансплантатами FSHD получали лечение путем инъекции дважды в сутки либо основы, либо FTX-2865 (10 мг/кг) на протяжении 8 дней (в общей сложности 14 инъекций) и умерщвляли в момент времени, приблизительно соответствующий максимальным концентрациям в плазме (T_{max}) через 1 час после последней утренней инъекции на день 8. При умерщвлении собирали плазму, трапецевидные и обе передние большеберцовые мышцы и мгновенно замораживали для анализа фармакокинетических конечных точек, вовлечения мишени и DUX4-зависимых мРНК. MBD3L2 оценивали с помощью кПЦР, используя специфический для человека зонд, и нормировали по гену домашнего хозяйства CDKN1B. Концентрации белка pMK2 и MK2 оценивали с применением количественного MSD-анализа.

[0203] Анализ ТА-ткани с применением кПЦР от животных с приживляемыми в течение 4-6 недель тканями миобластов A4 или C6 продемонстрировал значимое ($p < 0,05$) и >10-кратное увеличение уровня MBD3L2 и других Dux4-зависимых генов (не показано) в ТА-мышцах с ксенотрансплантатами FSHD (C6) или контрольными ксенотрансплантатами (A4) (фиг. 16). N=8 образцов ТА на группу.

[0001] Лечение животных с ксенотрансплантатами FSHD мощным селективным ингибитором р38, FTX-2865, обеспечивало вовлечение мишени в системе р38, на основании изменения отношения уровня фосфо-активированной MAP-киназы протеинкиназы 2 (MK2) и общего уровня MK2 >50% в ТА- и трапецевидных мышцах

мышей дикого типа после многократного введения дважды в сутки дозы 10 мг/кг, вводимой посредством внутривенных (в/в) инъекций (данные не показаны). Лечение FTX-2865 значимо ($p < 0,05$) снижало отношение уровня фосфо-МК2 и общего уровня МК2 в трапециевидных мышцах мышей, что указывает на значимое вовлечение системы p38, а также указывает на достаточные концентрации лекарственного средства в скелетных мышцах животных для ингибирования системы p38 более чем на 80% (фиг. 17; N=8 образцов трапециевидных мышц на группу). Кроме того, лечение FTX-2865 значимо ($p < 0,05$) снижало экспрессию MBD3L2 в ТА-мышцах у животных с ксенотрансплантатами FSHD по сравнению с получавшими лечение основной животными, что указывает на супрессию патологической генной программы DUX4 за счет ингибирования p38 (фиг. 18; N=5-7 образцов ТА на группу).

Список источников:

Tawil R., van der Maarel S. M. and Tapscott S. J.. Facioscapulohumeral dystrophy: the path to consensus on pathophysiology. *Skeletal Muscle* 2014, 4:12.

van der Maarel S. M., Frants R. R., Padberg G. W.. Facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Biochimica et Biophysica Acta* 2007, 1772:186-194.

Ehrlich M. and Lacey M.. Deciphering transcription dysregulation in FSH muscular Dystrophy. *J Hum Genet.* 2012, 57(8): 477-484.

Cuenda A. and Rousseau, S. 2007. *BBA-Mol Cell Res.* Review: p38 MAP-Kinases pathway regulation, function and role in human diseases. Vol.1773: 8, p. 1358-1375.

Himeda C. L., Jones T. I., and Jones P. L.. Facioscapulohumeral Muscular Dystrophy As a Model for Epigenetic Regulation and Disease. *Antioxid Redox Signal.* 2015, 22(16): 1463-1482.

Yao Z., Snider L., Balog J., Lemmers R. J.L.F., Van Der Maarel S. M., Tawil R., and Tapscott S. J. DUX4-induced gene expression is the major molecular signature in FSHD skeletal muscle. *Human Molecular Genetics.* 2014, 23:20 5342-5352.

Rickard A.M., Petek L. M. and Miller D. G.. Endogenous DUX4 expression in FSHD myotubes is sufficient to cause cell death and disrupts RNA splicing and cell migration pathways. *Human Molecular Genetics,* 2015, 24:20 5901-5914.

Geng L.N., Yao Z., Snider L., Fong A.P., Cech J.N., Young J.M., van der Maarel S.M., Ruzzo W.L., Gentleman R.C., Tawil R., Tapscott S.J. DUX4 activates germline genes, retroelements and immunemediators: Implications for facioscapulohumeral dystrophy. *Dev Cell.* 2012, 22(1): 38-51.

Wallace L. M., Garwick S. E., Mei W., Belayew A., Coppee F., Ladner K. J., Guttridge D., Yang J., and Harper S. Q.. DUX4, a Candidate Gene for Facioscapulohumeral Muscular Dystrophy, Causes p53-Dependent Myopathy In Vivo. *Ann Neurol.* 2011, 69(3): 540-552.

Homma S., Beermann M.- L., Boyce F. M., and Miller J. B.. Expression of FSHD-related DUX4-FL alters proteostasis and induces TDP-43 aggregation. *Ann Clin Transl Neurol.* 2015, 2(2): 151-166.

Shadle S. C., Zhong J. W., Campbell A. E., Conerly M. L., Jagannathan S., Wong C.-J.,

Morello T. D., van der Maarel S. M., Tapscott S. J.. DUX4-induced dsRNA and MYC mRNA stabilization activate apoptotic pathways in human cell models of facioscapulohumeral dystrophy. *PLOS Genetics*. 2017, <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006658>

Dandapat A., Hartweck L. M., Bosnakovski D., and Kyba M.. Expression of the Human FSHD-Linked DUX4 Gene Induces Neurogenesis During Differentiation of Murine Embryonic Stem Cells. *Stem Cells Dev*. 2013, 22:(17) 2440-2448.

Bosnakovski D., Choi S. H., Strasser J. M., Toso E. A., Walters M. A. and Kyba M.. High-throughput screening identifies inhibitors of DUX4-induced myoblast toxicity. *Skeletal Muscle*. 2014, 4:4.

Mamchaoui K, Trollet C, Bigot A, Negroni E, Chaouch S, Wolff A, et al. Immortalized pathological human myoblasts: towards a universal tool for the study of neuromuscular disorders. *Skeletal Muscle* 2011, 1:34.

Thorley M, Duguez S, Mazza EM, Valsoni S, Bigot A, Mamchaoui K, Harmon B, Voit T, Mouly V, Duddy W. Skeletal muscle characteristics are preserved in hTERT/cdk4 human myogenic cell lines. *Skeletal Muscle* 2016, 6:43.

Isin Dalkilic and Louis M Kunkel. *Current Opinion in Genetics & Development* 2003, 13:231-238.

Zarubin, T. and Han J. Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. *Cell Research*. 2005; 15, 11-18.

Aouadi M., Binetruy, B., Caron, L., Le Marchand-Brustel, Y. 2006. *Biochimie*. Role of MAPKs in development and differentiation: lessons from knockout mice. *Biochimie*. 2006; 88:9: 1091-1098.

Keren, A., Tamir, Y., Bengal, E. The p38 MAPK signaling pathway: A major regulator of skeletal muscle development. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2006. Volume 252, Issues 1-2, Pages 224-230.

Kyriakis JM, Avruch J: Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev* 2001, 81:807-869.

Himeda, CL, Debarnot, C, Homma S., Beermann M., Miller JB., Jones PL., Jones TI. Myogenic Enhancers Regulate Expression of the Facioscapulohumeral Muscular Dystrophy-Associated DUX4 Gene. *MCB* 2014 vol. 34 no. 11 1942-1955.

Dandapat A., Hartweck L. M., Bosnakovski D., and Kyba M.. Expression of the Human FSHD-Linked DUX4 Gene Induces Neurogenesis During Differentiation of Murine Embryonic Stem Cells. *Stem Cells Dev*. 2013, 22:(17) 2440-2448.

Bosnakovski D., Choi S. H., Strasser J. M., Toso E. A., Walters M. A. and Kyba M.. High-throughput screening identifies inhibitors of DUX4-induced myoblast toxicity. *Skeletal Muscle*. 2014, 4:4.

Mamchaoui K, Trollet C, Bigot A, Negroni E, Chaouch S, Wolff A, et al. Immortalized pathological human myoblasts: towards a universal tool for the study of neuromuscular disorders. *Skeletal Muscle* 2011;1:34.

Thorley M, Duguez S, Mazza EM, Valsoni S, Bigot A, Mamchaoui K, Harmon B, Voit

T, Mouly V, Duddy W. Skeletal muscle characteristics are preserved in hTERT/cdk4 human myogenic cell lines. *Skelet Muscle* 2016;6:43.

Zarubin, T. and Han J. Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. *Cell Research*.2005; 15, 11-18.

Aouadi M., Binetruy, B., Caron, L., Le Marchand-Brustel, Y. 2006. *Biochimie*. Role of MAPKs in development and differentiation: lessons from knockout mice. *Biochimie*. 2006; 88:9: 1091-1098.

Keren, A., Tamir, Y., Bengal, E. The p38 MAPK signaling pathway: A major regulator of skeletal muscle development. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2006. Volume 252, Issues 1-2, Pages 224-230.

Kyriakis JM, Avruch J: Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev* 2001, 81:807-869.

Himeda, CL, Debarnot, C, Homma S., Beermann M., Miller JB., Jones PL., Jones TI. Myogenic Enhancers Regulate Expression of the Facioscapulohumeral Muscular Dystrophy-Associated DUX4 Gene. *MCB* 2014 vol. 34 no. 11 1942-1955.

Wissing, ER, Boyer, JG., Kwong, JQ, Sargent, MA, Karch, J, McNally, EM, Otsu, K, Molkentin JD. p38 α MAPK underlies muscular dystrophy and myofiber death through a Bax-dependent mechanism. *Hum Mol Genet*. 2014 Oct 15; 23(20): 5452-5463.

Perdiguero, E, Ruiz-Bonilla, V, Gresh, G, Hui, L, Ballestar, E, Sousa-Victor, P, Baeza-Raja, B, Bosch-Comas, A, Esteller, M, Caelles, C, Serrano, AL, Wagner, EF, Muñoz-Cánoves, P. Genetic analysis of p38 MAP kinases in myogenesis: fundamental role of p38 α in abrogating myoblast proliferation. *EMBO J*. 2007 Mar 7; 26(5): 1245-1256.

Aston, Nicola M.; Bamborough, Paul; Buckton, Jacqueline B.; Edwards, Christopher D.; Holmes, Duncan S.; Jones, Katherine L. et al. (2009): p38alpha mitogen-activated protein kinase inhibitors. Optimization of a series of biphenylamides to give a molecule suitable for clinical progression. In *J Med. Chem.* 52 (20), pp. 6257-6269.

[0002] Barbour, April M.; Sarov-Blat, Lea; Cai, Gengqian; Fossler, Michael J.; Sprecher, Dennis L.; Graggaber, Johann et al. (2013): Safety, tolerability, pharmacokinetics and pharmacodynamics of losmapimod following a single intravenous or oral dose in healthy volunteers. In *Br. J Clin Pharmacol.* 76 (1), pp. 99-106.

Boudou, T., Legant, W. R., Mu, A., Borochin, M. A., Thavandiran, N., Radisic, M., Chen, C. S. (2012). A Microfabricated Platform to Measure and Manipulate the Mechanics of Engineered Cardiac Microtissues. *Tissue Engineering. Part A*, 18(9-10), 910-919.

Sakellariou, P., O'Neil, A., Mueller, A.L., Stadler, G., Wright, W.E., Roche, J.A., Bloch, R.J. (2016). Neuromuscular electrical stimulation promotes development in mice of mature human muscle from immortalized human myoblasts. *Skeletal Muscle* 6:4, 1-14.

Все публикации и патентные заявки, описанные в настоящем документе, включены в настоящий документ полностью посредством ссылки.

Хотя настоящее изобретение было описано в комбинации со специфическими вариантами реализации, представленными выше, для специалистов в данной области

техники очевидны многие их альтернативы, модификации и другие варианты. Все такие альтернативы, модификации и варианты соответствуют сути и включены в объем настоящего изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ снижения экспрессии мРНК DUX4-fl, полипептида DUX4 или полипептида, кодируемого последующим целевым геном DUX4, в клетке, включающий приведение указанной клетки в контакт с агентом, который обеспечивает снижение уровня активного белка p38 в клетке, со снижением таким образом экспрессии полипептида DUX4 или полипептида, кодируемого последующим целевым геном DUX4.
2. Способ по п. 1, где указанный агент ингибирует экспрессию или активность, или уменьшает количество белка p38, причем указанная активность необязательно представляет собой киназную активность.
3. Способ по п. 1 или п. 2, где указанная клетка представляет собой мышечную клетку, необязательно, терминально дифференцированную мышечную клетку.
4. Способ по п. 1, где указанная клетка имеет повышенный уровень экспрессии мРНК DUX4-fl, полипептида DUX4 или полипептида, кодируемого последующим целевым геном, по сравнению с уровнем экспрессии мРНК DUX4-fl, полипептида DUX4 или полипептида, кодируемого последующим целевым геном, в контрольной клетке.
5. Способ по п. 4, где указанный повышенный уровень экспрессии мРНК DUX4-fl, полипептида DUX4 или полипептида, кодируемого последующим целевым геном, обусловлен сниженной репрессией в локусе D4Z4 в клетке.
6. Способ по любому из пп. 1-5, где указанная клетка ассоциирована с плече-лопаточно-лицевой мышечной дистрофией (F5HD).
7. Способ по п. 6, где указанная клетка содержит делецию одного или более макросателлитных повторов D4Z4 в субтеломерной области хромосомы 4q35, необязательно при этом указанная клетка содержит ≤ 7 макросателлитных повторов D4Z4 в субтеломерной области хромосомы 4q35.
8. Способ по любому из пп. 1-7, где указанная клетка содержит одну или более мутаций в гене содержащего гибкий шарнирный домен белка поддержания структуры хромосом 1 (SMCHD1).
9. Способ по п. 8, где указанная клетка содержит по меньшей мере один неделетированный аллель 4qA.
10. Способ по любому из пп. 1-9, где указанный агент ингибирует экспрессию белка p38.
11. Способ по п. 10, где указанный агент связывает полинуклеотид, кодирующий указанный белок p38, или его антисмысловой полинуклеотид.
12. Способ по любому из пп. 1-11, где указанный агент содержит нуклеиновую кислоту или состоит из нуклеиновой кислоты, которая необязательно представляет собой ДНК, РНК, гРНК, мшРНК, миРНК или антисмысловой олигонуклеотид.
13. Способ по любому из пп. 1-9, где указанный агент ингибирует активность белка p38.
14. Способ по любому из пп. 1-9 и 13, где указанный агент связывает белок p38.
15. Способ по любому из пп. 1-9, 13 и 14, где указанный агент содержит

полипептид или состоит из полипептида, необязательно, белка, пептида, миметика белка, пептидомиметика, или антитела или его функционального фрагмента.

16. Способ по любому из пп. 1-9, 13, и 14, где указанный агент содержит малую молекулу, необязательно, малую органическую молекулу или малую неорганическую молекулу.

17. Способ по любому из пп. 1-16, где указанный последующий целевой ген представляет собой RFPL2, CCNA1, SLC34A2, TPRX1, KHDC1L, ZSCAN4, PRAMEF20, TRIM49, PRAMEF4, PRAME6, PRAMEF15 или ZNF280A.

18. Способ по любому из пп. 1-17, где экспрессия или активность белка р38 снижается по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100%.

19. Способ лечения или предотвращения заболевания или расстройства, ассоциированного с повышенной экспрессией мРНК DUX4-fl, белка DUX4 или полипептида, кодируемого последующим целевым геном DUX4, у нуждающегося в этом субъекта, включающий обеспечение субъекта фармацевтической композицией, содержащей агент, обеспечивающий снижение количества активного белка р38 в одной или более тканях указанного субъекта, со снижением таким образом экспрессии мРНК DUX4-fl, белка DUX4 или полипептида, кодирующего последующий целевой ген в одной или более тканях указанного субъекта.

20. Способ по п. 19, где указанное заболевание или расстройство представляет собой плече-лопаточно-лицевую мышечную дистрофию (FSHD), необязательно, FSHD1 или FSHD2.

21. Способ по п. 19 или п. 20, где у указанного субъекта снижена репрессия в локусе D4Z4.

22. Способ по любому из пп. 19-21, где у указанного субъекта имеется делеция одного или более макросателлитных повторов D4Z4 в субтеломерной области хромосомы 4q35, при этом указанная клетка необязательно содержит ≤ 7 макросателлитных повторов D4Z4 в субтеломерной области хромосомы 4q35.

23. Способ по п. 19 или п. 20, где у указанного субъекта имеется одна или более мутаций в гене содержащего гибкий шарнирный домен белка поддержания структуры хромосом 1 (SMCHD1).

24. Способ по п. 23, где у указанного субъекта имеется по меньшей мере один неделетированный аллель 4qA.

25. Способ по любому из пп. 19-24, где указанный агент ингибирует экспрессию белка р38.

26. Способ по любому из пп. 19-25, где указанный агент связывает полинуклеотид, кодирующий указанный белок р38, или его антисмысловой полинуклеотид.

27. Способ по любому из пп. 19-26, где указанный агент содержит нуклеиновую

кислоту или состоит из нуклеиновой кислоты, которая необязательно представляет собой ДНК, РНК, гРНК, мшРНК, миРНК или антисмысловой олигонуклеотид.

28. Способ по любому из пп. 19-24, где указанный агент ингибирует активность белка р38.

29. Способ по любому из пп. 19-24 и 28, где указанный агент связывает белок р38.

30. Способ по любому из пп. 19-24, 28 и 29, где указанный агент содержит полипептид или состоит из полипептида, необязательно, белка, пептида, миметика белка, пептидомиметика, или антитела или его функционального фрагмента.

31. Способ по любому из пп. 19-24, 28 и 29, где указанный агент содержит малую молекулу, необязательно, малую органическую молекулу или малую неорганическую молекулу.

32. Способ по любому из пп. 19-31, где указанный последующий целевой ген представляет собой RFPL2, CCNA1, SLC34A2, TPRX1, KHDC1L, ZSCAN4, PRAMEF20, TRIM49, PRAMEF4, PRAME6, PRAMEF15 или ZNF280A.

33. Способ по любому из пп. 19-32, где экспрессия или активность белка р38 снижается по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% в мышечной ткани указанного субъекта.

34. Способ по любому из пп. 19-33, где указанный способ ингибирует экспрессию или активность белка р38 в мышечной ткани указанного субъекта.

35. Способ по любому из пп. 19-34, где указанный способ уменьшает мышечную дегенерацию у субъекта.

36. Способ по любому из пп. 19-35, где указанный способ уменьшает апоптоз мышечных клеток у субъекта.

37. Способ по п. 36, где указанная мышечная ткань является терминально дифференцированной.

38. Способ по п. 11, где указанную фармацевтическую композицию вводят субъекту парентерально.

39. Способ по п. 11, где указанную фармацевтическую композицию вводят в мышечную ткань указанного субъекта.

40. Способ по любому из пп. 19-39, где указанный способ дополнительно включает введение субъекту второго агента для лечения указанного заболевания или расстройства, ассоциированного с повышенной экспрессией белка DUX4 или полипептида, кодируемого последующим целевым геном DUX4.

41. Единичная лекарственная форма фармацевтической композиции, содержащая агент, который обеспечивает снижение количества активного белка р38 в клетке, и фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или эксципиент, где указанная единичная лекарственная форма эффективна для снижения экспрессии или активности

мРНК DUX4-fl, полипептида DUX4 или полипептида, кодируемого последующим целевым геном DUX4, в одной или более клетке или ткани у субъекта, которому вводят указанную единичную лекарственную форму.

42. Единичная лекарственная форма по п. 41, где указанный агент связывает полипептид DUX4 или связывает полинуклеотид, кодирующий указанный полипептид DUX4.

43. Единичная лекарственная форма по п. 41 или п. 42, где указанный агент содержит нуклеиновую кислоту или состоит из нуклеиновой кислоты, которая необязательно представляет собой ДНК, РНК, гРНК, мшРНК, миРНК или антисмысловой олигонуклеотид.

44. Единичная лекарственная форма по п. 41 или п. 42, где указанный агент содержит полипептид или состоит из полипептида, необязательно, белка, пептида, миметика белка, пептидомиметика, или антитела или его функционального фрагмента.

45. Единичная лекарственная форма по п. 41 или п. 42, где указанный агент содержит малую молекулу, необязательно, органическую молекулу или неорганическую молекулу.

46. Единичная лекарственная форма по любому из пп. 41-45, где указанный последующий целевой ген представляет собой RFPL2, CCNA1, SLC34A2, TPRX1, KHDC1L, ZSCAN4, PRAMEF20, TRIM49, PRAMEF4, PRAME6, PRAMEF15 или ZNF280A.

47. Единичная лекарственная форма по любому из пп. 41-46, где указанная ткань представляет собой мышечную ткань, при этом указанная ткань необязательно содержит клетки, содержащие мутацию, ассоциированную с плече-лопаточно-лицевой мышечной дистрофией (FSHD).

48. Способ снижения апоптоза мышечной клетки, включающий приведение указанной клетки в контакт с агентом, который обеспечивает снижение количества активного белка р38 в указанной клетке, при этом указанная мышечная клетка необязательно является терминально дифференцированной, со снижением таким образом экспрессии мРНК DUX4-fl, белка DUX4 или полипептида, кодируемого последующим целевым геном DUX4, в клетке.

49. Способ по п. 48, где указанная клетка отличается повышенным уровнем экспрессии мРНК DUX4-fl, полипептида DUX4 или полипептида, кодируемого последующим целевым геном, по сравнению с уровнем экспрессии указанного полипептида DUX4 или полипептида, кодируемого последующим целевым геном, в контрольной клетке.

50. Способ по п. 49, где указанный повышенный уровень экспрессии мРНК DUX4-fl, полипептида DUX4 или полипептида, кодируемого последующим целевым геном, обусловлен сниженной репрессией в локусе D4Z4 в клетке.

51. Способ по любому из пп. 48-50, где указанная клетка ассоциирована с плече-лопаточно-лицевой мышечной дистрофией (FSHD).

52. Способ по любому из пп. 48-51, где указанная клетка содержит делецию одного или более макросателлитных повторов D4Z4 в субтеломерной области хромосомы 4q35, необязательно при этом указанная клетка содержит ≤ 7 макросателлитных повторов D4Z4 в субтеломерной области хромосомы 4q35.

53. Способ по любому из пп. 48-52, где указанная клетка содержит одну или более мутаций в гене содержащего гибкий шарнирный домен белка поддержания структуры хромосом 1 (SMCHD1).

54. Способ по п. 53, где указанная клетка содержит по меньшей мере один неделетированный аллель 4qA.

55. Способ по любому из пп. 53-59, где указанный агент ингибирует экспрессию белка p38.

56. Способ по любому из пп. 48-55, где указанный агент связывает полинуклеотид, кодирующий указанный белок p38, или его антисмысловый полинуклеотид.

57. Способ по любому из пп. 48-56, где указанный агент содержит нуклеиновую кислоту или состоит из нуклеиновой кислоты, которая необязательно представляет собой ДНК, РНК, мшРНК, миРНК или антисмысловый олигонуклеотид.

58. Способ по любому из пп. 48-54, где указанный агент ингибирует активность белка p38.

59. Способ по любому из пп. 48-54 и 58, где указанный агент связывает белок p38.

60. Способ по любому из пп. 48-54, 583 и 59, где указанный агент содержит полипептид или состоит из полипептида, необязательно, белка, пептида, миметика белка, пептидомиметика, или антитела или его функционального фрагмента.

61. Способ по любому из пп. 48-54, 58 и 59, где указанный агент содержит малую молекулу, необязательно, малую органическую молекулу или малую неорганическую молекулу.

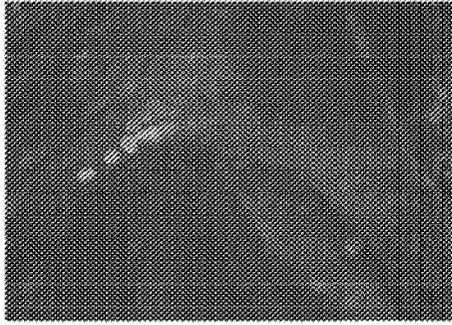
62. Способ по любому из пп. 48-61, где указанный последующий целевой ген представляет собой RFPL2, CCNA1, SLC34A2, TPRX1, KHDC1L, ZSCAN4, PRAMEF20, TRIM49, PRAMEF4, PRAME6, PRAMEF15 или ZNF280A.

63. Способ по любому из пп. 48-62, где экспрессия или активность белка p38 снижается по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100%.

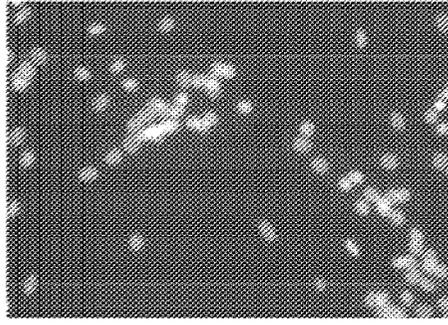
64. Способ по любому из пп. 48-63, где указанный способ уменьшает апоптоз мышечных клеток в мышечной ткани по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100%.

По доверенности

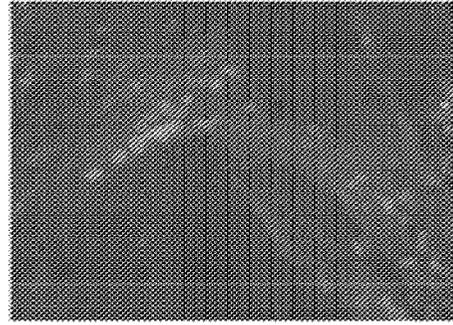
пораженные
FSHD мышечные
трубочки



DUX4

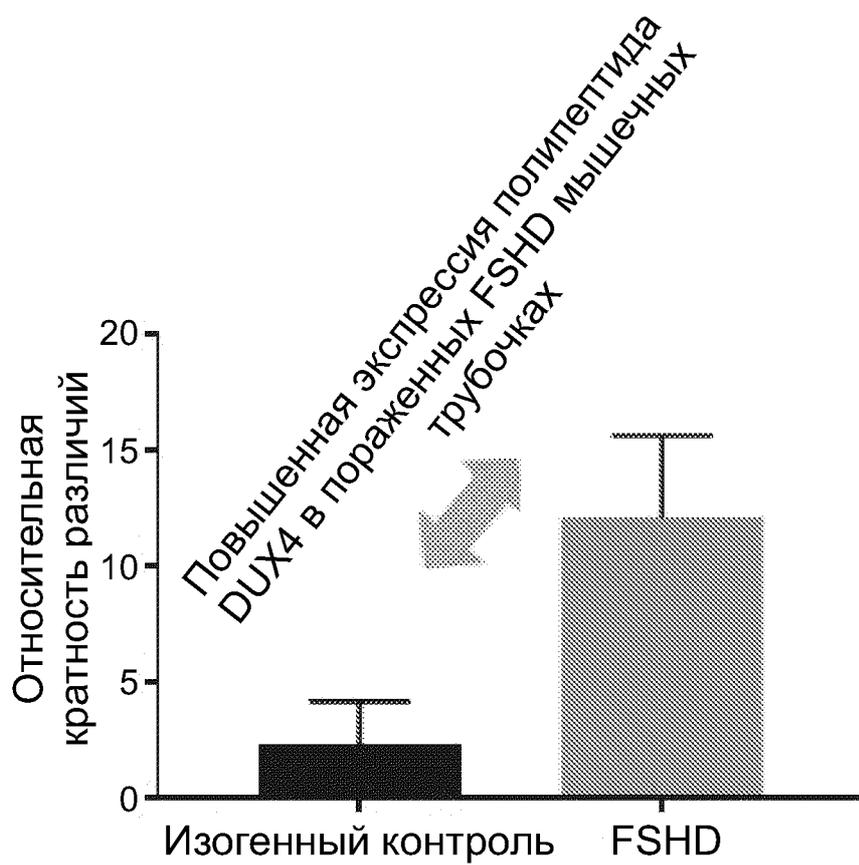


DAPI



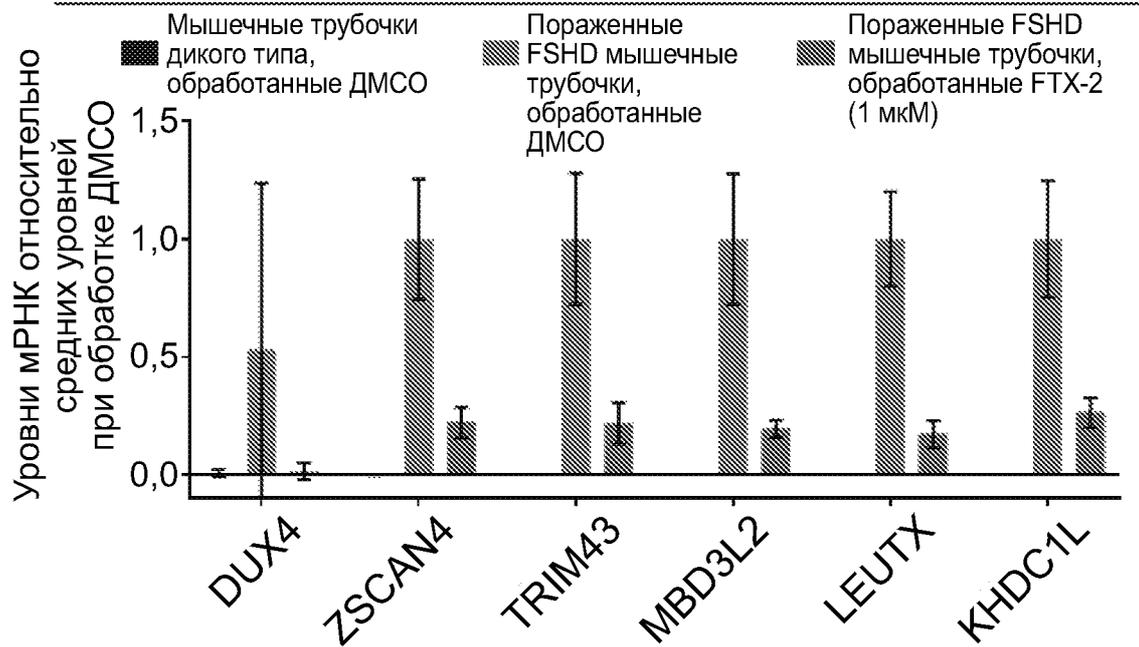
DUX4 + DAPI

Фиг. 1А

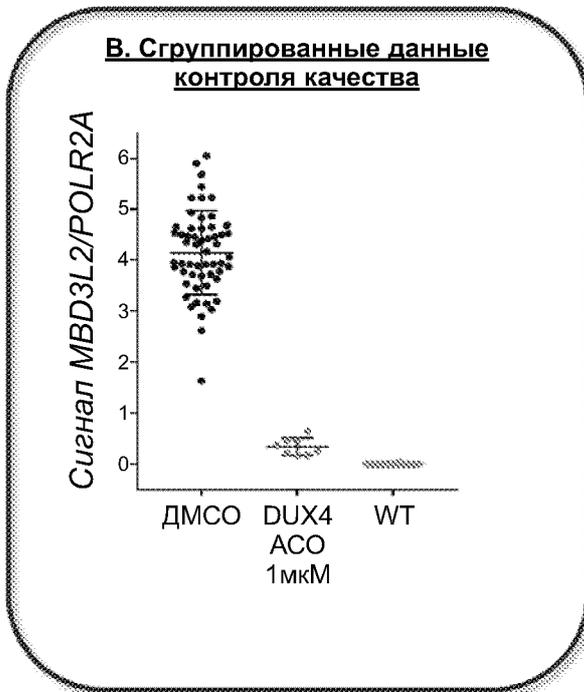


Фиг. 1В

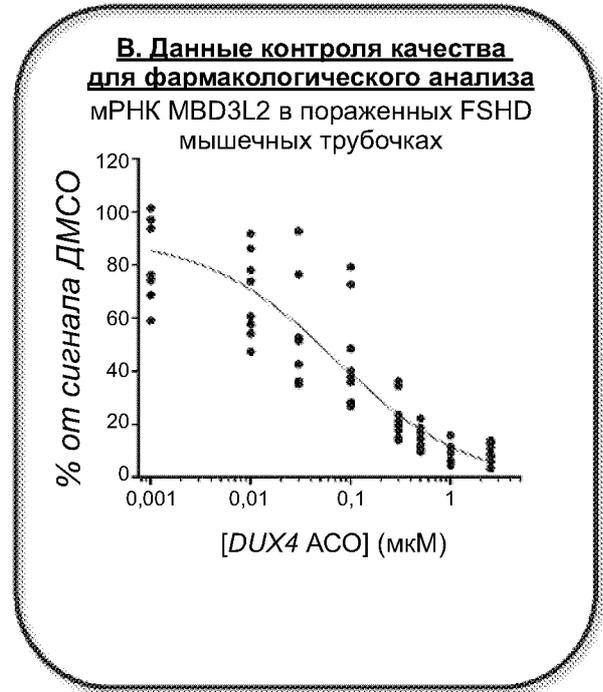
Репрессия регулируемых DUX4 генов



Фиг. 2



Фиг. 3А



Фиг. 3В

В. Статистика анализа

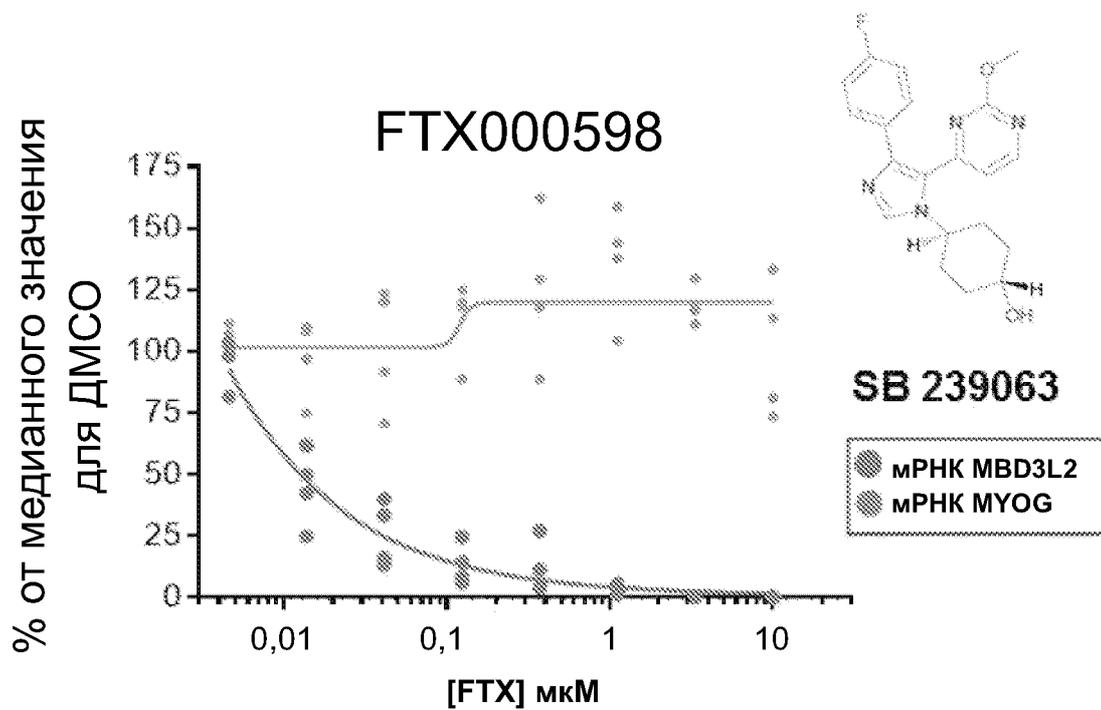
Z' ДМСО-WT: 0,512

S/N WT: 5,1

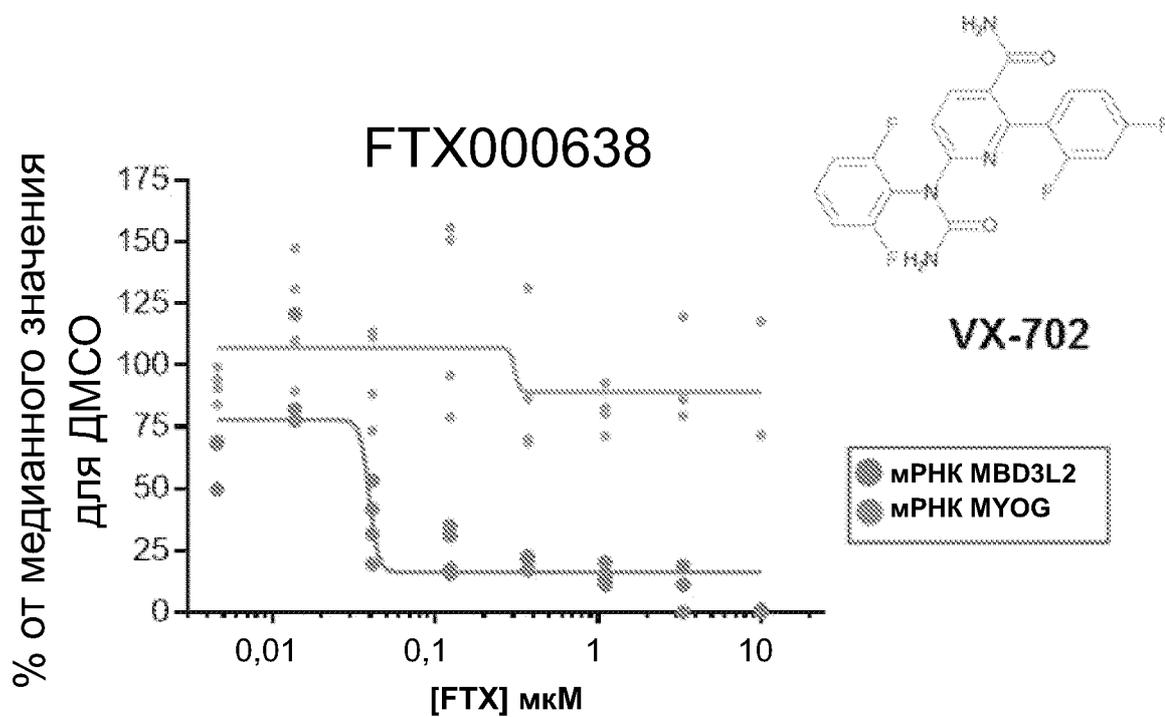
Z' ДМСО-DUX4 ACO: 0,319

S/N ДМСО-DUX4 ACO: 4,6

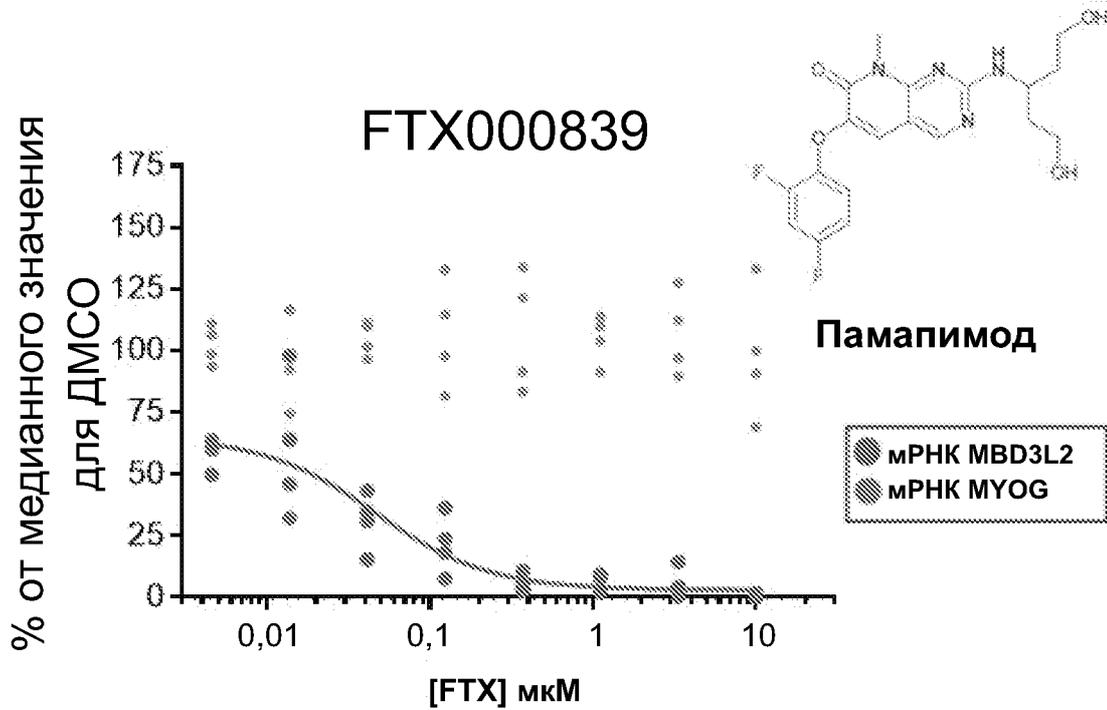
Фиг. 3С



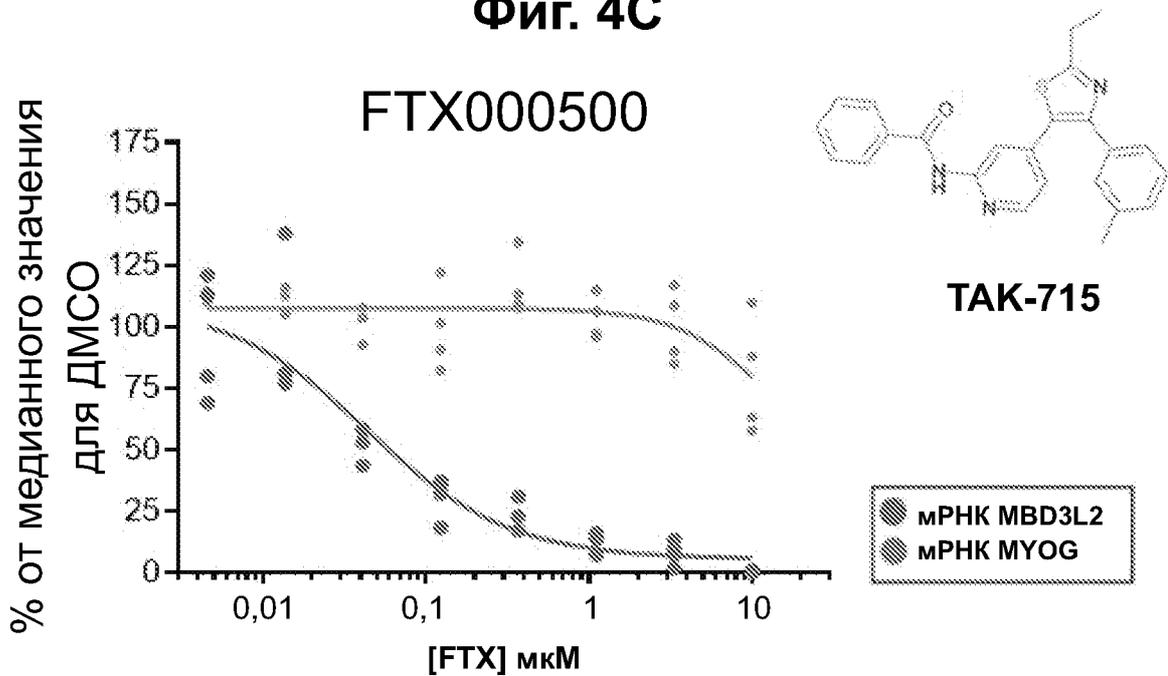
Фиг. 4А



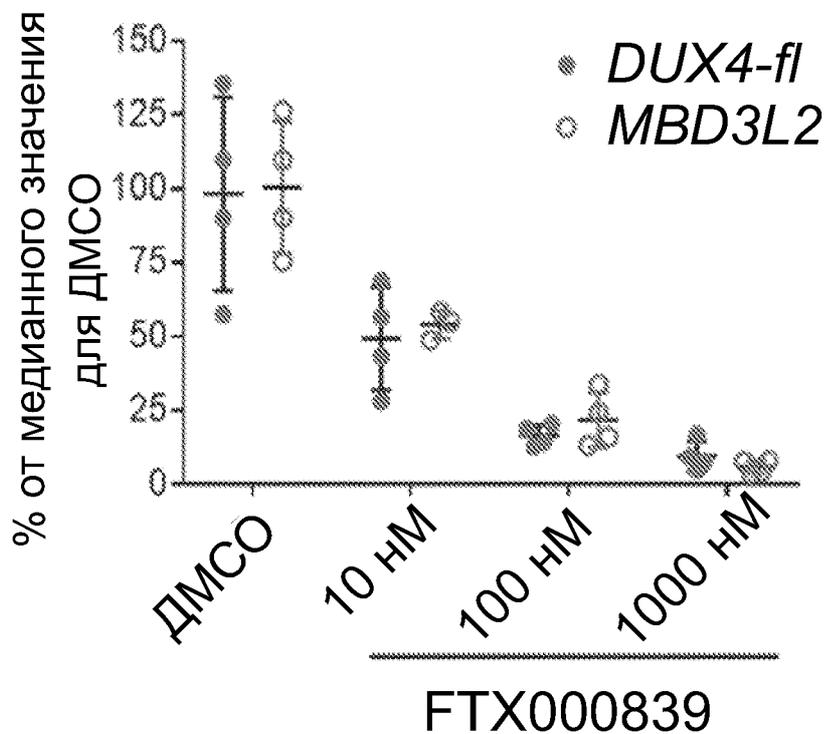
Фиг. 4В



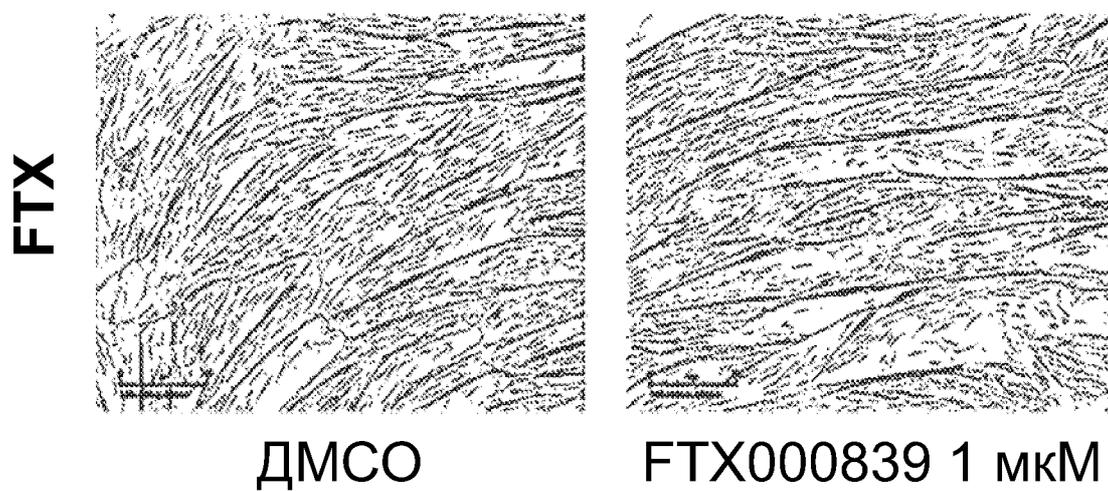
Фиг. 4С



Фиг. 4D

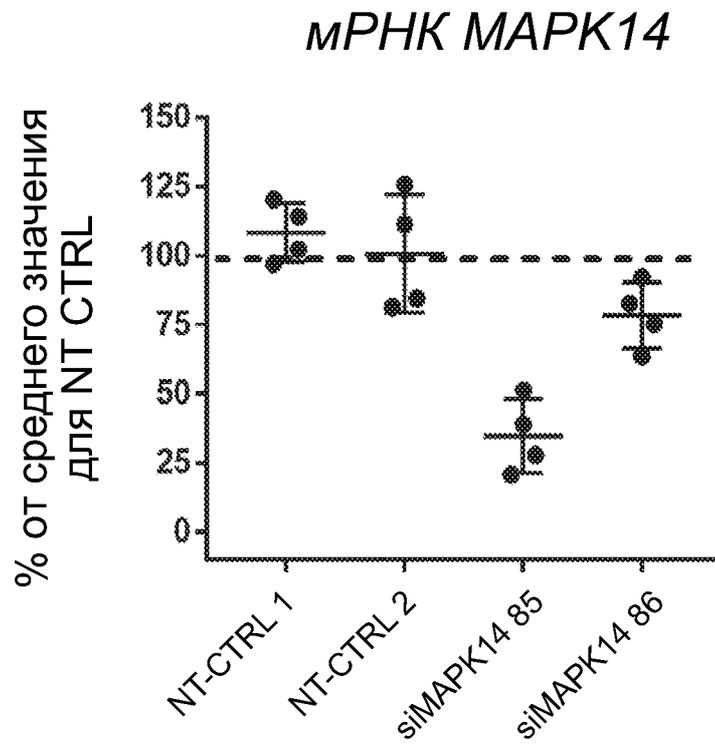


Фиг. 5А

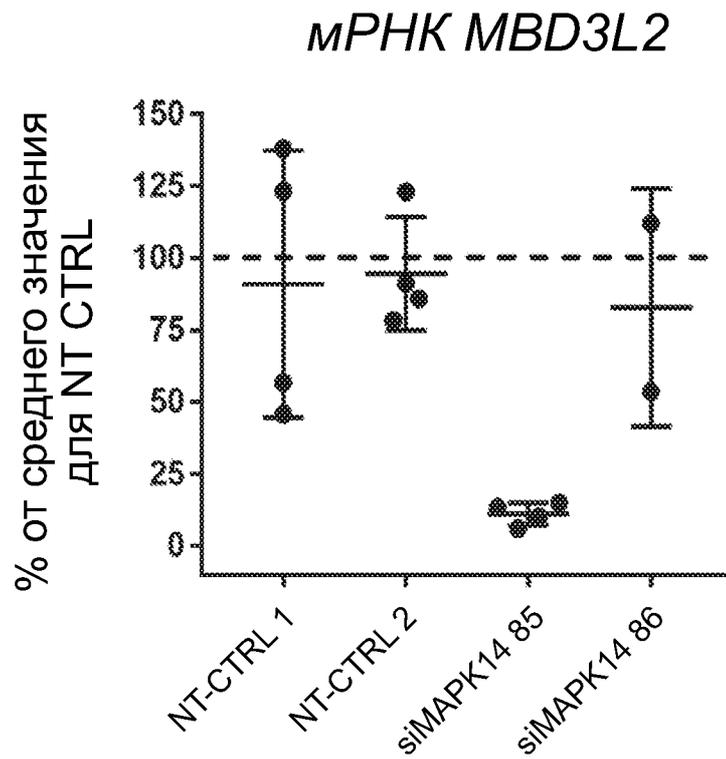


Фиг. 5В

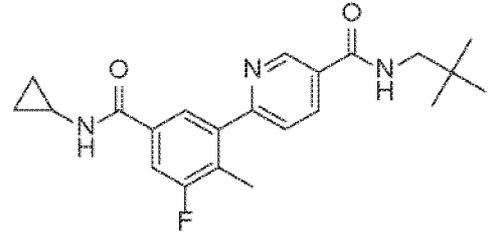
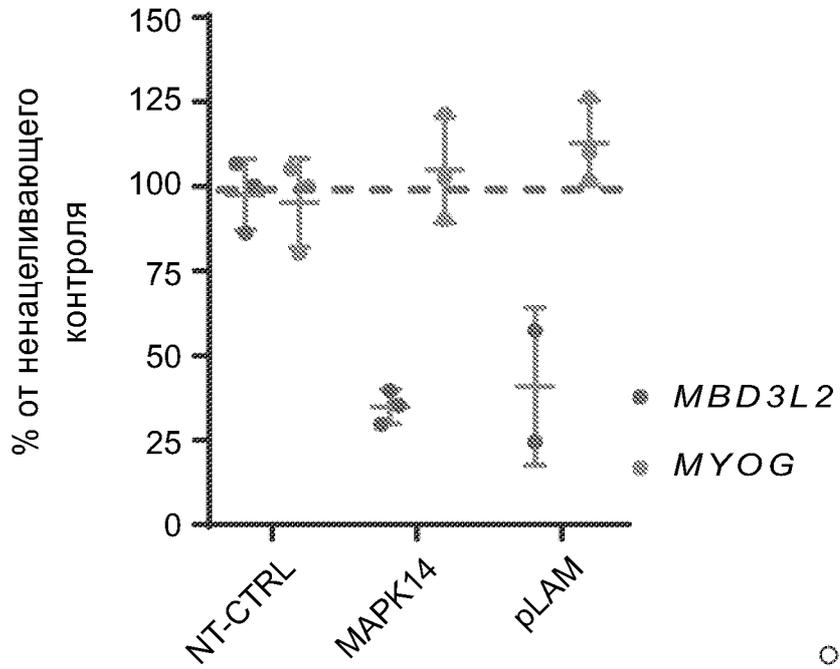
Фиг. 6А



Фиг. 6В

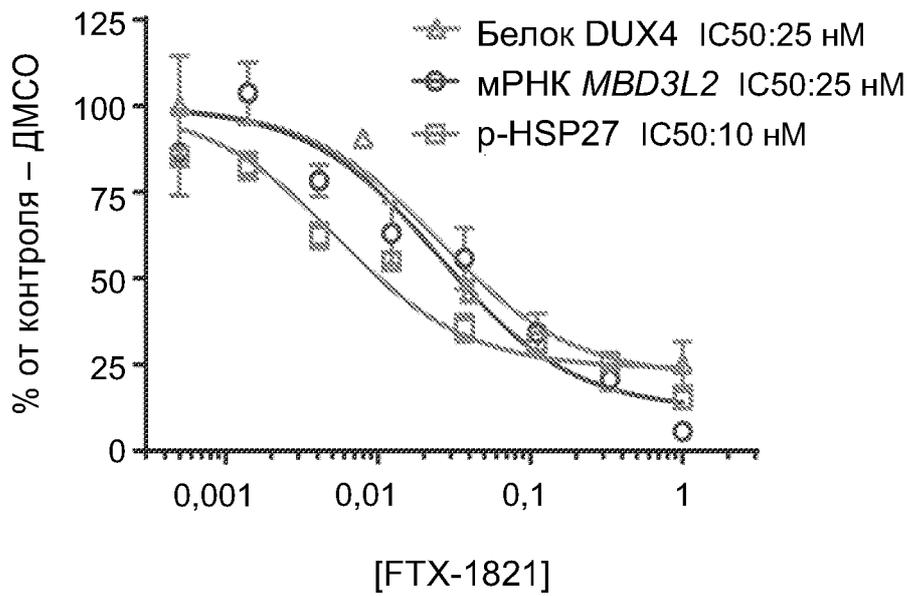


Фиг. 6С



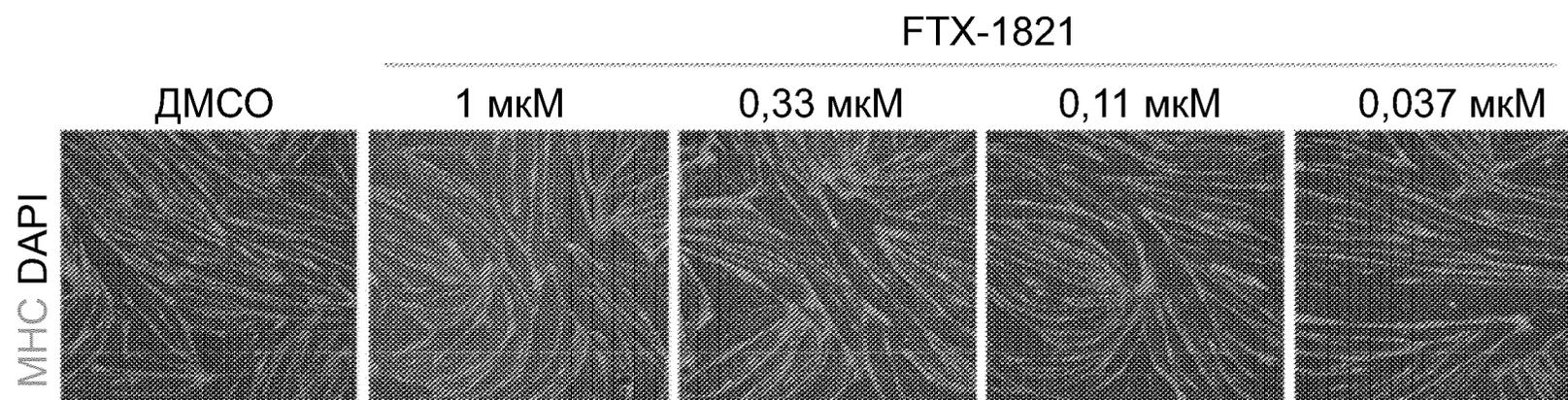
FTX-1821

Фиг. 7



При окрашивании на МНС не обнаружено изменений в образовании мышечных трубочек после обработки FTX-1821

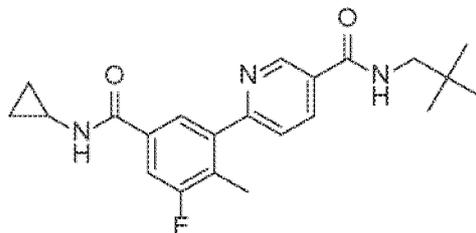
A



10/26

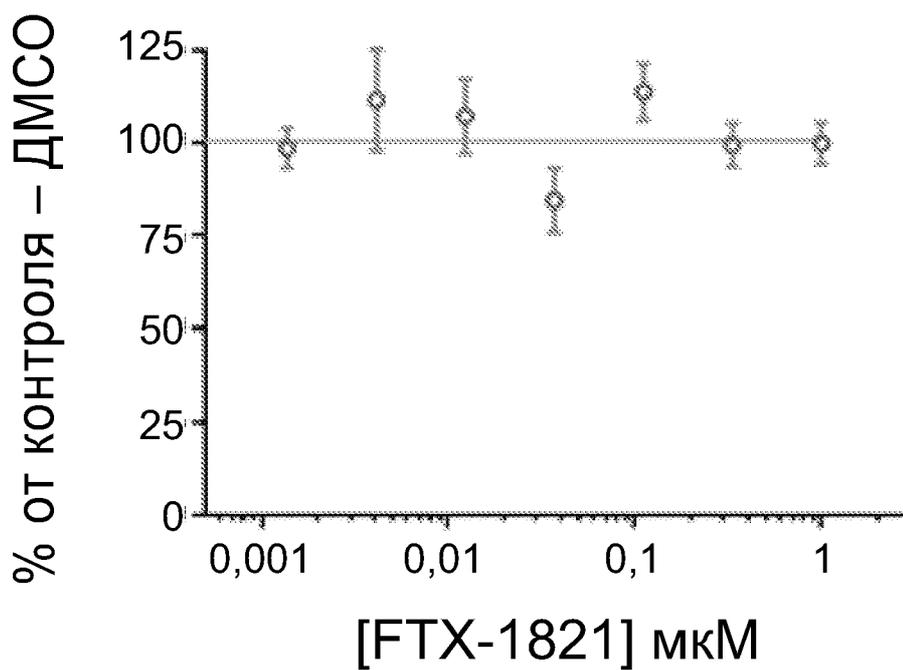
Фиг. 8А

11/26



FTX-1821

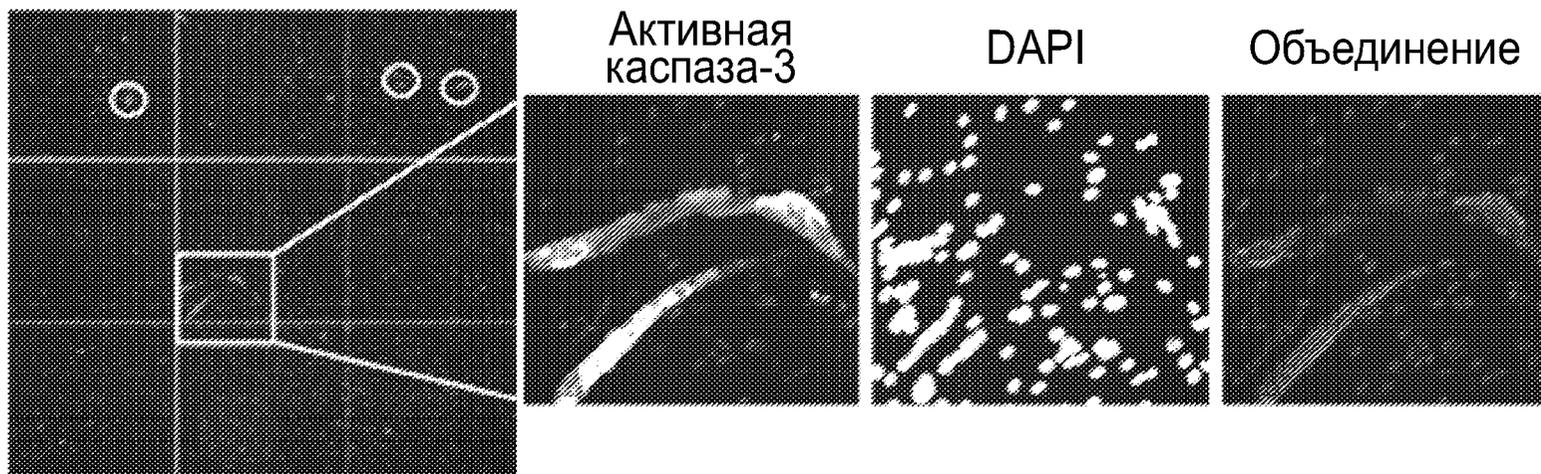
Количественное определение ядер в МНС+ мышечных трубках после обработки FTX-1821



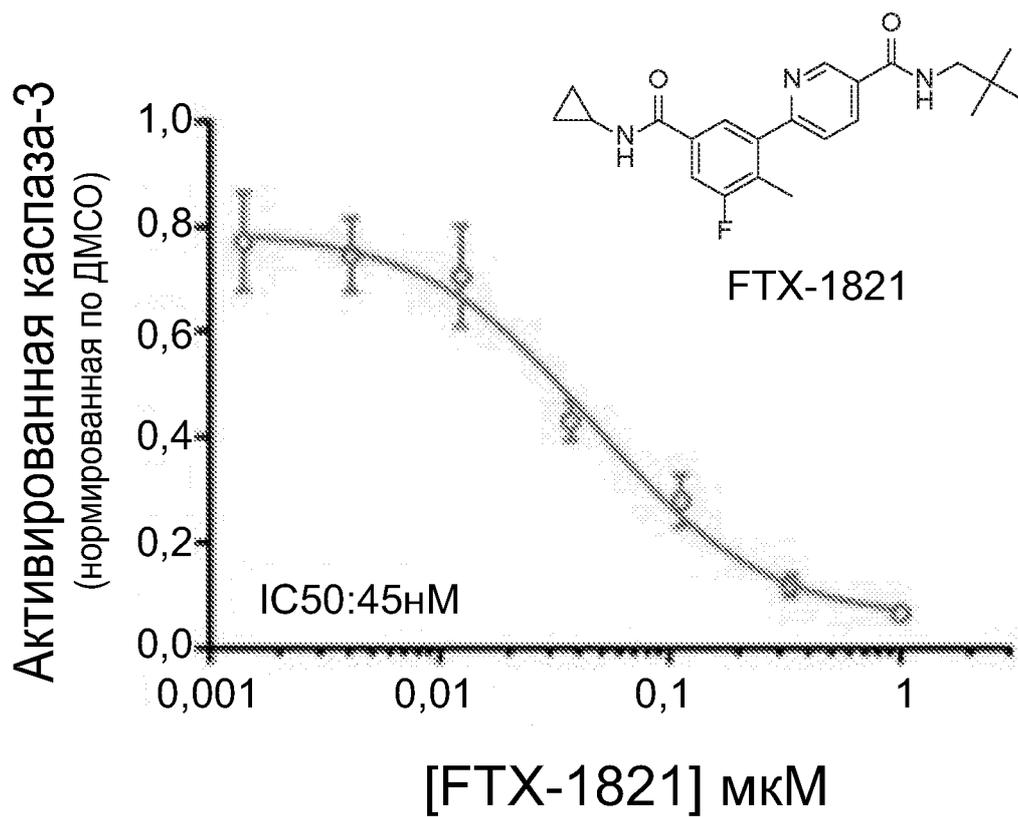
Фиг. 8В

A

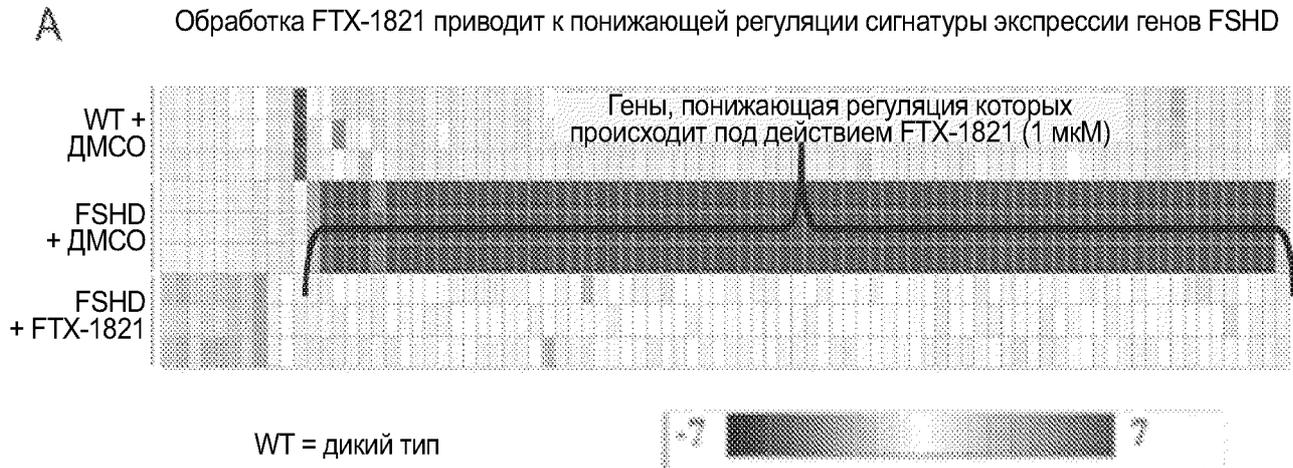
Детекция апоптоза в пораженных FSHD мышечных трубочках



Фиг. 9А



Фиг. 9В

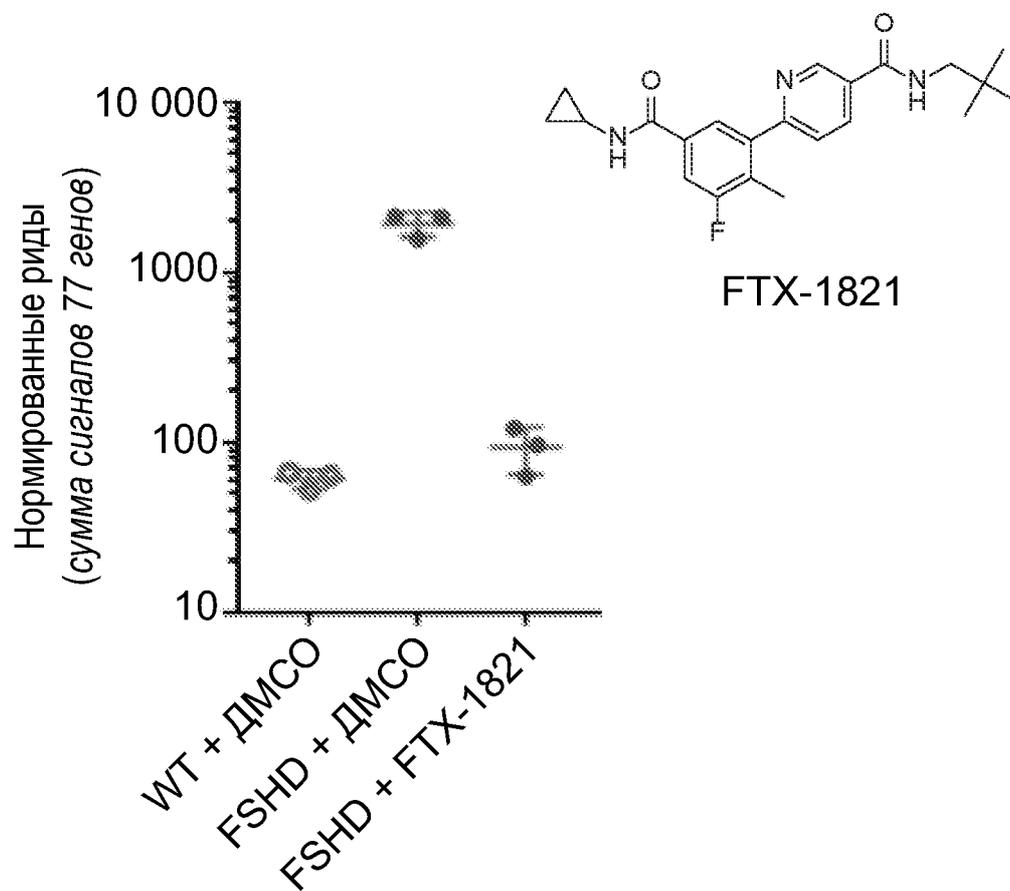


Гены, понижающая регуляция которых происходит под действием FTX-1821:

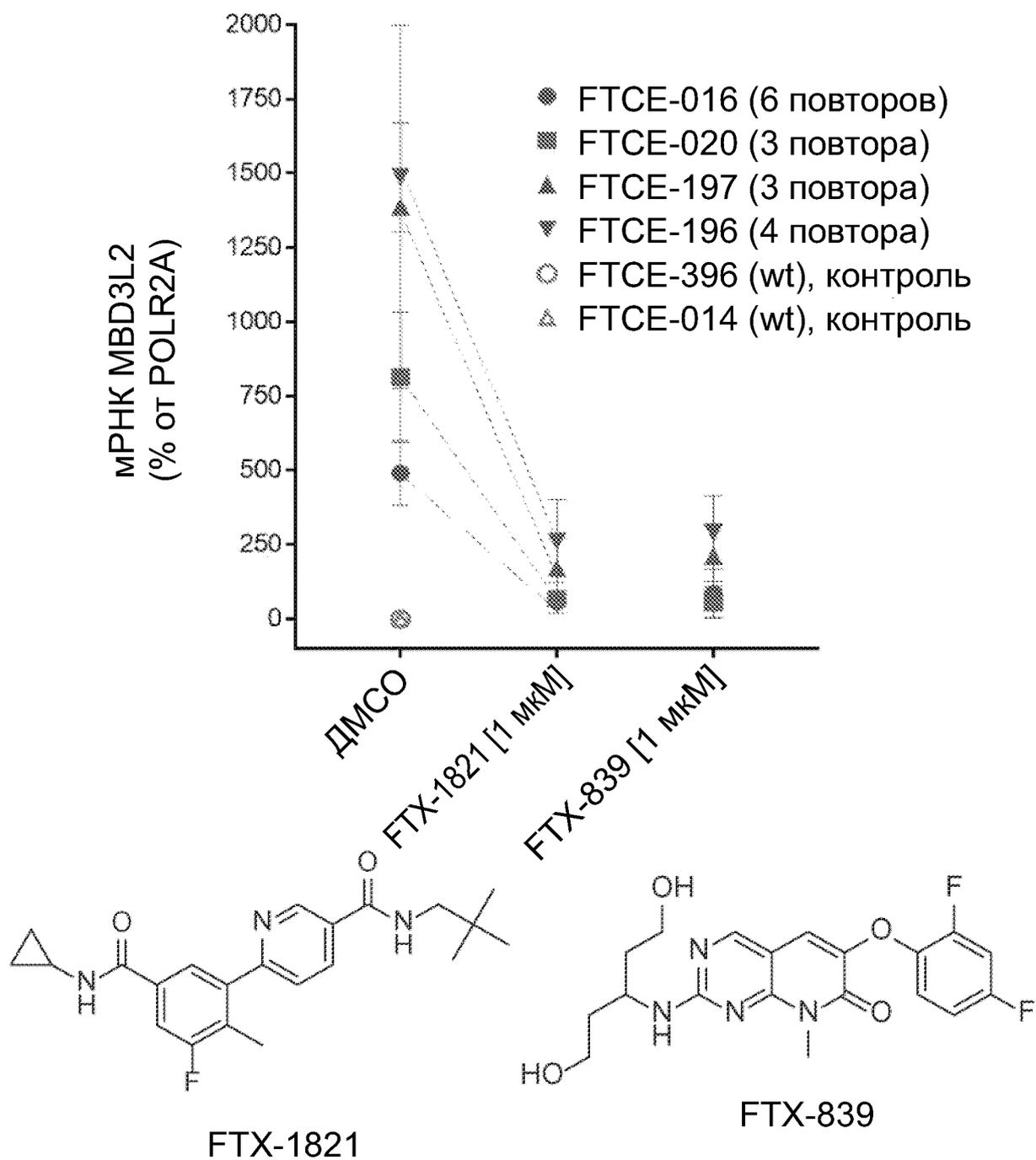
ZSCAN4	TRIM51BP	MBD3L3	UBTFL5	AP001043.1	ABRA
PRAMEF20	KHDC1P1	KDM4F	HNRNPCL3	MBD3L5	WIPF3
PRAMEF6	RFPL4A	DUXA	ZIM3	TRIM51CP	UBTFL1
PRAMEF17	ZSCAN5DP	TPRX1	TRIM53BP	TRIM53CP	POU5F1B
PRAMEF1	PRAMEF9	PRAMEF13	TRIM53AP	CILP	UBTFL2
ZNF705E	KLF17	TRIM43	DPPA3	SLC2A3	FAM151A
LEUTX	RFPL2	MBD3L2	MBD3L2B	TRIM49	TRIM60
PRAMEF15	CCNA1	PRAMEF11	USP29	ZNF705G	PRAMEF28P
ZNF705A	PRAMEF2	PRAMEF14	ZNF296	TRIM43CP	KLF18
PRAMEF12	HNRNPCL1	KHDC1L	F2RL1	TRIM48	SNAI1P1
SLC34A2	DUXB	PRAMEF19	FREM2	UBTFL6	HUNK
HNRNPCL2	HSPA6	PRAMEF4	PRAMEF8	PRAMEF33	P2RX1
PRAMEF18	TRIM43B	KDM4E	TRIM51	C1DP2	TPRX2P
TRIM49C	TC2N	TRIM49B	IGFN1	DPYSL5	FAM9C
					GJA5
					IMPG2

Фиг. 10А

Гены, понижающая регуляция которых происходит под действием FTX-1821, являются FSHD-специфическими



Фиг. 10В

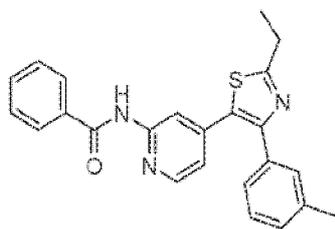


Фиг. 11

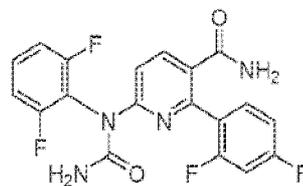
Таблица 1.

НАЗВАНИЕ ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА	ФОРМАТИРОВАННЫЙ ИДЕНТИФИКАТОР	IC50 MBD3L2 (нМ)
ТАК-715	FTX000500	48
VX-702	FTX000638	41
R1487	FTX000830	6
Памапимод	FTX000839	10
AS1940477	FTX001341	20
Лосмапимод	FTX001821	30
LY2228820	FTX002865	10
SCIO-469	FTX004078	25
Дорамапимод	FTX004385	42
BMS-582949	FTX005041	68
PH-797804	FTX005042	10
Пексметиниб	FTX005043	5

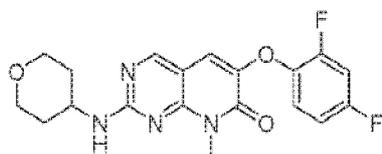
Фиг. 12А



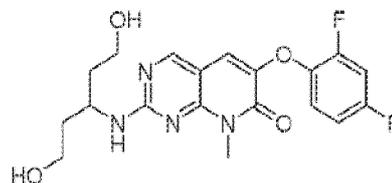
FTX-500
«TAK-715»



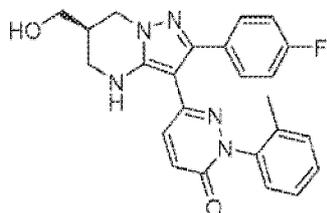
FTX-638
«VX-702»



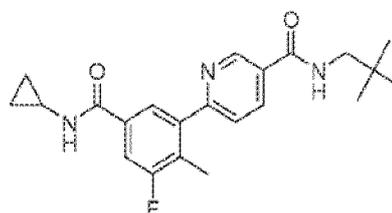
FTX-830
«R1487»



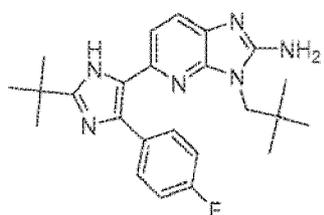
FTX-839
«Памапимод»



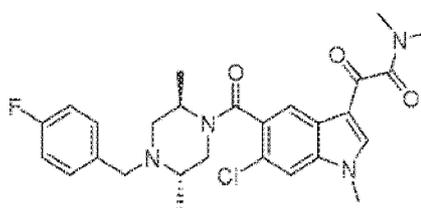
FTX-1341
«AS1940477»



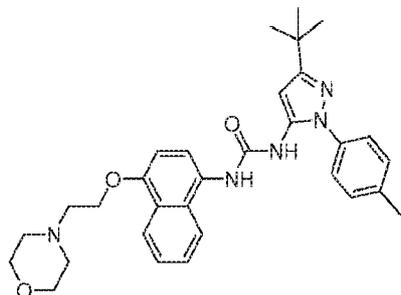
FTX-1821
«Лоспапимод»



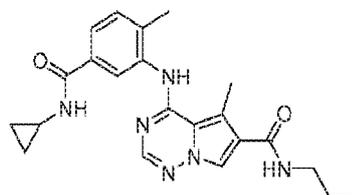
FTX-2865
«LY2228820»



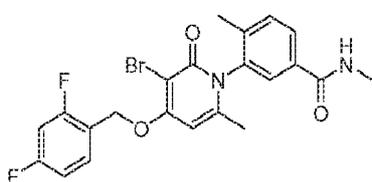
FTX-4078
«SCIO-469»



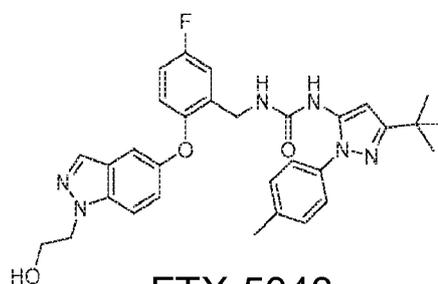
FTX-4385
«Дорамапимод»



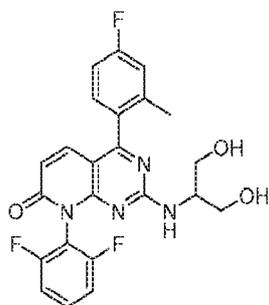
FTX-5041
«BMS-582949»



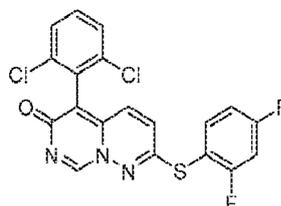
FTX-5042
«PH-797804»



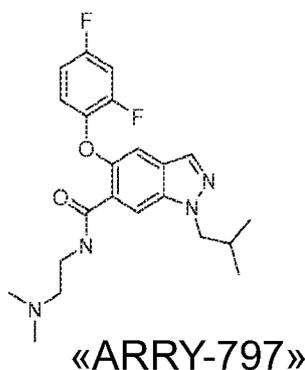
FTX-5043
«Пексметиниб»



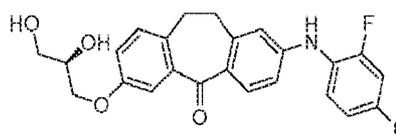
«Дилмапимод»



FTX-4384
«Нефламапимод»
«VX-745»



«ARRY-797»

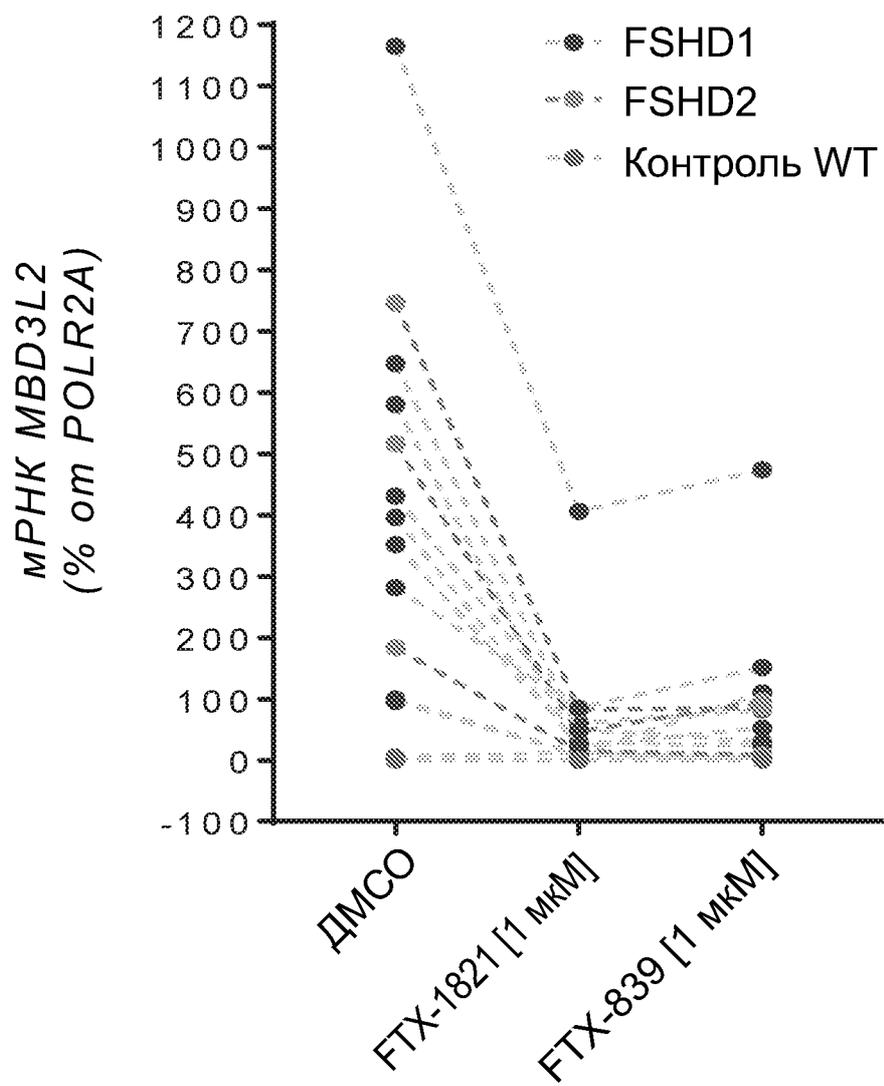


«Скепинон-L»

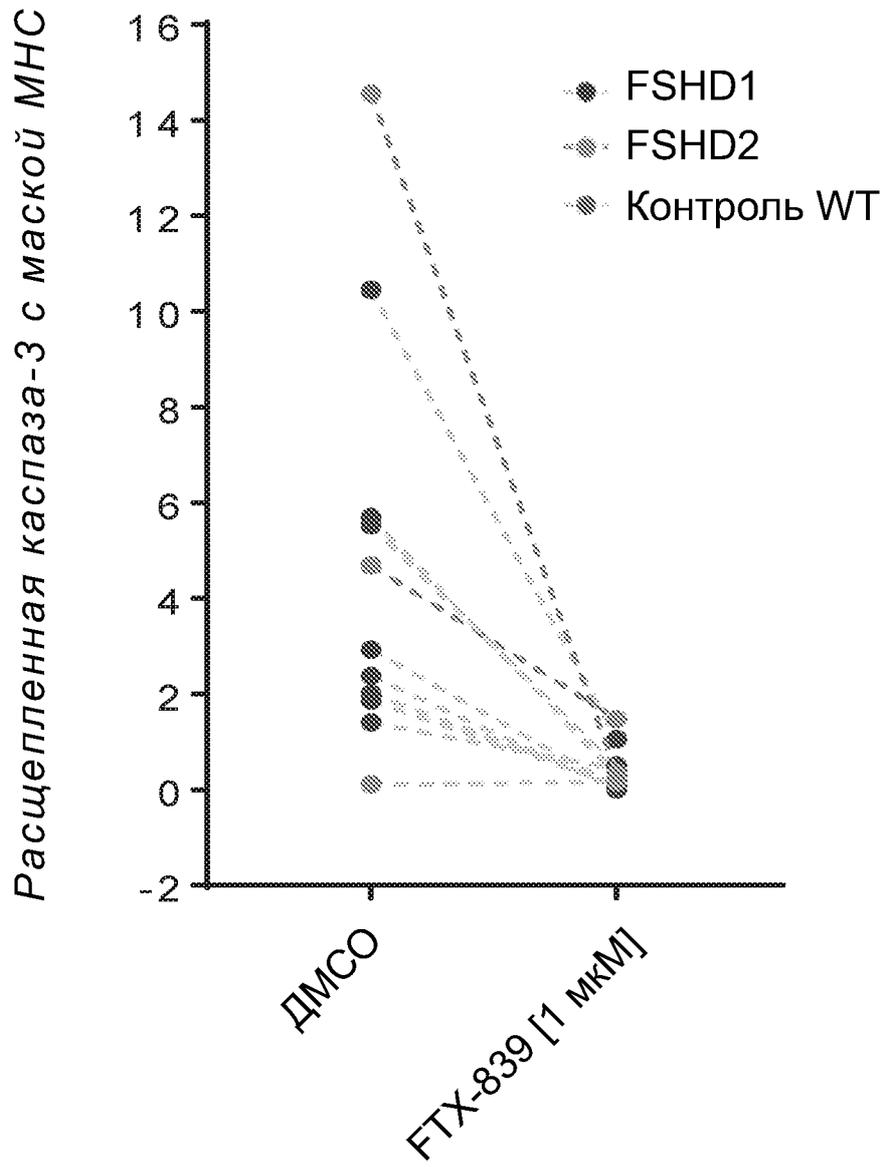
Таблица 2.

CSID №:	Идентификатор	п./и.	Тип клеток	Число повторов	Контроль/ FSHD
CTID-001	FTCE-204	первичные	Миобласты	39	Контроль
CTID-002	FTCE-425	первичные	Миобласты	5,5	FSHD
CTID-003	FTCE-423	первичные	Миобласты	3	FSHD
CTID-004	FTCE-396	первичные	Миобласты	н.о.	Контроль
CTID-005	FTCE-422	первичные	Миобласты	2	FSHD
CTID-006	FTCE-424	первичные	Миобласты	4,5	FSHD
CTID-007	FTCE-426	первичные	Миобласты	4,5	FSHD
CTID-008	FTCE-428	первичные	Миобласты	SMCHD1	FSHD2
CTID-009	FTCE-197	первичные	Миобласты	2	FSHD
CTID-010	FTCE-196	первичные	Миобласты	3	FSHD
CTID-011	FTCE-429	первичные	Миобласты	SMCHD1	FSHD2
CTID-012	FTCE-421	первичные	Миобласты	7	FSHD
CTID-013	FTCE-205	первичные	Миобласты	12	Контроль
CTID-014	FTCE-427	первичные	Миобласты	SMCHD1	FSHD2
CTID-015	FTCE-16	иммортализ.	Миобласты	6,5	FSHD
Контроль C6	FTCE-20	иммортализ.	Миобласты	3	FSHD
Контроль WT	FTCE-14	иммортализ.	Миобласты	н.о.	Контроль
Контроль A4	FTCE-18	иммортализ.	Миобласты	н.о.	Контроль

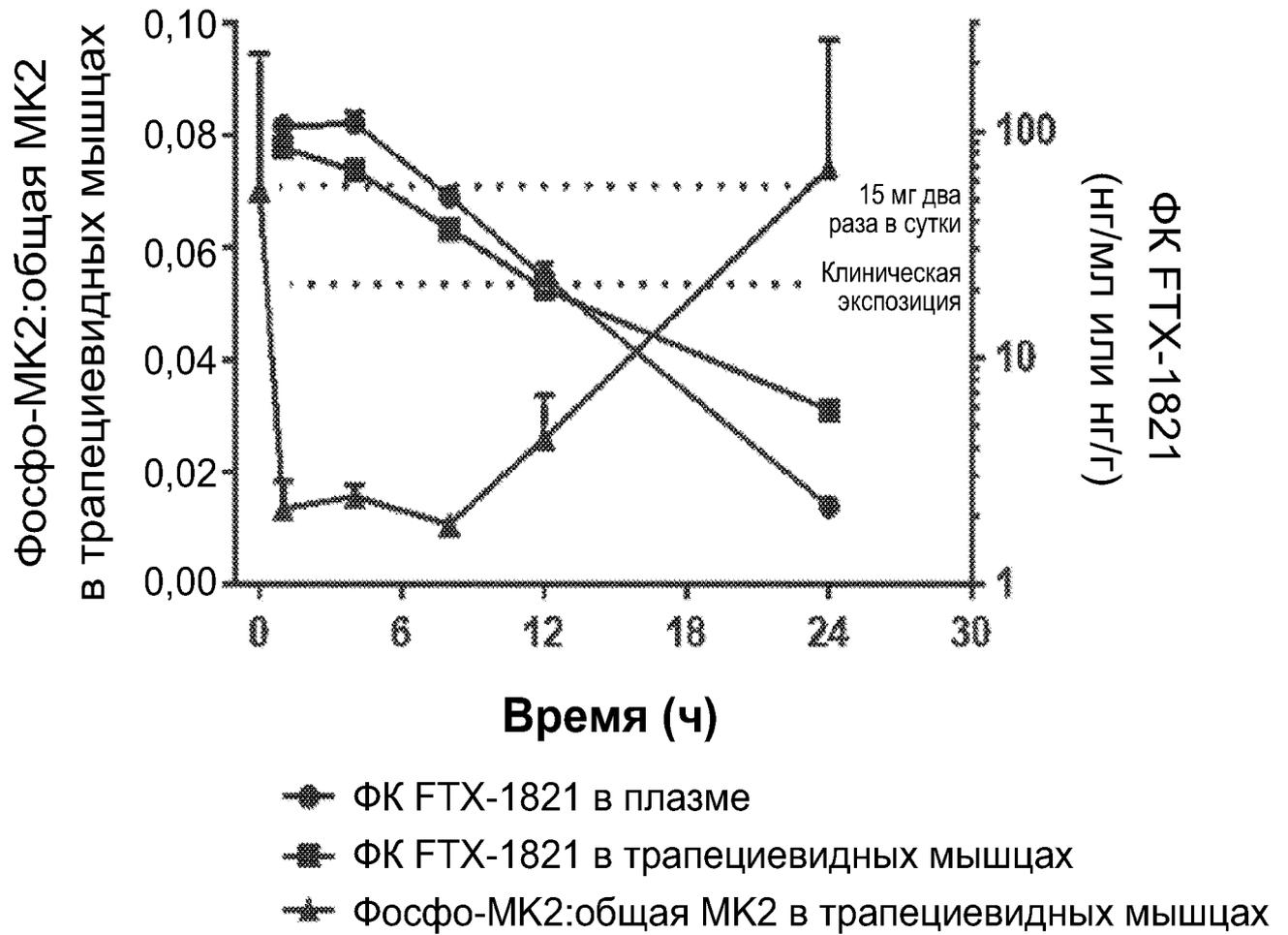
Фиг. 13



Фиг. 14А



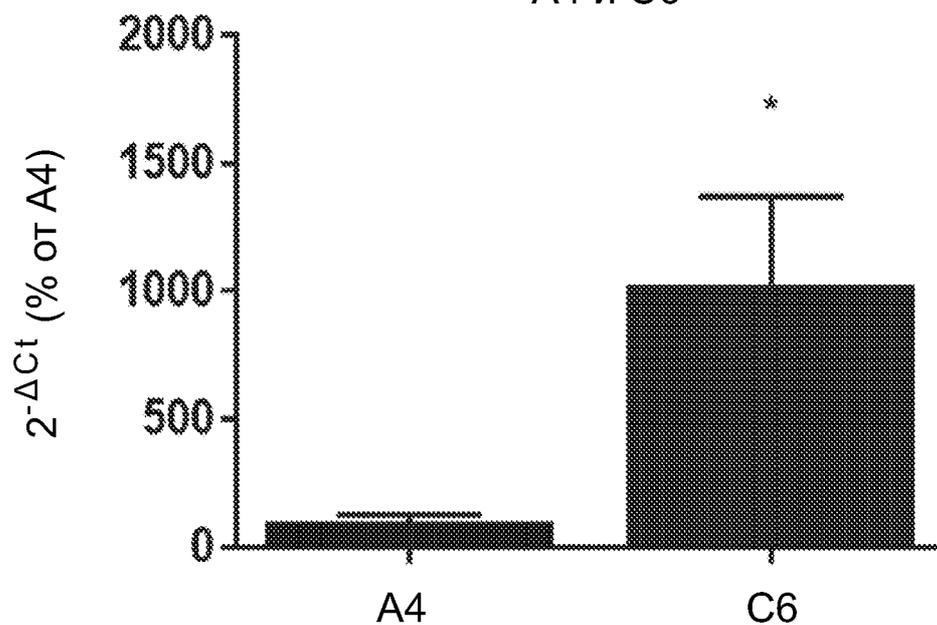
Фиг. 14В



Фиг. 15

**Усиление DUX4-зависимой мРНК-программы в мышцах
мышей с ксенотрансплантатами FSHD или контрольными
ксенотрансплантатами**

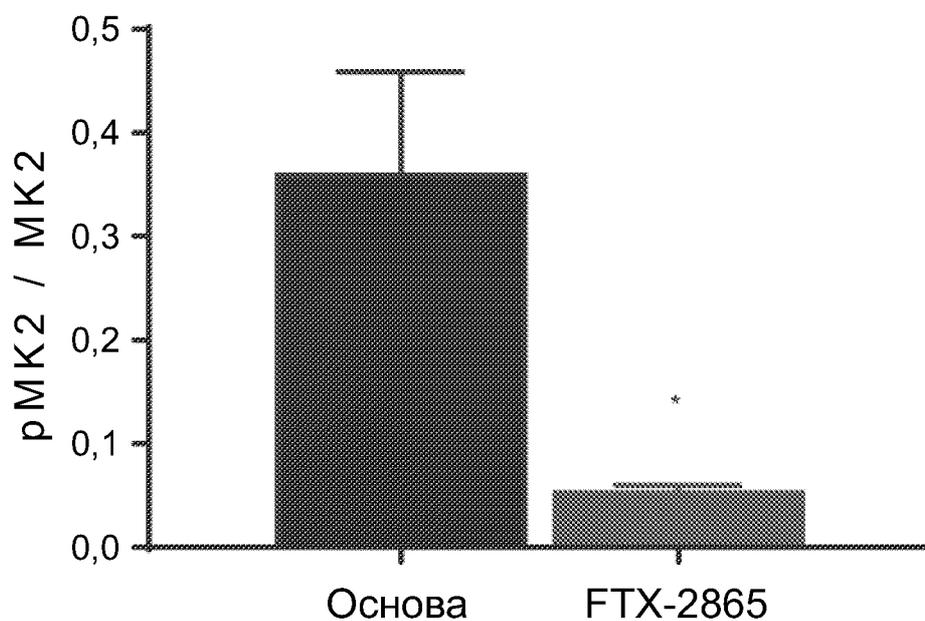
мРНК MBD3L2 в передней
большеберцовой мышце
с ксенотрансплантированными
A4 и C6



Фиг. 16

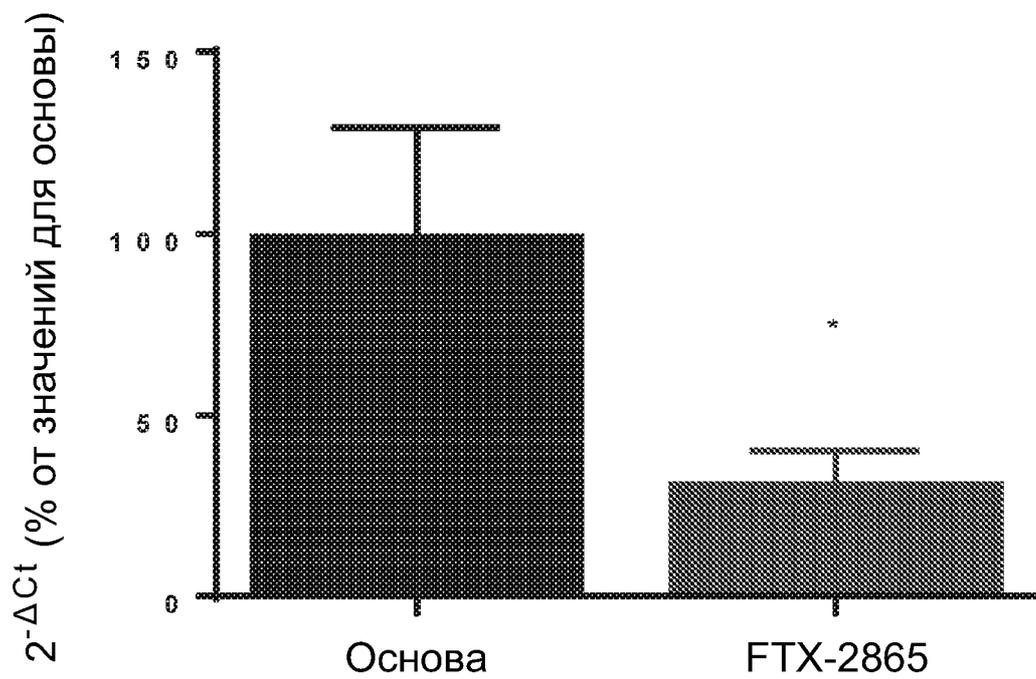
Лечение мышей с FSHD мощным селективным ингибитором p38, FTX-2865, приводит к вовлечению мишени p38 в трапециевидной мышце

Отношение фосфорилированной МК2 к общей МК2
в трапециевидной мышце мышей



Фиг. 17

мРНК MBD3L2 в передней большеберцовой
мышце с ксенотрансплантированными С6



Фиг. 18