

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **045399**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.11.22

(51) Int. Cl. *C12N 15/113* (2010.01)
A61K 31/7125 (2006.01)

(21) Номер заявки
202192330

(22) Дата подачи заявки
2020.02.26

(54) ОЛИГОНУКЛЕОТИДЫ, ПРЕПЯТСТВУЮЩИЕ ЭКСПРЕССИИ БЕЛКА, АССОЦИИРОВАННОГО С СИНДРОМОМ ЛОМКОЙ X-ХРОМОСОМЫ, И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 62/810,697

(56) WO-A1-2012001178
WO-A1-2017075038

(32) 2019.02.26

(33) US

(43) 2021.12.13

(86) PCT/EP2020/055071

(87) WO 2020/174023 2020.09.03

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
НОГРА ФАРМА ЛИМИТЕД (IE)

(72) Изобретатель:
**Вити Франческа, Беллинвиа
Сальваторе (CH)**

(74) Представитель:
**Гизатуллин Ш.Ф., Угрюмов В.М.,
Строкова О.В., Гизатуллина Е.М.,
Парамонова К.В., Джермакян Р.В.,
Костюшенкова М.Ю. (RU)**

(57) В изобретении раскрыты последовательности антисмысловых олигонуклеотидов против белка, ассоциированного с синдромом ломкой X-хромосомы (FMRP), и способы их применения для лечения заболеваний кишечника, таких как рак толстой и прямой кишки и воспалительное заболевание кишечника (например, болезнь Крона и язвенный колит), ассоциированных с повышенной активностью или уровнем экспрессии FMRP. Также раскрыты фармацевтические композиции, содержащие антисмысловой олигонуклеотид для FMRP, пригодный для лечения заболевания кишечника и изготовления лекарственных препаратов, содержащих раскрытый антисмысловой олигонуклеотид для FMRP, подлежащий применению в лечении заболевания кишечника.

B1**045399****045399****B1**

Перекрестная ссылка на родственные заявки

По настоящей заявке испрашивается преимущество и приоритет согласно предварительной заявке на выдачу патента США № 62/810697, поданной 26 февраля 2019 г., раскрытие которой включено в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте во всех отношениях.

Предшествующий уровень техники настоящего изобретения РНК-связывающие белки (RBP) вовлечены практически во все стадии посттранскрипционного регуляторного процесса, определяя участь и функцию каждого транскрипта в клетке и обеспечивая клеточный гомеостаз. RBP устанавливают высокостатистические взаимодействия с белками, а также с кодирующими и не кодирующими РНК, создавая функциональные единицы, называемые рибонуклеопротеиновыми комплексами, которые осуществляют регуляцию сплайсинга, полиаденилирования, стабильности, локализации, трансляции и деградации РНК.

Теперь стало ясно, что при разных типах рака регуляция RBP нарушена, что влияет на экспрессию и функцию проонкогенных белков и белков-супрессоров опухоли и медиаторов воспаления. По результатам нескольких исследований были представлены данные о том, что RBP аномально экспрессируются при раке, по сравнению со смежными нормальными тканями, и их экспрессия коррелирует с прогнозом у пациентов. В последние годы белок, ассоциированный с синдромом ломкой X-хромосомы (fragile X mental retardation protein, FMRP), получает признание как крайне важный в контроле развития и роста множества разных типов рака человека. Мутации или отсутствие FMRP вызывают синдром ломкой X-хромосомы (FXS), наиболее часто встречающуюся форму наследственной умственной отсталости у людей. FMRP является RBP, вовлеченным в несколько стадий метаболизма РНК. В головном мозге его функциональное отсутствие вызывает нарушение синаптической пластичности из-за дефектов в организации цитоскелета и мобильности рецепторов в синапсах. В зависимости от типа целевой мРНК, наличия не кодирующей РНК и/или клеточного окружения, FMRP может действовать как отрицательный регулятор трансляции, модулировать стабильность мРНК, регулировать транспорт мРНК или влиять на редактирование РНК. Примечательно, что FMRP-регулируемые мРНК вовлечены в осуществление нескольких механизмов, обеспечивающих контроль прогрессирования и метастазирования рака.

Совпадающие данные подчеркивают вовлечение FMRP в разные типы рака: ген FMR1, который кодирует FMRP, экспрессируется в разных тканях и типах раковых клеток; аутосомный паралог и партнер FMR1, FXR1, недавно был идентифицирован как предиктор отдаленного метастазирования при трижды негативном раке молочной железы; и несколько мРНК-мишеней FMRP вовлечены в прогрессирование рака. Более того, по сравнению с показателями в общей популяции, стандартизованный коэффициент заболеваемости для рака у пациентов с FSX значительно ниже, и пациенты с FSX могут быть защищены от определенных форм рака.

Рак толстой и прямой кишки (CRC) является одним из наиболее распространенных форм рака по всему миру, от которого ежегодно умирает более полумиллиона человек. Модель онкогенеза CRC включает несколько генетических изменений, которые требуются для инициации и прогрессирования рака. Эти изменения в значительной степени обусловлены изменениями онкогенных и/или онкосупрессорных сигнальных путей, которые отвечают за переход нормальной слизистой оболочки в аденоматозный полип, а затем в карциному. Выяснилось, что опухолевые клетки толстой кишки используют посттранскрипционные механизмы, которые позволяют быстро и надежно регулировать уровни экспрессии белка в ответ на внутренние и внеклеточные сигналы, что приводит к адаптации клеток к локальному микроокружению.

В эпидемиологических/генетических исследованиях также было задокументировано частое развитие связанных с иммунитетом нарушений (например, тиреоидита, ревматоидного артрита, синдрома Шегрена, системной красной волчанки и рассеянного склероза) у женщин, у которых наблюдаются аллели FMR1 с премутацией, содержащие расширенный тринуклеотидный (CGG) повторяющийся элемент. Хотя остается неизвестным основной механизм, посредством которого такие изменения гена FMRP обуславливают предрасположенность к патологиям иммунной системы, в двух недавних исследованиях было задокументировано изменение профиля цитокинов у детей с FSX.

Воспалительное заболевание кишечника (IBD) является хроническим воспалительным нарушением желудочно-кишечного тракта, от которого страдают примерно 1,4 млн пациентов в США. Это одно из пяти наиболее распространенных заболеваний желудочно-кишечного тракта в Соединенных Штатах, при этом общие расходы на здравоохранение составляют более 1,7 млрд долларов. Каждый год в Соединенных Штатах на IBD приходится более 700000 посещений врача, 100000 случаев госпитализации и недееспособность у 119000 пациентов. В настоящее время не существует лекарств, поэтому для управления течением заболевания требуется пожизненное наблюдение.

Двумя наиболее распространенными формами IBD являются болезнь Крона и язвенный колит. Хотя болезнь Крона может поражать весь желудочно-кишечный тракт, она в первую очередь поражает подвздошную кишку (дистальную или нижнюю часть тонкого кишечника) и толстый кишечник. Язвенный колит в первую очередь поражает толстую кишку и прямую кишку. Этиология воспалительного заболевания кишечника до конца не изучена, хотя считается, что в развитии заболевания играют роль как факторы окружающей среды, так и генетические факторы. Компоненты окружающей среды могут включать изменения флоры кишечника, на которую влияет воздействие употребляемых продуктов питания и ле-

карственных препаратов.

IBD ассоциировано с болью в животе, рвотой, диареей, ректальным кровотечением, сильными судорогами, мышечными спазмами, потерей массы, недоеданием, лихорадкой и анемией. Пациенты с IBD могут также страдать от кожных поражений, болей в суставах, воспаления глаза и нарушений со стороны печени, а дети, страдающие язвенным колитом, могут страдать от нарушений роста. Хотя эти симптомы редко приводят к летальному исходу, они снижают качество жизни пациентов.

Таким образом, существует острая необходимость в разработке способов лечения заболеваний кишечника, таких как CRC и IBD. Также существует необходимость в идентификации способов лечения, которые обеспечивают эффективное и постоянное облегчение симптомов у широкого спектра пациентов и которые не ассоциированы с побочными эффектами или циклами ремиссии и/или воспаления.

Краткое раскрытие настоящего изобретения

В настоящем документе описаны антисмысловые олигонуклеотиды, которые ингибируют экспрессию белка, ассоциированного с синдромом ломкой X-хромосомы (FMRP), и способы их применения. Согласно некоторым вариантам осуществления настоящее раскрытие относится к способу лечения заболевания кишечника у нуждающегося в этом пациента, предусматривающему введение пациенту эффективного количества антисмыслового олигонуклеотида, который ингибирует экспрессию FMRP. Согласно некоторым вариантам осуществления заболевание кишечника может представлять собой рак толстой и прямой кишки или воспалительное заболевание кишечника, такое как болезнь Крона или язвенный колит. Согласно некоторым вариантам осуществления антисмысловой олигонуклеотид индуцирует некроптоз.

Согласно некоторым вариантам осуществления настоящее раскрытие относится к способу лечения солидной опухоли, опухолевой инвазии или метастазирования опухоли у нуждающегося в этом пациента, предусматривающему введение пациенту эффективного количества антисмыслового олигонуклеотида, который ингибирует экспрессию FMRP. Согласно некоторым вариантам осуществления настоящее раскрытие относится к способу предупреждения или устранения опухолевой инвазии или метастазирования опухоли. Согласно определенным вариантам осуществления настоящее раскрытие относится к способу предупреждения или устранения опухолевой инвазии при раке толстой и прямой кишки или метастазирования опухоли при раке толстой и прямой кишки.

Согласно некоторым вариантам осуществления антисмысловой олигонуклеотид, который ингибирует экспрессию FMRP, содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из

5'-CCACCACCAGCTCCTCCA-3' (SEQ ID NO: 1),

5'-CTTCCACCACCAGCTCCT-3' (SEQ ID NO: 2),

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

5'-CTTCCACCACCAGCTCC-3' (SEQ ID NO: 4) и

5'-TCACCCTTTATCATCCTC-3' (SEQ ID NO: 5)

или их комплементарной нити.

Согласно дополнительным вариантам осуществления антисмысловой олигонуклеотид, который ингибирует экспрессию FMRP, содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из

5'-TCCACCACCAGCTCCTCCAT-3' (SEQ ID NO: 6),

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

5'-TTCCACCACCAGCTCCTCCA-3' (SEQ ID NO: 8),

5'-ACTTCCACCACCAGCTCCT-3' (SEQ ID NO: 9) и

5'-CTCACCCCTTTATCATCCTCA-3' (SEQ ID NO: 10)

или их комплементарной нити.

Согласно некоторым вариантам осуществления антисмысловой олигонуклеотид, который ингибирует экспрессию FMRP, состоит из последовательности, выбранной из группы, состоящей из

5'-TCCACCACCAGCTCCTCCAT-3' (SEQ ID NO: 6),

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

5'-TTCCACCACCAGCTCCTCCA-3' (SEQ ID NO: 8),

5'-ACTTCCACCACCAGCTCCT-3' (SEQ ID NO: 9) и

5'-CTCACCCCTTTATCATCCTCA-3' (SEQ ID NO: 10)

или их комплементарной нити.

Согласно некоторым вариантам осуществления антисмысловой олигонуклеотид может представлять собой антисмысловой олигонуклеотид, в котором по меньшей мере одна межнуклеозидная связь последовательности представляет собой фосфоротиоатную связь, фосфородитиоатную связь, фосфотриэфирную связь, алкилфосфонатную связь, аминокислотфосфотриэфирную связь, алкиленфосфонатную связь, фосфинатную связь, фосфорамидатную связь, фосфоморфолидатную связь, фосфопиперазидатную

связь, аминоклфосфорамидатную связь, тиофосфорамидатную связь, тионоклфосфонатную связь, тионоклфосфотриэфирную связь, тиофосфатную связь, селенофосфатную связь или боранофосфатную связь. Согласно конкретному варианту осуществления по меньшей мере одна межнуклеозидная связь последовательности антисмыслового олигонуклеотида представляет собой фосфоротиоатную связь. Согласно некоторым вариантам осуществления все из межнуклеозидных связей последовательности антисмыслового олигонуклеотида представляют собой фосфоротиоатные связи. Согласно некоторым вариантам осуществления по меньшей мере одна нуклеозидная связь последовательности представляет собой метилфосфонатную связь.

Число нуклеотидов, включенных в описанные в настоящем документе антисмысловые олигонуклеотиды для FMRP, может варьироваться. Например, согласно некоторым вариантам осуществления длина антисмыслового олигонуклеотида составляет от 20 до 40 нуклеотидов. Согласно некоторым вариантам осуществления длина антисмыслового олигонуклеотида составляет от 20 до 24 нуклеотидов.

Согласно некоторым вариантам осуществления антисмысловой олигонуклеотид для FMRP индуцирует некроптоз посредством активации комплекса взаимодействующая с рецептором протеинкиназа 1 (RIP1 или RIPK1) - взаимодействующая с рецептором протеинкиназа 3 (RIP3 или RIPK3) - белок, подобный домену киназ смешанного происхождения (MLKL). Например, антисмысловой олигонуклеотид для FMRP может обеспечивать повышение уровня экспрессии RIPK1.

Согласно некоторым вариантам осуществления антисмысловой олигонуклеотид для FMRP содержит один или несколько рибонуклеотидов, один или несколько дезоксирибонуклеотидов или смесь рибонуклеотидов и дезоксирибонуклеотидов.

Согласно некоторым вариантам осуществления антисмысловой олигонуклеотид для FMRP содержит один или несколько модифицированных нуклеозидов, например, 5-метилцитидин, 5-метил-2'-дезоксцитидин, дезоксцитидин, 5-метил-2'-дезоксцитидин-5'-монофосфат или 3-метил-2'-дезоксцитидин-6'-монофосфотриоат. Согласно определенным вариантам осуществления антисмысловой олигонуклеотид для FMRP содержит один или несколько модифицированных нуклеозидов, например, 2'-О-метилцитидин, 2'-О-метилгуанозин, 2'-О-метилтимидин, 2'-О-метилуридин или 2'-О-метиладенозин. Согласно некоторым вариантам осуществления антисмысловой олигонуклеотид для FMRP содержит один или несколько модифицированных нуклеотидов, например, 5-метилцитозин или 5-метилгуанин. Согласно некоторым вариантам осуществления антисмысловые олигонуклеотиды для FMRP содержат один или несколько модифицированных нуклеотидов, например, 2'-О-(2-метоксиэтил)-нуклеозиды, 2'-дезокс-2'-фтор-нуклеозиды или 2'-фтор-β-D-арабинонуклеозиды.

Согласно некоторым вариантам осуществления антисмысловой олигонуклеотид для FMRP предусматривает мостиковые нуклеиновые кислоты, запертые нуклеиновые кислоты (LNA), нуклеиновые кислоты с конформационно ограниченными этиловыми аналогами нуклеозидов (сЕТ), трицикло-ДНК (tcDNA), нуклеиновые кислоты с 2'-О,4'-С-этиленовым мостиком (ЕНА) или пептидо-нуклеиновые кислоты (PNA).

Согласно некоторым вариантам осуществления антисмысловой олигонуклеотид для FMRP представляет собой siRNA для FMRP или ее фармацевтически приемлемую соль.

Согласно некоторым вариантам осуществления антисмысловой олигонуклеотид для FMRP вводят пациенту энтерально или парентерально. Например, согласно некоторым вариантам осуществления антисмысловой олигонуклеотид для FMRP вводят пациенту перорально, сублингвально, желудочно или ректально. Согласно другим вариантам осуществления введение антисмыслового олигонуклеотида для FMRP пациенту представляет собой внутривенное, внутриопухолевое введение, введение в тощую кишку, в подвздошную кишку, в толстую кишку или в прямую кишку.

Согласно конкретным вариантам осуществления антисмысловой олигонуклеотид для FMRP по настоящему раскрытию предназначен для лечения заболевания кишечника у пациента-человека.

Также в настоящем документе описана фармацевтически приемлемая композиция, содержащая описанный в настоящем документе антисмысловой олигонуклеотид для FMRP и фармацевтически приемлемый носитель. Согласно некоторым вариантам осуществления фармацевтическая композиция подходит для перорального, сублингвального, желудочного или ректального введения. Согласно другим вариантам осуществления фармацевтическая композиция подходит для внутривенного, внутриопухолевого введения, введения в тощую кишку, в подвздошную кишку, в толстую кишку или в прямую кишку.

Также в настоящем документе описано применение антисмыслового олигонуклеотида для FMRP в изготовлении лекарственного препарата для лечения заболевания кишечника. Согласно некоторым вариантам осуществления заболевание кишечника представляет собой CRC или IBD, такое как болезнь Крона или язвенный колит. Согласно другим вариантам осуществления лекарственный препарат вводят пациенту энтерально или парентерально. Например, согласно некоторым вариантам осуществления лекарственный препарат подходит для перорального, сублингвального, желудочного или ректального введения. Согласно некоторым вариантам осуществления лекарственный препарат подходит для внутривенного, внутриопухолевого введения, введения в тощую кишку, в подвздошную кишку, в толстую кишку или в прямую кишку. Согласно некоторым вариантам осуществления лекарственный препарат предназначен для лечения заболевания кишечника у человека.

Согласно некоторым вариантам осуществления настоящее раскрытие относится к применению антисмыслового олигонуклеотида для FMRP в изготовлении лекарственного препарата для лечения солидной опухоли, опухолевой инвазии или метастазирования опухоли.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1A представлены полученные с помощью иммуногистологического способа изображения, на которых показаны результаты окрашивания по FMRP в CRC-образцах от человека (IgG = изотипический контроль; NC = нормальный контрольный образец толстой кишки; P = образец окружающей опухоль ткани; T = образец опухоли). Фиг. 1B представляет собой линейный график, на котором показаны данные по уровням экспрессии мРНК FMRP в образцах окружающей опухоль ткани (P) и CRC-опухоли (T), как определено с помощью RT-PCR-анализа ($**P < 0,01$). Фиг. 1C представляет собой блотограмму, на которой показана экспрессия белка FMRP в парных образцах окружающей опухоль ткани (P) и CRC-опухоли (T) от пациентов с CRC. Фиг. 1D представляет собой график, на котором показаны данные по экспрессии белка FMRP относительно экспрессии β -актина в парных образцах окружающей опухоль ткани (P) и CRC-опухоли (T), как измерено с помощью количественной денситометрии по результатам вестерн-блот-анализа (относительная экспрессия показана в относительных единицах (о.е.)).

Фиг. 2A представляет собой эндоскопические фото толстой кишки необработанных мышей дикого типа (WT) и нокаутных (KO) по FMR1 мышей или мышей спустя 21 неделю после внутрибрюшинной инъекции азоксиметана (AOM). Фиг. 2B представляют собой столбчатые графики, на которых показаны опухолевая масса (слева) и размер опухоли (справа) в толстой кишке WT и FMR1-KO мышей спустя 21 неделю после внутрибрюшинной инъекции AOM ($*p < 0,05$, $**p < 0,01$). Фиг. 2C представляет собой график, на котором показан % выживаемости WT и FMR1-KO мышей, которым путем внутрибрюшинной инъекции вводили AOM. Фиг. 2D представляет собой гистологические изображения, на которых показаны результаты окрашивания гематоксилином и эозином (H&E) образцов, полученных из AOM-индуцируемых опухолей у WT и FMR1-KO мышей. Фиг. 2E представляет собой блотограмму, на которой показана экспрессия белка FMRP и β -актина (контроль нагрузки) в образцах толстой кишки, полученных от необработанных мышей WT и AOM-обработанных мышей (P = образец окружающей опухоль ткани; T = образец CRC-опухоли). Фиг. 2F представляет собой гистологические изображения, на которых показаны результаты TUNEL-окрашивания образцов, полученных из AOM-индуцируемых опухолей у WT и FMR1-KO мышей. Фиг. 2G представляет собой полученные с помощью иммуногистологического способа изображения, на которых показаны результаты окрашивания по Ki67 в образцах AOM-индуцируемой опухоли от WT и FMR1-KO мышей.

Фиг. 3A представляет собой репрезентативную блотограмму, на которой показана экспрессия белка FMRP и β -актина (контроль нагрузки) в линиях клеток рака толстой кишки человека DLD-1 и HCT-116 и не являющейся раковой линии эпителиальных клеток толстой кишки человека HCEC-1ct. Фиг. 3B представляет собой график, на котором показаны данные по экспрессии белка FMRP относительно экспрессии β -актина в линиях клеток DLD-1, HCT-116 и HCEC-1ct, как определено с помощью денситометрии по результатам вестерн-блот-анализов, описанных на фиг. 3A (относительная экспрессия показана в относительных единицах (о.е.)) ($**p < 0,01$, $***p < 0,001$). Фиг. 3C представляет собой иммунофлуоресцентные изображения, на которых показаны клетки DLD-1, HCT-116 и HCEC-1ct, окрашенные в отношении экспрессии FMRP. Фиг. 3D, 3G и 3I представляют собой блотограммы, на которых показана экспрессия белка FMRP и β -актина (контроль нагрузки) в клетках DLD-1, клетках HCT-116 и клетках HCEC-1ct соответственно, обработанных смысловыми или антисмысловыми олигонуклеотидами для FMRP (U = необработанные; S = смысловой; AS = антисмысловой) в течение 48 ч. На фиг. 3E, 3H и 3J показаны точечные графики данных проточной цитометрии для клеток DLD-1, клеток HCT-116 и клеток HCEC-1ct соответственно, обработанных смысловыми или антисмысловыми олигонуклеотидами для FMRP (Отр. = отрицательный контроль окрашивания; U = необработанные; S = смысловой; AS = антисмысловой) и окрашенных йодидом пропидия (PI) и аннексином V (AnnV). На фиг. 3F и 3K показаны столбчатые графики соответствующих данных проточной цитометрии из точечных графиков фиг. 3E и 3J соответственно ($**p < 0,01$).

Фиг. 4A представляет собой гистограммы данных проточной цитометрии, на которых показаны результаты окрашивания по каспазе 8 и каспазе 3 в необработанных CRC-клетках (U), CRC-клетках, обработанных смысловым (S) олигонуклеотидом для FMRP, CRC-клетках, обработанных антисмысловым (AS) олигонуклеотидом для FMRP, или CRC-клетках, обработанных стауропоорином (Stauro). Фиг. 4B представляет собой столбчатый график соответствующих данных проточной цитометрии из фиг. 4A ($***p < 0,001$). Фиг. 4C представляет собой столбчатый график, на котором показана относительная гибель клеток, как определено с помощью анализа с использованием проточной цитометрии для PI- и AnnV-окрашенных CRC-клеток. CRC-клетки не подвергали предварительной обработке или подвергали предварительной обработке ингибитором ряда каспаз (Cas in) до обработки смысловым (S) олигонуклеотидом для FMRP, антисмысловым (AS) олигонуклеотидом для FMRP или стауропоорином (Stauro). Фиг. 4D представляет собой точечные графики данных проточной цитометрии, на которых показаны результаты Brdu- и PI-окрашивания необработанных клеток DLD-1 (U) или клеток DLD-1, обработанных смы-

словым (S) олигонуклеотидом для FMRP или антисмысловым (AS) олигонуклеотидом для FMRP. Фиг. 4E представляет собой столбчатый график, на котором показаны соответствующие данные проточной цитометрии из точечного графика фиг. 4D. Фиг. 4F представляет собой столбчатый график, на котором показаны данные по пролиферации клеток HCT-116, оцениваемой с помощью анализа с включением BrdU (U = необработанные; S = смысловой; AS = антисмысловой) в течение 36 ч. Фиг. 4G представляет собой столбчатый график, на котором показаны данные по распределению по фазам клеточного цикла клеток HCT-116, обработанных смысловыми или антисмысловыми олигонуклеотидами для FMRP (U = необработанные; S = смысловой; AS = антисмысловой) в течение 36 ч.

На фиг. 5 показаны результаты иммунопреципитации РНК для лизатов CRC-клеток человека. Фиг. 5A представляет собой блотограмму, подтверждающую специфичность антитела к FMRP, применяемого для иммунопреципитации РНК для лизатов CRC-клеток человека. Фиг. 5B представляет собой столбчатый график, на котором показаны данные по обогащению подвергнутой копреципитации с FMRP мРНК, как определено с помощью RT-PCR-анализа с применением праймеров, специфических в отношении актина, Е-кадгерина, RIPK3 и RIPK1. Фиг. 5C представляет собой столбчатый график, на котором показаны данные по обогащению подвергнутой копреципитации с FMRP мРНК из лизатов линии клеток CRC, как определено с помощью RT-PCR-анализа с применением праймеров, специфических в отношении актина, виментина, RIPK3 и RIPK1.

Фиг. 6A представляет собой репрезентативную блотограмму, на которой показана экспрессия белка/фосфорилированного белка для FMRP, фосфо-RIPK1 (pRIPK1), RIPK1, фосфо-RIPK3 (pRIPK3), RIPK3, фосфо-MLKL (pMLKL), MLKL и β -актина (контроль нагрузки) в необработанной линии клеток толстой кишки человека (U) или линии клеток толстой кишки человека, обработанной смысловым (S) олигонуклеотидом для FMRP, или линии клеток толстой кишки человека, обработанной антисмысловым (AS) олигонуклеотидом для FMRP. Фиг. 6B, 6C и 6D представляют собой столбчатые графики, на которых показаны данные по уровням экспрессии pRIPK1, pRIPK3 и pMLKL соответственно, как определено с помощью денситометрии по результатам вестерн-блот-анализов, описанных на фиг. 6A (**p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001). Фиг. 6E и 6F представляют собой столбчатые графики, на которых показана относительная гибель клеток, как определено с помощью анализа с использованием проточной цитометрии для PI- и AnnV-окрашенных линий клеток CRC человека, обработанных RIPK1-специфическим ингибитором (NEC1) или MLKL-специфическим ингибитором (NSA) соответственно, и либо смысловым (S) олигонуклеотидом для FMRP, либо антисмысловым (AS) олигонуклеотидом для FMRP. Фиг. 6G представляет собой репрезентативную блотограмму, на которой показана экспрессия белка/фосфорилированного белка для FMRP, pRIPK1, RIPK1, pRIPK3, RIPK3, pMLKL, MLKL и β -актина (контроль нагрузки) в необработанных клетках HCEC-1ct, клетках HCEC-1ct, обработанных смысловым (S) олигонуклеотидом для FMRP, или клетках HCEC-1ct, обработанных антисмысловыми (AS) олигонуклеотидами для FMRP.

Фиг. 7A представляет собой линейный график, на котором показаны данные RT-PCR-анализа уровней экспрессии мРНК CREB в образцах окружающей опухоль ткани (P) и CRC-опухоли (T) (***p<0,001). Фиг. 7B представляет собой репрезентативную блотограмму, на которой показана экспрессия белка CREB, FMRP и β -актина (контроль нагрузки) в парных образцах окружающей опухоль ткани (P) и CRC-опухоли (T) от пациентов с CRC. Фиг. 7C представляет собой столбчатый график, на котором показаны данные по экспрессии белка CREB относительно экспрессии β -актина, как определено с помощью денситометрии по результатам вестерн-блот-анализов, описанных на фиг. 7B (**p<0,01). Фиг. 7D представляет собой репрезентативную блотограмму, на которой показана экспрессия белка CREB, FMRP и β -актина (контроль нагрузки) в необработанных линиях клеток CRC (U), линиях клеток CRC, обработанных смысловым (S) олигонуклеотидом для FMRP, или линиях клеток CRC, обработанных антисмысловыми (AS) олигонуклеотидами для FMRP. Фиг. 7E и 7F представляют собой столбчатые графики, на которых показаны данные по экспрессии белка CREB и FMRP соответственно относительно экспрессии β -актина, как определено с помощью денситометрии по результатам вестерн-блот-анализа, описанного на фиг. 7D (*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001).

Фиг. 8A представляет собой полученные с помощью микроскопии изображения, на которых показана миграция клеток в случае клеток HCT-116, обработанных смысловыми или антисмысловыми олигонуклеотидами для FMRP (U = необработанные; S = смысловой; AS = антисмысловой) и высеванных на каждой стороне вставки для культивирования клеток ibidi®, на момент удаления вставки для культивирования клеток (TO) и спустя 24 и 48 ч инкубации (T24 и T48 соответственно). Фиг. 8B представляет собой столбчатый график, на котором показана процентная доля покрытой клетками области, соответствующая данным из полученных с помощью микроскопии изображений фиг. 8A (T24: U в сравнении с AS, **p<0,01; S в сравнении с AS *p<0,05; T48: U в сравнении с AS и S в сравнении с AS, ***p<0,001). Фиг. 8C и 8D представляют собой полученные с помощью микроскопии изображения и соответствующий столбчатый график данных подсчета клеток соответственно для клеток HCT-116, обработанных смысловыми или антисмысловыми олигонуклеотидами для FMRP (U = необработанные; S = смысловой; AS = антисмысловой), которые мигрировали через покрытые Matrigel® вставки для культивирования

клеток Transwell®, спустя 48 ч инкубации ($***p<0,001$, $****p<0,0001$). Фиг. 8E представляет собой репрезентативную блотограмму, на которой показана экспрессия белка FMRP, E-кадгерина, β -катенина и β -актина (контроль нагрузки) в клетках HCT-116, обработанных смысловыми или антисмысловыми олигонуклеотидами для FMRP (U = необработанные; S = смысловой; AS = антисмысловой) в течение 48 ч. Фиг. 8F и 8G представляют собой столбчатые графики, на которых показаны данные по экспрессии белка E-кадгерина и β -катенина соответственно относительно экспрессии β -актина в клетках HCT-116, как определено с помощью денситометрии по результатам вестерн-блот-анализов, описанных на фиг. 8E ($**p<0,01$, $***p<0,001$).

Фиг. 9A представляет собой репрезентативную блотограмму, на которой показана экспрессия белка FMRP, MCC и β -актина (контроль нагрузки) в необработанных клетках HCT-116 (U) или клетках HCT-116, обработанных смысловым (S) олигонуклеотидом или антисмысловым (AS) олигонуклеотидом для FMRP в течение 48 ч. Фиг. 9B представляет собой столбчатый график, на котором показаны данные по экспрессии белка MCC относительно экспрессии β -актина в клетках HCT-116, как определено с помощью денситометрии по результатам вестерн-блот-анализа, описанного на фиг. 9A. Фиг. 9C представляет собой репрезентативную блотограмму, на которой показана экспрессия белка MCC, FMRP, E-кадгерина, β -катенина и β -актина (контроль нагрузки) в необработанных клетках HCT-116 (U) или клетках HCT-116, обработанных смысловым (S) олигонуклеотидом, антисмысловым (AS) олигонуклеотидом для FMRP и/или siRNA в качестве контроля (контрольная siRNA) или siRNA, специфической в отношении MCC (siRNA для MCC), в течение 48 ч. Фиг. 9D и 9E представляют собой столбчатые графики, на которых показаны данные по экспрессии белка E-кадгерина и β -катенина соответственно относительно экспрессии β -актина в клетках HCT-116, как определено с помощью денситометрии по результатам вестерн-блот-анализов, описанных на фиг. 9C ($*p<0,05$, $**p<0,01$). Фиг. 9F представляет собой полученные с помощью микроскопии изображения, на которых показана миграция клеток в случае клеток HCT-116, обработанных смысловыми или антисмысловыми олигонуклеотидами для FMRP (U = необработанные; S = смысловой; AS = антисмысловой), и/или контрольной siRNA или siRNA для MCC, и высеванных на каждой стороне вставки для культивирования клеток ibidi®, на момент удаления вставки для культивирования клеток (TO) и спустя 24 и 48 ч инкубации (T24 и T48 соответственно). Фиг. 9G представляет собой столбчатый график, на котором показана процентная доля покрытой клетками области, соответствующая данным из полученных с помощью микроскопии изображений фиг. 9F (T24: клетки HCT-116, трансфицированные антисмысловым олигонуклеотидом для FMRP и siRNA для MCC, в сравнении с клетками HCT-116, трансфицированными антисмысловым олигонуклеотидом для FMRP отдельно, $***p<0,001$; T48: клетки HCT-116, трансфицированные антисмысловым олигонуклеотидом для FMRP и siRNA для MCC, в сравнении с клетками HCT-116, трансфицированными антисмысловым олигонуклеотидом для FMRP отдельно, $****p<0,0001$).

Подробное раскрытие настоящего изобретения

Антисмысловые олигонуклеотиды для FMRP

"Антисмысловый олигонуклеотид" в контексте настоящего документа относится к короткой синтетической последовательности олигонуклеотида, комплементарной матричной РНК (мРНК), которая кодирует целевой белок (например, FMRP). Последовательности антисмысловых олигонуклеотидов гибридизуются с мРНК, образуя двунитевую молекулу, что может приводить к активации нуклеаз, которые распознают и расщепляют двунитевую молекулу, предотвращая таким образом трансляцию мРНК. Антисмысловые олигонуклеотиды могут включать одонитевые ДНК-олигонуклеотиды, короткие РНК, образующие шпильки (shRNA), малые интерферирующие РНК (siRNA) и модифицированные антисмысловые олигонуклеотиды, которые включают без ограничения нуклеиновую кислоту с 2'-О-алкильной модификацией, пептидо-нуклеиновую кислоту (PNA), запертую нуклеиновую кислоту (LNA) и морфолиновые олигомеры.

Согласно некоторым вариантам осуществления антисмысловый олигонуклеотид может представлять собой одонитевую молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую нуклеотидную последовательность, которая является комплементарной целевой мРНК (например, FMRP). Например, антисмысловый олигонуклеотид может представлять собой одонитевой ДНК-олигонуклеотид, имеющий последовательность, комплементарную мРНК FMRP. Гибридизация антисмыслового олигонуклеотида для FMRP с целевой мРНК приводит к образованию двунитевого гибрида ДНК/РНК, что приводит к активации повсеместно распространенных нуклеаз, таких как РНКазы H, которые распознают и расщепляют нити гибрида ДНК/РНК, предотвращая таким образом трансляцию целевого белка (например, FMRP).

В качестве альтернативы, антисмысловый олигонуклеотид может быть двунитевым. Двунитевой антисмысловый олигонуклеотид может состоять из одного олигонуклеотида, имеющего самокомплементарные смысловые и антисмысловые области. Согласно другим вариантам осуществления двунитевой антисмысловый олигонуклеотид может состоять из двух отдельных олигонуклеотидов, причем один олигонуклеотид представляет собой смысловую нить, а другой олигонуклеотид представляет собой антисмысловую нить, и причем антисмысловая нить имеет нуклеотидную последовательность, которая является комплементарной целевой мРНК (например, FMRP).

Антисмысловые олигонуклеотиды могут быть сконструированы так, чтобы нацеленная часть включенной нуклеотидной последовательности каждого антисмыслового олигонуклеотида была полностью или почти полностью комплементарна последовательности мРНК FMRP. Включение таких комплементарных или почти комплементарных нуклеотидных последовательностей позволяет конструировать антисмысловые олигонуклеотиды с высокой степенью специфичности в отношении данной мишени. Специфичность можно оценивать посредством измерения таких параметров, как константа диссоциации, или по другим критериям, таким как изменения уровней экспрессии белка или РНК, или с применением других анализов, с помощью которых измеряют активность или уровень экспрессии FMRP.

Настоящее раскрытие относится к способам, которые включают введение пациенту антисмыслового олигонуклеотида для FMRP, способного к нацеливанию на мРНК FMRP для расщепления, нарушению сплайсинга мРНК или предотвращению экспрессии гена или трансляции белка FMRP. Антисмысловые олигонуклеотиды для FMRP по настоящему раскрытию могут нацеливаться на разные области мРНК FMRP человека для связывания. мРНК FMRP человека имеет последовательность эталонной последовательности в NCBI под номером: NM_001185075 (SEQ ID NO: 18), NM_001185076 (SEQ ID NO: 19), NM_001185081 (SEQ ID NO: 20), NM_001185082 (SEQ ID NO: 21) или NM_002024 (SEQ ID NO: 22).

Антисмысловый олигонуклеотид для FMRP, такой как раскрытый в настоящем документе, может представлять собой последовательность олигонуклеотида длиной от 5 до 100 нуклеотидов, например, длиной от 10 до 40 нуклеотидов, например, длиной от 14 до 40 нуклеотидов, например, длиной от 10 до 30 нуклеотидов, например, длиной от 14 до 30 нуклеотидов, например, длиной от 14 до 25 нуклеотидов, например, длиной от 15 до 22 олигонуклеотидов, например, длиной от 18 до 40 нуклеотидов, например, длиной от 18 до 24 нуклеотидов, например, длиной от 20 до 40 нуклеотидов или, например, длиной от 20 до 24 нуклеотидов. Согласно некоторым вариантам осуществления длина антисмыслового олигонуклеотида для FMRP может составлять, например, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 или 40 нуклеотидов. Антисмысловый олигонуклеотид для FMRP может содержать последовательность олигонуклеотида, комплементарную одной или более чем одной части последовательности мРНК FMRP.

Согласно некоторым вариантам осуществления антисмысловые олигонуклеотиды для FMRP по настоящему раскрытию могут представлять собой без ограничения короткие РНК, образующие шпильки (shRNA), малые интерферирующие РНК (siRNA), морфолиновые олигомеры, микроРНК и композиции, которые включают такие соединения, например, композиции, которые включают фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

Согласно некоторым вариантам осуществления настоящего раскрытия антисмысловый олигонуклеотид, нацеленный на FMRP, содержит последовательность или часть последовательности (например, содержит последовательность, характеризующуюся 90, 95 или 99% идентичностью по длине), выбранную из любого из следующего:

5'-CCACCACCAGCTCCTCCA-3' (SEQ ID NO: 1),

5'-CTTCCACCACCAGCTCCT-3' (SEQ ID NO: 2),

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

5'-CTTCCACCACCAGCTCC-3' (SEQ ID NO: 4) и

5'-TCACCCTTTATCATCCTC-3' (SEQ ID NO: 5)

или их комплементарная нить.

Согласно дополнительным вариантам осуществления антисмысловой олигонуклеотид, нацеленный на FMRP, содержит последовательность или часть последовательности (например, содержит последовательность, характеризующуюся 90, 95 или 99% идентичностью по длине), выбранную из любого из следующего:

5'-TCCACCACCAGCTCCTCCAT-3' (SEQ ID NO: 6),

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

5'-TTCCACCACCAGCTCCTCCA-3' (SEQ ID NO: 8),

5'-ACTTCCACCACCAGCTCCT-3' (SEQ ID NO: 9) и

5'-CTCACCCTTTATCATCCTCA-3' (SEQ ID NO: 10)

или их комплементарная нить.

Согласно некоторым вариантам осуществления антисмысловой олигонуклеотид для FMRP по настоящему раскрытию содержит один или несколько рибонуклеотидов, дезоксирибонуклеотидов или смесь рибонуклеотидов и дезоксирибонуклеотидов.

Согласно некоторым вариантам осуществления антисмысловой олигонуклеотид для FMRP по настоящему раскрытию содержит один или несколько модифицированных нуклеозидов, выбранных из группы, состоящей из 5-метилцитидина, 5-метил-2'-дезоксцитидина, дезоксцитидина, 5-метил-2'-дезоксцитидин-5'-монофосфата и 3-метил-2'-дезоксцитидин-6'-монофосфотиоата.

Согласно определенным вариантам осуществления антисмысловой олигонуклеотид для FMRP по настоящему раскрытию содержит один или несколько модифицированных нуклеозидов, выбранных из группы, состоящей из 2'-О-метилцитидина, 2'-О-метилгуанозина, 2'-О-метилтимидина, 2'-О-метилуридина и 2'-О-метиладенозина.

Согласно некоторым вариантам осуществления антисмысловой олигонуклеотид для FMRP по настоящему раскрытию содержит один или несколько модифицированных нуклеотидов, выбранных из группы, состоящей из 5-метилцитозина и 5-метилгуанина.

Согласно некоторым вариантам осуществления антисмысловой олигонуклеотид для FMRP по настоящему раскрытию содержит один или несколько модифицированных нуклеозидов, выбранных из 2'-О-(2-метоксиэтил)нуклеозидов, 2'-дезоксид-2'-фтор-нуклеозидов и 2'-фтор-β-D-арабинонуклеозидов.

Согласно определенным вариантам осуществления антисмысловой олигонуклеотид для FMRP по настоящему раскрытию предусматривает одно или несколько из группы, выбранной из мостиковых нуклеиновых кислот, запертых нуклеиновых кислот (LNA), нуклеиновых кислот с конформационно ограниченными этиловыми аналогами нуклеозидов (сЕТ), трицикло-ДНК (tcDNA), нуклеиновых кислот с 2'-О,4'-С-этиленовым мостиком (ЕНА) и пептидо-нуклеиновых кислот (PNA).

Согласно некоторым вариантам осуществления по меньшей мере одна межнуклеозидная связь раскрытого антисмыслового олигонуклеотида для FMRP может иметь модифицированную связь, как, например, фосфоротиоатную связь, фосфородитиоатную связь, фосфотриэфирную связь, алкилфосфонатную связь, аминоклфосфотриэфирную связь, алкиленфосфонатную связь, фосфинатную связь, фосфорамидатную связь, фосфоморфолидатную связь, фосфопиперазидатную связь и аминоклфосфорамидатную связь, тиофосфорамидатную связь, тиоалкилфосфонатную связь, тиоалкилфосфотриэфирную связь, тиофосфатную связь, селенофосфатную связь и/или боранофосфатную связь. Например, согласно некоторым вариантам осуществления одна, две или более, например, все межнуклеозидные связи раскрытого антисмыслового олигонуклеотида для FMRP могут представлять собой фосфоротиоатные связи. Согласно другим вариантам осуществления одна, две или более, например, все межнуклеозидные связи раскрытого антисмыслового олигонуклеотида для FMRP могут представлять собой метилфосфонатные связи.

Например, согласно одному варианту осуществления антисмысловой олигонуклеотид для FMRP представляет собой фосфоротиоатный антисмысловой олигонуклеотид против FMRP, содержащий последовательность 5'-CCACCACCAGCTCCTCCA-3' (SEQ ID NO: 1), где каждая межнуклеотидная связь антисмыслового олигонуклеотида представляет собой фосфоротиоатную связь. Согласно некоторым вариантам осуществления антисмысловой олигонуклеотид против FMRP представляет собой фосфоротиоатный антисмысловой олигонуклеотид, содержащий последовательность 5'-CCACCACCAGCTCCTCCA-3' (SEQ ID NO: 1), где одна или более чем одна межнуклеозидная связь антисмыслового олигонуклеотида представляет собой фосфоротиоатную связь.

Согласно другому варианту осуществления антисмысловой олигонуклеотид для FMRP представляет собой фосфоротиоатный антисмысловой олигонуклеотид против FMRP, содержащий последовательность 5'-CCACCACCAGCTCCTCCA-3' (SEQ ID NO: 2), где каждая межнуклеотидная связь антисмыслового олигонуклеотида представляет собой фосфоротиоатную связь. Согласно некоторым вариантам осуществления антисмысловой олигонуклеотид против FMRP представляет собой фосфоротиоатный антисмысловой олигонуклеотид, содержащий последовательность 5'-CTCCACCACCAGCTCCTC-3' (SEQ ID NO: 2), где одна или более чем одна межнуклеозидная связь антисмыслового олигонуклеотида представляет собой фосфоротиоатную связь.

Согласно другому варианту осуществления антисмысловой олигонуклеотид для FMRP представляет собой фосфоротиоатный антисмысловой олигонуклеотид против FMRP, содержащий последовательность 5'-TCCACCACCAGCTCCTCC-3' (SEQ ID NO: 3), где каждая межнуклеотидная связь антисмыслового олигонуклеотида представляет собой фосфоротиоатную связь. Согласно некоторым вариантам осуществления антисмысловой олигонуклеотид против FMRP представляет собой фосфоротиоатный антисмысловой олигонуклеотид, содержащий последовательность 5'-TCCACCACCAGCTCCTCC-3' (SEQ ID NO: 3), где одна или более чем одна межнуклеозидная связь антисмыслового олигонуклеотида представляет собой фосфоротиоатную связь.

Согласно другому варианту осуществления антисмысловой олигонуклеотид для FMRP представляет собой фосфоротиоатный антисмысловой олигонуклеотид против FMRP, содержащий последовательность 5'-CTCCACCACCAGCTCC-3' (SEQ ID NO: 4), где каждая межнуклеотидная связь антисмыслового олигонуклеотида представляет собой фосфоротиоатную связь. Согласно некоторым вариантам осуществления антисмысловой олигонуклеотид против FMRP представляет собой фосфоротиоатный антисмысловой олигонуклеотид, содержащий последовательность 5'-CTCCACCACCAGCTCC-3' (SEQ ID NO: 4), где одна или более чем одна межнуклеозидная связь антисмыслового олигонуклеотида представляет собой фосфоротиоатную связь.

Согласно другому варианту осуществления антисмысловой олигонуклеотид для FMRP представляет собой фосфоротиоатный антисмысловой олигонуклеотид против FMRP, содержащий последователь-

5'-CCACCACCAGCTCCTCCA-3' (SEQ ID NO: 1),
 5'-CTTCCACCACCAGCTCCT-3' (SEQ ID NO: 2),
 5'-TCCACCACCAGCTCCTCC-3' (SEQ ID NO: 3),
 5'-CTTCCACCACCAGCTCC-3' (SEQ ID NO: 4),
 5'-TCACCCCTTTATCATCCTC-3' (SEQ ID NO: 5),
 5'-TCCACCACCAGCTCCTCCAT-3' (SEQ ID NO: 6),
 5'-ACTTCCACCACCAGCTCCTC-3' (SEQ ID NO: 7),
 5'-TTCCACCACCAGCTCCTCCA-3' (SEQ ID NO: 8),
 5'-ACTTCCACCACCAGCTCCT-3' (SEQ ID NO: 9) и
 5'-CTCACCCCTTTATCATCCTCA-3' (SEQ ID NO: 10),

или может предусматриваться фармацевтически приемлемая соль siRNA для FMRP, содержащая последовательность любой из SEQ ID NO: 1-10.

Согласно некоторым вариантам осуществления siRNA для FMRP содержит по меньшей мере одну межнуклеозидную связь, выбранную из группы, состоящей из фосфоротиоатной связи, фосфородитиоатной связи, фосфотриэфирной связи, алкилфосфонатной связи, аминоалкилфосфотриэфирной связи, алкиленфосфонатной связи, фосфинатной связи, фосфорамидатной связи, фосфоморфолидатной связи, фосфопиперазидатной связи, аминоалкилфосфорамидатной связи, тиофосфорамидатной связи, тиоалкилфосфонатной связи, тиоалкилфосфотриэфирной связи, тиофосфатной связи, селенофосфатной связи и боранофосфатной связи. Согласно определенным вариантам осуществления по меньшей мере одна межнуклеозидная связь siRNA для FMRP представляет собой фосфоротиоатную связь. Например, согласно некоторым вариантам осуществления 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 1-5, 1-10, 1-14, 1-15, 1-16, 1-19, 5-10, 5-14, 5-15, 5-19, 10-14, 10-15 или 10-19 межнуклеозидных связей siRNA для FMRP представляют собой фосфоротиоатные связи. Согласно некоторым вариантам осуществления все из межнуклеозидных связей siRNA для FMRP представляют собой фосфоротиоатные связи.

Согласно различным вариантам осуществления раскрытый антисмысловый олигонуклеотид для FMRP (например, siRNA для FMRP) может необязательно иметь по меньшей мере одно модифицированное азотистое основание, например, 5-метилцитозин и/или по меньшей мере один метилфосфонатный нуклеотид в последовательности, который находится, например, либо только на одном из 5'- или 3'-концов, либо как на 5'-, и так и на 3'-концах, или вдоль последовательности олигонуклеотида.

Антисмысловые олигонуклеотиды для FMRP (например, siRNA для FMRP) могут необязательно включать по меньшей мере один модифицированный сахар. Например, сахарный фрагмент по меньшей мере одного нуклеотида, составляющего олигонуклеотид, может представлять собой рибозу, в которой группа 2-ОН может быть замещена любым, выбранным из группы, состоящей из OR, R, R'OR, SH, SR, NH₂, NR₂, N₃, CN, F, Cl, Br и I (причем R представляет собой алкил или арил и R' представляет собой алкилен).

Согласно некоторым вариантам осуществления определенные раскрытые нуклеотиды могут быть модифицированы или иметь вариации, например, определенные цитидины в раскрытом антисмысловом олигонуклеотиде для FMRP (например, siRNA для FMRP) могут представлять собой, например, 5-метил-2'-дезоксцитидин, включая без ограничения 5-метил-2'-дезоксцитидин-5'-монофосфат и 5-метил-2'-дезоксцитидин-5'-монофосфотиоат.

Согласно определенным вариантам осуществления антисмысловые олигонуклеотиды для FMRP (например, siRNA для FMRP) могут включать химически модифицированные нуклеозиды, например, 2'-О-метильные (2'-OMe) рибонуклеозиды, например, 2'-О-метилцитидин, 2'-О-метилгуанозин, 2'-О-метилтимидин, 2'-О-метилуридин и/или 2'-О-метиладенозин. Описанные в настоящем документе антисмысловые олигонуклеотиды для FMRP (например, siRNA для FMRP) могут также включать одно или несколько химически модифицированных оснований, включая 5-метилпиримидин, например, 5-метилцитозин и/или 5-метилпуридин, например, 5-метилгуанин. Согласно некоторым вариантам осуществления антисмысловые олигонуклеотиды для FMRP (например, siRNA для FMRP) могут включать один или несколько 2'-О-(2-метоксиэтил) (2'-MOE)-нуклеозидов, 2'-дезоксид-2'-фторнуклеозидов, 2'-фтор-β-D-арабинонуклеозидов, мостиковых нуклеиновых кислот, запертых нуклеиновых кислот (LNA), нуклеиновых кислот с конформационно ограниченными этиловыми аналогами нуклеозидов (сЕТ), трицикло-ДНК (tcDNA), нуклеиновых кислот с 2'-О,4'-С-этиленовым мостиком (ENA) и/или пептидо-нуклеиновых кислот (PNA).

Согласно некоторым вариантам осуществления по меньшей мере одна из межнуклеотидных связей предусмотренного антисмыслового олигонуклеотида (например, siRNA для FMRP) представляет собой О,О-фосфоротиоатную связь. Например, каждая из межнуклеотидных связей SEQ ID NO: 1-10 может представлять собой О,О-фосфоротиоатную связь. Согласно некоторым вариантам осуществления раскрытые в настоящем документе композиции могут включать фармацевтически приемлемую соль (например, натриевую соль антисмыслового олигонуклеотида с раскрытой последовательностью, который

необязательно может включать от 1 до 24 или более О,О-фосфоротиоатных межнуклеотидных связей. Предусмотренные соли олигонуклеотидов включают таковые, которые являются полностью нейтрализованными, например, каждая фосфоротиоатная связь ассоциирована с ионом, таким как Na^+ . Олигонуклеотиды могут включать встречающиеся в природе азотистые основания, сахара и ковалентные межнуклеозидные (внутри остова) связи, а также не встречающиеся в природе части.

Также в настоящем документе представлены изотопологи раскрытых антисмысловых олигонуклеотидов, содержащие их фармацевтические композиции и способы их применения. Например, согласно некоторым вариантам осуществления в настоящем документе представлены дейтерированные антисмысловые олигонуклеотиды SEQ ID NO: 1-10, включая множество атомов водорода (H), причем один или несколько атомов водорода из множества атомов водорода замещены дейтерием (D).

Заболевания кишечника

Настоящее раскрытие относится к олигонуклеотидам для лечения и/или предупреждения заболеваний кишечника. В контексте настоящего документа "заболевание кишечника" относится к любому заболеванию, нарушению и/или синдрому, поражающему часть пищеварительного тракта после желудка, т.е. тонкий кишечник, толстый кишечник, толстую кишку и прямую кишку. Например, заболевания кишечника могут включать без ограничения рак толстой кишки, воспалительное заболевание кишечника, семейный аденоматозный полипоз, синдром Гарднера, синдром Турко, синдром Линча, целиакию, карциноидные опухоли желудочно-кишечного тракта, рак тонкого кишечника, рак двенадцатиперстной кишки, рак тонкой кишки и стромальные опухоли желудочно-кишечного тракта. Например, в настоящем документе представлены способы лечения пациента, страдающего от заболевания кишечника, предусматривающие введение пациенту эффективного количества раскрытого антисмыслового олигонуклеотида.

Рак толстой и прямой кишки

"Рак толстой и прямой кишки" в контексте настоящего документа относится к любому раку, поражающему толстую кишку и/или прямую кишку. Формы рака толстой и прямой кишки могут быть вызваны любым одним или более чем одним фактором окружающей среды и генетическим фактором, который вызывает прогрессирующее накопление генетических и/или эпигенетических изменений, которые обуславливают подавление генов-онкосупрессоров и активацию онкогенов в эпителиальных клетках толстой или прямой кишки. Новообразования толстой и прямой кишки зачастую ассоциированы с утратой геномной и/или эпигеномной стабильности, которая ускоряет злокачественное перерождение.

Имеет место значительная гетерогенность в специфических мутациях гена, присутствующих при раке толстой и прямой кишки, и включает без ограничения изменения в APC, CTNNB1, KRAS, BRAF, SMAD4, TGFBR2, TP53, PIK3CA, ARID1A, SOX9, FAM123B и ERBB2. Рак толстой и прямой кишки зачастую инициируется мутациями, которые приводят к нарушению регуляции сигнального пути Wnt, и опухоли прогрессируют при дальнейшем нарушении регуляции других сигнальных путей, включая пути RAS-RAF-MAPK, TGFP и PI3K-AKT. Раскрытые последовательности могут осуществлять посттранскрипционную регуляцию экспрессии онкогенов, онкосупрессоров и ключевых сигнальных белковых участников путей Wnt, RAS-RAF-MAPK, TGFP и PI3K-AKT. В настоящем документе представлены способы лечения пациентов, страдающих от рака толстой и прямой кишки, предусматривающие введение пациентам раскрытого антисмыслового олигонуклеотида.

Воспалительное заболевание кишечника

"Воспалительное заболевание кишечника" в контексте настоящего документа относится к ряду хронических воспалительных заболеваний, включая болезнь Крона, язвенный колит, гастроудоденальную форму болезни Крона, колит (гранулематозный) Крона, коллагенозный колит, лимфоцитарный колит, ишемический колит, диверсионный колит, болезнь Бехчета, микроскопический колит, язвенный проктит, проктосигмоидит, еюноилеит, левосторонний колит, панколит, энтероколит, илеит и неуточненный колит. Болезнь Крона и язвенный колит являются двумя наиболее распространенными формами воспалительного заболевания кишечника. Воспалительное заболевание кишечника представляет собой аутоиммунное заболевание пищеварительной системы. Болезнь Крона может быть локализована в любой части желудочно-кишечного тракта, включая терминальный отдел подвздошной кишки, и может поражать все типы клеток желудочно-кишечного тракта. Язвенный колит локализуется в толстой и прямой кишке и поражает только клетки слизистой оболочки. В настоящем документе представлены способы лечения пациентов, страдающих от воспалительного заболевания кишечника, предусматривающие введение пациенту раскрытого антисмыслового олигонуклеотида.

Воспалительное заболевание кишечника ассоциировано с симптомами, включающими боль в животе, рвоту, диарею, ректальное кровотечение, сильные судороги, мышечные спазмы, потерю массы, недоедание, лихорадку, анемию, кожные поражения, боль в суставах, воспаление глаза, нарушения со стороны печени, артрит, гангренозную приодермию, первичный склерозирующий холангит и синдром псевдодисфункции щитовидной железы, и также согласно одному варианту осуществления предусматривается лечение этих симптомов с применением раскрытого антисмыслового соединения, например, лечение ребенка, страдающего от язвенного колита, который также может страдать от нарушений роста. Согласно некоторым вариантам осуществления в настоящем документе предусмотрены способы, например, устранения или лечения таких симптомов путем введения пациенту эффективного количества раскрыто-

го антисмыслового олигонуклеотида.

"Некроптоз" в контексте настоящего документа относится к регулируемой независимой от каспаз гибели клеток, которая может быть альтернативным способом уничтожения устойчивых к апоптозу раковых клеток. Основной путь некроптоза включает комплекс взаимодействующая с рецептором протеинкиназа 1 (RIP1 или RIPK1)-взаимодействующая с рецептором протеинкиназа 3 (RIP3 или RIPK3)-белок, подобный домену киназ смешанного происхождения (MLKL), также называемый "некрсомой". Некросома инициирует последующие эффекторные функции, такие как выброс активных форм кислорода (ROS), пермеабиллизация плазматической мембраны и снижение цитозольного АТФ, что дополнительно приводит в действие механизмы, вызывающие необратимый некроптоз. В настоящем документе представлены способы лечения пациентов путем модулирования некроптоза, предусматривающие введение пациенту раскрытого антисмыслового олигонуклеотида.

"Нуждающийся в лечении пациент" в контексте настоящего документа относится к пациенту, страдающему от любого из симптомов или проявлений заболевания кишечника, пациенту, который может страдать от любого из симптомов или проявлений заболевания кишечника, или любому пациенту, который может получить пользу от способа лечения заболевания кишечника по настоящему раскрытию. Нуждающийся в лечении пациент может включать пациента, у которого диагностирован риск развития заболевания кишечника, пациента, который страдал от заболевания кишечника в прошлом, или пациента, который ранее проходил лечение заболевания кишечника. Особенно подходят индивидуумы, которые страдают от заболевания кишечника, ассоциированного с повышенными уровнями экспрессии или активности FMRP.

Термины "лечить", "лечение", "лечащий" и т.п. используются в настоящем документе для общего обозначения получения требуемого фармакологического и/или физиологического эффекта. Эффект может быть профилактическим в контексте полного или частичного предупреждения заболевания или его симптома и/или может быть терапевтическим в контексте частичного или полного излечения заболевания и/или нежелательного эффекта, приписываемого заболеванию. Термин "лечение" в контексте настоящего документа охватывает любое лечение заболевания у млекопитающего, в частности, у человека, и включает: (a) предупреждение возникновения заболевания у субъекта, у которого может быть предрасположенность к развитию заболевания, но оно еще не было диагностировано; (b) ингибирование заболевания, т.е. предупреждение увеличения тяжести или обширности заболевания; (c) ослабление тяжести заболевания, т.е. частичное или полное устранение заболевания или (d) предупреждение рецидива заболевания, т.е. предупреждение возврата заболевания в активное состояние после предыдущего успешного лечения симптомов заболевания или лечения заболевания.

"Эффективное количество" в контексте настоящего документа относится к количеству средства, которое является достаточным по меньшей мере для частичного лечения или устранения симптомов состояния при введении пациенту. Эффективное количество будет варьироваться в зависимости от тяжести состояния, пути введения компонента и возраста, массы и т.д. пациента, которого лечат. Соответственно, эффективное количество раскрытого антисмыслового олигонуклеотида для FMRP представляет собой количество антисмыслового олигонуклеотида для FMRP, необходимое для лечения заболевания кишечника у пациента, так что введение средства пациенту обеспечивает предупреждение возникновения заболевания кишечника у субъекта, предупреждение прогрессирования заболевания кишечника (например, предупреждение начала или увеличения тяжести таких симптомов заболевания кишечника, как ректальное кровотечение, анемия или желудочно-кишечное воспаление) или обеспечивает облегчение или полное устранение всех ассоциированных симптомов заболевания кишечника, т.е. обеспечивает регрессию заболевания.

Согласно некоторым вариантам осуществления раскрытые способы включают введение пациенту по меньшей мере 1 мкг, по меньшей мере 5 мкг, по меньшей мере 10 мкг, по меньшей мере 20 мкг, по меньшей мере 30 мкг, по меньшей мере 40 мкг, по меньшей мере 50 мкг, по меньшей мере 60 мкг, по меньшей мере 70 мкг, по меньшей мере 80 мкг, по меньшей мере 90 мкг или по меньшей мере 100 мкг антисмыслового олигонуклеотида. Согласно некоторым вариантам осуществления способы по настоящему раскрытию включают введение пациенту от 35 до 500 мг, от 1 до 10 мг, от 10 до 20 мг, от 20 до 30 мг, от 30 до 40 мг, от 40 до 50 мг, от 50 до 60 мг, от 60 до 70 мг, от 70 до 80 мг, от 80 до 90 мг, от 90 до 100 мг, от 100 до 150 мг, от 150 до 200 мг, от 200 до 250 мг, от 250 до 300 мг, от 300 до 350 мг, от 350 до 400 мг, от 400 до 450 мг, от 450 до 500 мг, от 500 до 600 мг, от 600 до 700 мг, от 700 до 800 мг, от 800 до 900 мг, от 900 до 1 г, от 1 до 50 мг, от 20 до 40 мг или от 1 до 500 мг антисмыслового олигонуклеотида.

Эффективность лечения можно определять с помощью оценки явных симптомов, ассоциированных с заболеванием кишечника, гистологического анализа ткани, биохимического анализа, способов визуализации, таких как, например, магнитно-резонансная томография, или других известных способов. К примеру, эффективность лечения можно оценивать с помощью анализа явных симптомов заболевания, как, например, по изменениям в отношении боли в животе, рвоты, диареи, ректального кровотечения, судорог, мышечных спазмов, потери массы, недоедания, лихорадки, анемии или других аспектов макропатологии, ассоциированных с заболеванием кишечника, после введения раскрытого антисмыслового олигонуклеотида для FMRP пациенту, страдающему от заболевания кишечника.

Эффективность лечения также можно оценивать на тканевом или клеточном уровне, например, путем получения биоптатов ткани (например, биоптата опухоли или ткани желудочно-кишечного тракта) и оценки макроскопической морфологии тканей или клеток или характеристик окрашивания. Биохимические анализы, которые позволяют изучать экспрессию белка или РНК, также можно применять для оценки эффективности лечения. К примеру, можно оценивать FMRP, каспазы (например, каспазу 3 или каспазу 8), RIPK1, фосфо-RIPK1, RIPK3, фосфо-RIPK3, MLKL, фосфо-MLKL, CREB, IL-6, IL-8, TNF-альфа или уровни другого белка или продукта гена, свидетельствующие о наличии рака толстой и прямой кишки, некроптоза, воспалительного заболевания кишечника или выработке воспалительных цитокинов, посредством иммуноцитохимических, иммуногистохимических методов, вестерн-блоттинга или нозерн-блоттинга, или способов, пригодных для оценки уровней РНК, таких как количественная или полуколичественная полимеразная цепная реакция. Также можно оценивать наличие или уровень экспрессии пригодных биомаркеров, обнаруживаемых в кале, плазме крови или сыворотке крови, для оценки состояния заболевания и эффективности лечения.

При оценке эффективности лечения могут быть выбраны подходящие контроли для обеспечения достоверной оценки. К примеру, можно сравнивать симптомы, оцениваемые у пациента с заболеванием кишечника после введения пациенту раскрытого антисмыслового олигонуклеотида для FMRP, с такими симптомами у этого же пациента до лечения или на более раннем этапе курса лечения или у другого пациента, у которого не было диагностировано заболевание кишечника. В качестве альтернативы, можно сравнивать результаты биохимического или гистологического анализа ткани кишечника после введения пациенту раскрытого антисмыслового олигонуклеотида для FMRP с таковыми в случае ткани кишечника от того же пациента или от индивидуума, у которого не было диагностировано заболевание кишечника, или от того же пациента до введения пациенту антисмыслового олигонуклеотида для FMRP. Кроме того, можно сравнивать образцы крови, сыворотки крови, клеток или кала после введения пациенту антисмыслового олигонуклеотида для FMRP с сопоставимыми образцами от индивидуума, у которого не было диагностировано заболевание кишечника, или от того же пациента до введения пациенту антисмыслового олигонуклеотида для FMRP.

Достоверность ингибирования FMRP можно определять путем прямой или опосредованной оценки уровней экспрессии или активности FMRP. К примеру, биохимические анализы, в которых измеряют экспрессию белка или РНК FMRP, можно применять для оценки общего ингибирования FMRP. К примеру, можно измерять уровни белка FMRP в ткани кишечника с помощью вестерн-блота для оценки общих уровней FMRP. Также можно измерять уровни мРНК FMRP с помощью нозерн-блота или количественной полимеразной цепной реакции для определения общего ингибирования FMRP. Также можно оценивать уровни белка FMRP или уровни другого белка, свидетельствующего об активности/экспрессии FMRP, в диссоциированных клетках, недиссоциированной ткани или кале посредством иммуноцитохимических или иммуногистохимических методов.

Ингибирование FMRP также можно оценивать опосредованно путем измерения таких параметров, как повышенный уровень экспрессии RTPK1 и/или активация комплекса RIPK1-RIPK3-MLKL, которые ассоциированы с некроптозом. Например, можно измерять уровни фосфо-RIPK1, фосфо-RIPK3 или фосфо-MLKL в ткани кишечника с помощью вестерн-блота.

Также можно опосредованно оценивать отрицательную регуляцию FMRP путем измерения таких параметров, как экспрессия CREB. К примеру, биохимические анализы, в которых измеряют экспрессию белка или РНК CREB, можно применять для оценки общего ингибирования FMRP. К примеру, можно измерять уровни белка CREB в ткани кишечника с помощью вестерн-блота. Также можно измерять уровни мРНК CREB с помощью нозерн-блота или количественной полимеразной цепной реакции для определения общего ингибирования FMRP. Также можно оценивать уровни белка CREB или уровни другого белка, свидетельствующего об активности/экспрессии CREB, в диссоциированных клетках, недиссоциированной ткани или кале посредством иммуноцитохимических или иммуногистохимических методов.

Настоящее раскрытие относится к способам лечения рака толстой кишки. Предусматривается, что лечение рака толстой кишки обеспечивает одно или более чем одно из следующего: например, полное устранение заболевания; уменьшение числа и/или степени опухолей; снижение метастазирования; уменьшение числа случаев повторного появления; и уменьшение числа случаев или тяжести симптомов (например, диареи, запора, кровавого стула, ректального кровотечения, боли в животе, слабости, утомляемости и потери массы).

Настоящее раскрытие также относится к способам лечения IBD (например, болезни Крона и язвенного колита). Предусматривается, что лечение IBD обеспечивает одно или более чем одно из следующего: например, полное устранение заболевания; снижение воспаления, включая снижение выработки воспалительных цитокинов и интестинальной инфильтрации иммунных клеток; восстановление архитектуры кишечника/слизистой оболочки; уменьшение числа случаев повторного появления; и уменьшение числа случаев или тяжести симптомов (например, диареи, запора, кровавого стула, кровотечения, боли в животе, слабости, утомляемости и потери массы). "Выработка воспалительных цитокинов" относится к экспрессии цитокинов, которые иницируют и/или стимулируют опосредованный цитокинами

воспалительный ответ. "Опосредованный цитокинами воспалительный ответ" относится к иммунной реакции, которая может характеризоваться привлечением гранулоцитов, привлечением лимфоцитов, системным воспалением (особенно желудочно-кишечного тракта или его части или частей), лихорадкой, разрушением ткани, шоком и/или смертельным исходом. Опосредованный цитокинами воспалительный ответ может характеризоваться связыванием отдельных цитокинов с их когнатным рецептором клеточной поверхности и последующими каскадами внутриклеточной передачи сигнала, которые приводят к изменению функций клеток и экспрессии генов. Воспалительные цитокины включают без ограничения IL-1, IL-6, IL-8 и TNF α . Экспрессия воспалительных цитокинов может иметь место, например, в макрофагах, моноцитах, мононуклеарных клетках собственной пластинки слизистой оболочки или других клетках желудочно-кишечного тракта или клетках иммунной системы. Способы ингибирования выработки воспалительных цитокинов включают способы, которые обеспечивают снижение уровней экспрессии некоторых или всех воспалительных цитокинов у пациента, страдающего от воспалительного заболевания кишечника. Способы ингибирования выработки воспалительных цитокинов также включают способы, которые обеспечивают снижение уровней экспрессии некоторых или всех воспалительных цитокинов в клетках пациента, страдающего от воспалительного заболевания.

Настоящее раскрытие также относится к способам ингибирования FMRP в клетках пациента, страдающего от заболевания кишечника. FMRP можно ингибировать в любой клетке, в которой имеет место экспрессия или активность FMRP, включая клетки желудочно-кишечного тракта, иммунной системы и крови. Клетки желудочно-кишечного тракта (включая клетки желудка, двенадцатиперстной кишки, тощей кишки, подвздошной кишки, толстой кишки, прямой кишки и анального канала) включают столбчатые эпителиальные клетки, эпителиальные клетки слизистой оболочки, зимогенные клетки, слизистые шеечные клетки, париетальные клетки, G-клетки, бокаловидные клетки, клетки Панета, олигомукозные клетки и абсорбирующие клетки ворсинок. Клетки иммунной системы включают лейкоциты, фагоциты (например, макрофаги, нейтрофилы и дендритные клетки), моноциты, тучные клетки, эозинофилы, базофилы, естественные клетки-киллеры, клетки врожденного иммунитета, лимфоциты, B-клетки и T-клетки. Клетки крови включают красные кровяные тельца (эритроциты) и белые кровяные тельца (лейкоциты, моноциты и тромбоциты).

Опухолевая инвазия и метастазирование опухоли

Опухолевая инвазия относится к пролиферации раковых клеток и увеличению размера опухоли, что приводит к расширению локализации, прохождению, проникновению и распространению раковых клеток в окружающие ткани. Метастазирование опухоли происходит, когда раковые клетки отрываются от первичного места локализации опухоли, перемещаются с током крови или лимфы и образуют новый очаг опухоли в других органах и тканях организма.

Согласно некоторым вариантам осуществления эффективное количество антисмыслового олигонуклеотида для FMRP по настоящему раскрытию можно вводить нуждающемуся в этом пациенту для лечения солидной опухоли, опухолевой инвазии или метастазирования опухоли. Согласно некоторым вариантам осуществления эффективное количество антисмыслового олигонуклеотида для FMRP по настоящему раскрытию можно применять для предупреждения или устранения опухолевой инвазии или метастазирования опухоли. Согласно определенным вариантам осуществления эффективное количество антисмыслового олигонуклеотида для FMRP по настоящему раскрытию можно применять для предупреждения или устранения опухолевой инвазии при раке толстой и прямой кишки или метастазирования опухоли при раке толстой и прямой кишки.

Фармацевтические композиции и пути введения

Настоящее раскрытие также относится к способам лечения заболевания кишечника посредством введения пациенту фармацевтической композиции, содержащей раскрытый антисмысловый олигонуклеотид для FMRP. Согласно другому аспекту настоящее раскрытие относится к фармацевтической композиции для применения в лечении заболевания кишечника. Фармацевтическая композиция может состоять из раскрытого антисмыслового олигонуклеотида, который нацеливается на FMRP, и фармацевтически приемлемого носителя. В контексте настоящего документа термин "фармацевтическая композиция" означает, например, смесь, содержащую определенное количество терапевтического соединения, например, эффективное количество терапевтического соединения в фармацевтически приемлемом носителе, подлежащую введению млекопитающему, например, человеку, с целью лечения заболевания кишечника. Согласно некоторым вариантам осуществления в настоящем документе предусмотрены фармацевтические композиции, содержащие раскрытый антисмысловый олигонуклеотид для FMRP и фармацевтически приемлемый носитель. Согласно другому аспекту настоящее раскрытие относится к применению раскрытого антисмыслового олигонуклеотида для FMRP в изготовлении лекарственного препарата для лечения воспалительного заболевания. "Лекарственный препарат" в контексте настоящего документа по существу имеет то же значение, что и термин "фармацевтическая композиция".

В контексте настоящего документа "фармацевтически приемлемый носитель" означает буферы, носители и вспомогательные вещества, подходящие для применения, предусматривающего контакт с тканями людей и животных без чрезмерной токсичности, раздражения, аллергической реакции или другой проблемы или осложнения, соответствующие обоснованному соотношению польза/риск. Носитель(и)

должен(ны) быть "приемлемым(и)" в том смысле, что он(они) совместим(ы) с другими ингредиентами составов и не является(ются) вредным(и) для реципиента. Фармацевтически приемлемые носители включают буферы, растворители, диспергирующие среды, оболочки, изотонические средства и средства, замедляющие абсорбцию и т.п., которые совместимы с фармацевтическим введением. Применение таких сред и средств для фармацевтически активных веществ известны в данной области. Согласно одному варианту осуществления фармацевтическую композицию вводят пациенту перорально, и она включает кишечнорастворимую оболочку, подходящую для регулирования участка абсорбции инкапсулированных веществ в пищеварительной системе или кишечнике. Например, кишечнорастворимая оболочка может включать сополимер этилакрилата и метакриловой кислоты.

Согласно некоторым вариантам осуществления раскрытый антисмысловой олигонуклеотид для FMRP и любую фармацевтическую композицию на его основе можно вводить пациенту одним или несколькими путями, включая энтеральную или парентеральную доставку или внутриопухолевую инъекцию. В контексте настоящего документа энтеральное или внутрикишечное введение или доставка относятся к введению пациенту раскрытого антисмыслового олигонуклеотида для FMRP посредством желудочно-кишечного тракта и могут включать пероральную, сублингвальную, желудочную и ректальную доставку. В контексте настоящего документа парентеральное введение относится к введению раскрытого антисмыслового олигонуклеотида для FMRP пациенту посредством путей, отличных от желудочно-кишечного тракта, и включает без ограничения внутривенные, внутриопухолевые, интраназальные, чрескожные, подкожные, внутримышечные, внутрибрюшинные, интестинальные инъекции или инфузии (например, в тощую кишку, в подвздошную кишку), инъекции или инфузии в толстую кишку или в прямую кишку.

Например, раскрытый антисмысловой олигонуклеотид для FMRP можно вводить пациенту подкожно. Согласно определенным примерам раскрытый антисмысловой олигонуклеотид для FMRP можно вводить субъекту перорально. Согласно различным примерам раскрытый антисмысловой олигонуклеотид для FMRP можно вводить пациенту прямо в желудочно-кишечный тракт или в конкретные области желудочно-кишечного тракта (например, тощую кишку, подвздошную кишку, толстую кишку или прямую кишку) посредством парентерального введения.

Фармацевтические композиции, содержащие раскрытый антисмысловой олигонуклеотид для FMRP, как, например, таковые, раскрытые в настоящем документе, могут находиться в единичной дозированной форме и могут быть получены любым подходящим способом. Фармацевтическая композиция должна быть составлена так, чтобы она была совместима с предполагаемым путем введения. Пригодные составы можно получать с помощью способов, хорошо известных в области фармацевтики. См., например, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18-е изд. (Mack Publishing Company, 1990).

Фармацевтические составы, например, являются стерильными. Стерилизацию можно выполнять, например, путем фильтрации через стерильные фильтрующие мембраны. Если композиция лиофилизована, стерилизацию фильтрованием можно проводить до или после лиофилизации и восстановления.

Парентеральное введение

Фармацевтические композиции по настоящему раскрытию можно составлять для парентерального введения, например, их можно составлять для инъекции посредством внутривенного, внутриопухолевого, внутримышечного, подкожного, внутривагитального, интестинального путей (например, в тощую кишку, в подвздошную кишку), в толстую кишку или в прямую кишку, или посредством внутрибрюшинного пути. Получение водной композиции, такой как водная фармацевтическая композиция, содержащая раскрытый антисмысловой олигонуклеотид для FMRP, будет известно специалистам в данной области в свете настоящего раскрытия. Как правило, такие композиции можно получать в виде инъекционных препаратов, в виде либо жидких растворов, либо суспензий; также можно получать твердые формы, подходящие для применения в получении растворов или суспензий после добавления жидкости перед инъекцией; и препараты можно также эмульгировать.

Фармацевтические формы, подходящие для инъекционного применения, включают стерильные водные растворы или дисперсии; составы, включающие кунжутное масло, арахисовое масло или водный пропиленгликоль; и стерильные порошки для экстенпорального получения стерильных инъекционных растворов или дисперсий. Во всех случаях форма должна быть стерильной и жидкой до такой степени, чтобы ее можно было легко набрать с помощью шприца. Она должна быть стабильной в условиях изготовления и хранения и должна быть защищена от загрязняющего действия микроорганизмов, таких как бактерии и грибы.

Растворы активных соединений в виде свободного основания или фармакологически приемлемых солей можно получать в воде, смешанной подходящим образом с поверхностно-активным веществом, таким как гидроксипропилцеллюлоза. Также можно получать дисперсии в глицерине, жидких полиэтиленгликолях и их смесях, а также в маслах. Кроме того, в качестве растворителя или суспендирующей среды можно использовать стерильные нелетучие масла. С этой целью можно использовать любое мягкое нелетучее масло, включая синтетические моно- или диглицериды. Кроме того, для приготовления инъекционных препаратов можно применять жирные кислоты, такие как олеиновая кислота. Стерильный инъекционный препарат также может представлять собой стерильный инъекционный раствор, суспензию

или эмульсию в нетоксичном приемлемом для парентерального введения разбавителе или растворителе, например, в виде раствора в 1,3-бутандиоле. Приемлемыми основами и растворителями, которые можно использовать, являются вода, раствор Рингера, U.S.P. и изотоничный раствор хлорида натрия. Согласно одному варианту осуществления раскрытый антисмысловой олигонуклеотид для FMRP можно суспендировать в жидкости-носителе, содержащей 1 мас./об.% карбоксиметилцеллюлозу натрия и 0,1 об./об.% TWEEN™ 80. В обычных условиях хранения и применения эти препараты содержат консервант, предотвращающий рост микроорганизмов.

Инъекционные препараты, например, стерильные инъекционные водные или маслянистые суспензии, могут быть составлены в соответствии с известным уровнем техники с применением подходящих диспергирующих или смачивающих веществ и суспендирующих веществ. Как правило, дисперсии получают путем включения различных стерилизованных активных ингредиентов в стерильную основу, которая содержит основную дисперсионную среду и требуемые другие ингредиенты из ряда таковых, перечисленных выше в настоящем документе. Стерильные инъекционные растворы по настоящему раскрытию можно получать путем включения раскрытого антисмыслового олигонуклеотида для FMRP в требуемое количество соответствующего растворителя с различными количествами других перечисленных выше ингредиентов, при необходимости, с последующей стерилизацией фильтрованием. В случае стерильных порошков для получения стерильных инъекционных растворов предпочтительными способами получения являются вакуумная сушка и методики лиофилизации, в результате которых на выходе получают порошок активного ингредиента и любого дополнительного требуемого ингредиента из предварительно стерилизованного фильтрованием раствора на их основе. Инъекционные составы можно стерилизовать, например, путем фильтрации через удерживающий бактерии фильтр.

Также предусматривается получение большего количества или высококонцентрированных растворов для внутримышечной инъекции. В этом отношении предпочтительным является применение в качестве растворителя DMSO, поскольку это обеспечит очень быстрое проникновение, доставку высоких концентраций раскрытого антисмыслового олигонуклеотида для FMRP к небольшому участку.

Подходящие консерванты для применения в таком растворе включают хлорид бензалкония, хлорид бензетония, хлорбутанол, тимеросал и т.п. Подходящие буферы включают борную кислоту, бикарбонат натрия и калия, бораты натрия и калия, карбонат натрия и калия 10, ацетат натрия, фосфорнокислый натрий двузамещенный и т.п., в количествах, достаточных для поддержания pH в диапазоне от приблизительно pH 6 до pH 8, и, например, от приблизительно pH 7 до pH 7,5. Подходящими средствами, регулирующими тоничность, являются декстран 40, декстран 70, декстроза, глицерин, хлорид калия, пропиленгликоль, хлорид натрия и т.п., при этом эквивалент раствора хлорида натрия находится в диапазоне 0,9 плюс или минус 0,2%. Подходящие антиоксиданты и стабилизаторы включают бисульфит натрия, метабисульфит натрия, тиосульфат натрия, тиомочевину и т.п. Подходящие смачивающие и осветляющие вещества включают полисорбат 80, полисорбат 20, полоксамер 282 и тилоксапол. Подходящие загустители включают декстран 40, декстран 70, желатин, глицерин, гидроксипропилцеллюлозу, гидроксиметилпропилцеллюлозу, ланолин, метилцеллюлозу, петролатум, полиэтиленгликоль, поливиниловый спирт, поливинилпирролидон, карбоксиметилцеллюлозу и т.п.

Энтеральное введение

Согласно некоторым вариантам осуществления в настоящем документе предусмотрены композиции, подходящие для пероральной, сублингвальной, желудочной или ректальной доставки раскрытого антисмыслового олигонуклеотида для FMRP.

К примеру, композиции, содержащие раскрытый антисмысловой олигонуклеотид для FMRP, могут быть подходящими для пероральной доставки, например, таблетки, которые включают кишечнорастворимую оболочку, например, устойчивую к действию желудочного сока оболочку, так что композиции могут доставлять антисмысловой олигонуклеотид для FMRP, например, в желудочно-кишечный тракт пациента. Например, такое введение пациенту может обеспечивать местный эффект, по сути, при местном применении антисмыслового олигонуклеотида для FMRP непосредственно в пораженной части желудочно-кишечного тракта пациента. Согласно некоторым вариантам осуществления такое введение пациенту, по сути, позволяет избежать нежелательной системной абсорбции антисмыслового олигонуклеотида для FMRP.

Например, представлена таблетка для перорального введения, которая содержит гранулы (например, по меньшей мере частично образованная гранулами), которые включают раскрытый антисмысловой олигонуклеотид для FMRP, например, антисмысловой олигонуклеотид, представленный любой из SEQ ID NO: 1-10, и фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества. Такая таблетка может быть покрыта кишечнорастворимой оболочкой. Предусмотренные таблетки могут включать фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества, такие как наполнители, связующие, разрыхлители и/или смазывающие вещества, а также красители, регуляторы высвобождения, покрывающие вещества, подсластители, вкусоароматические вещества, такие как грушанка, апельсин, ксилит, сорбит, фруктоза и мальтодекстрин, и ароматизирующие вещества, консерванты и/или антиоксиданты.

Согласно некоторым вариантам осуществления предусмотренные фармацевтические составы включают внутригранулярную фазу, которая включает раскрытый антисмысловой олигонуклеотид для

FMRP, например, антисмысловой олигонуклеотид, представленный любой из SEQ ID NO: 1-10, фармацевтически приемлемую соль и/или фармацевтически приемлемый наполнитель. Например, раскрытый антисмысловой олигонуклеотид для FMRP и наполнитель могут быть смешаны вместе, необязательно, с другими вспомогательными веществами, и сформованы в виде гранул. Согласно некоторым вариантам осуществления внутригранулярная фаза может быть образована с применением влажной грануляции, например, жидкость (например, воду) добавляют к смешанному соединению, представляющему собой олигонуклеотид для FMRP, и наполнителю, а затем комбинацию сушат, измельчают и/или просеивают с получением гранул. Специалисту в данной области будет понятно, что для получения внутригранулярной фазы можно применять и другие процессы.

Согласно некоторым вариантам осуществления предусмотренные составы включают внегранулярную фазу, которая может включать одно или несколько фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ, и которая может быть смешана с внутригранулярной фазой с образованием раскрытого состава.

Раскрытый состав может включать внутригранулярную фазу, которая включает наполнитель. Иллюстративные наполнители включают без ограничения целлюлозу, желатин, фосфат кальция, лактозу, сахарозу, глюкозу, маннит, сорбит, микрокристаллическую целлюлозу, пектин, полиакрилаты, декстрозу, ацетат целлюлозы, гидроксипропилметилцеллюлозу, частично предварительно клейстеризованный крахмал, карбонат кальция и т. д., включая их комбинации.

Согласно некоторым вариантам осуществления раскрытый состав может включать внутригранулярную фазу и/или внегранулярную фазу, которая включает связующее, которое обычно может удерживать ингредиенты фармацевтического состава вместе. Иллюстративные связующие по настоящему раскрытию могут включать без ограничения следующее: виды крахмала, сахара, целлюлоза или модифицированная целлюлоза, такая как гидроксипропилцеллюлоза, лактоза, предварительно клейстеризованный маисовый крахмал, поливинилпирролидон, гидроксипропилцеллюлоза, гидроксипропилметилцеллюлоза, гидроксипропилцеллюлоза с низкой степенью замещения, карбоксиметилцеллюлоза натрия, метилцеллюлоза, этилцеллюлоза, сахароспирты и т. д., включая их комбинации.

Составы, например, которые включают внутригранулярную фазу и/или внегранулярную фазу, могут включать разрыхлитель, такой как без ограничения крахмал, целлюлоза, поперечно сшитый поливинилпирролидон, крахмалгликолят натрия, карбоксиметилцеллюлоза натрия, альгинаты, кукурузный крахмал, кроскармеллоза натрия, поперечно-сшитая карбоксиметилцеллюлоза, гидроксипропилцеллюлоза с низкой степенью замещения, гуммиарабик и т. д., включая их комбинации. Например, внутригранулярная фаза и/или внегранулярная фаза могут включать разрыхлитель.

Согласно некоторым вариантам осуществления предусмотренный состав включает внутригранулярную фазу, содержащую раскрытый антисмысловой олигонуклеотид для FMRP и вспомогательные вещества, выбранные из следующего: маннит, микрокристаллическая целлюлоза, гидроксипропилметилцеллюлоза и крахмалгликолят натрия или их комбинации, и внегранулярную фазу, содержащую одно или несколько из следующего: микрокристаллическая целлюлоза, крахмалгликолят натрия и стеарат магния или их смеси.

Согласно некоторым вариантам осуществления состав может включать смазывающее вещество, например, внегранулярная фаза может содержать смазывающее вещество. Смазывающие вещества включают без ограничения тальк, кремнезем, жиры, стеарин, стеарат магния, фосфат кальция, диоксид кремния, силикат кальция, фосфат кальция, коллоидный диоксид кремния, стеараты металлов, гидрогенизированное растительное масло, кукурузный крахмал, бензоат натрия, полиэтиленгликоли, ацетат натрия, стеарат кальция, лаурилсульфат натрия, хлорид натрия, лаурилсульфат магния, тальк и стеариновую кислоту.

Согласно некоторым вариантам осуществления фармацевтический состав содержит кишечнорастворимую оболочку. Обычно кишечнорастворимые оболочки создают барьер для перорального лекарственного препарата, с помощью которого обеспечивается контроль участка абсорбции лекарственного средства в желудочно-кишечном тракте. Кишечнорастворимые оболочки могут включать полимер, который разрушается с разной скоростью, в зависимости от pH. Кишечнорастворимые оболочки могут включать, например, фталат ацетата целлюлозы, сополимеры метилакрилата и метакриловой кислоты, сукцинат ацетата целлюлозы, фталат гидроксипропилметилцеллюлозы, сополимеры метилметакрилата и метакриловой кислоты, сополимеры этилакрилата и метакриловой кислоты, сополимер метакриловой кислоты, тип C, фталат поливинилацетата и фталат ацетата целлюлозы.

Иллюстративные кишечнорастворимые оболочки включают марки Opadry® AMB, Acryl-EZE®, Eudragit®. Согласно некоторым вариантам осуществления кишечнорастворимая оболочка может составлять от приблизительно 5 до приблизительно 10%, от приблизительно 5 до приблизительно 20%, от 8 до приблизительно 15%, от приблизительно 8 до приблизительно 20%, от приблизительно 10 до приблизительно 20% или от приблизительно 12 до приблизительно 20% или приблизительно 18% от предусмотренной таблетки по массе. Например, кишечнорастворимые оболочки могут включать сополимер этилакрилата и метакриловой кислоты.

Например, согласно предусмотренному варианту осуществления представлена таблетка, которая

содержит или состоит по существу из от приблизительно 0,5% до приблизительно 70%, например, от приблизительно 0,5% до приблизительно 10% или от приблизительно 1% до приблизительно 20% по массе раскрытого антисмыслового олигонуклеотида для FMRP или его фармацевтически приемлемой соли. Такая таблетка может включать, например, от приблизительно 0,5% до приблизительно 60% по массе маннита, например, от приблизительно 30% до приблизительно 50% по массе маннита, например, приблизительно 40% по массе маннита; и/или от приблизительно 20% до приблизительно 40% по массе микрокристаллической целлюлозы или от приблизительно 10% до приблизительно 30% по массе микрокристаллической целлюлозы. Например, раскрытая таблетка может содержать внутригранулярную фазу, которая включает от приблизительно 30% до приблизительно 60%, например, от приблизительно 45% до приблизительно 65% по массе или, в качестве альтернативы, от приблизительно 5 до приблизительно 10% по массе раскрытого антисмыслового олигонуклеотида для FMRP, от приблизительно 30% до приблизительно 50% или, в качестве альтернативы, от приблизительно 5% до приблизительно 15% по массе маннита, от приблизительно 5% до приблизительно 15% микрокристаллической целлюлозы, от приблизительно 0% до приблизительно 4% или от приблизительно 1% до приблизительно 7% гидроксипропилметилцеллюлозы и от приблизительно 0% до приблизительно 4%, например, от приблизительно 2% до приблизительно 4% крахмалгликолята натрия по массе.

Согласно различным вариантам осуществления фармацевтический состав в виде таблетки для перорального введения раскрытого антисмыслового олигонуклеотида для FMRP содержит внутригранулярную фазу, причем внутригранулярная фаза включает раскрытый антисмысловой олигонуклеотид для FMRP или его фармацевтически приемлемую соль (такую как натриевая соль) и фармацевтически приемлемый наполнитель, и он также может включать внегранулярную фазу, которая может включать фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество, такое как разрыхлитель.

Внегранулярная фаза может включать компоненты, выбранные из микрокристаллической целлюлозы, стеарата магния и их смесей. Фармацевтическая композиция может также включать кишечнорастворимую оболочку, составляющую от приблизительно 12 до 20% по массе таблетки. Например, фармацевтически приемлемая таблетка для перорального применения может содержать от приблизительно 0,5 до 10% по массе раскрытого антисмыслового олигонуклеотида для FMRP, например, раскрытого антисмыслового олигонуклеотида для FMRP или его фармацевтически приемлемой соли, от приблизительно 30 до 50% по массе маннита, от приблизительно 10 до 30% по массе микрокристаллической целлюлозы и кишечнорастворимую оболочку, содержащую сополимер этилакрилата и метакриловой кислоты.

Согласно некоторым примерам фармацевтически приемлемая таблетка для перорального применения может содержать внутригранулярную фазу, содержащую от приблизительно 5 до приблизительно 10% по массе раскрытого антисмыслового олигонуклеотида для FMRP, например, раскрытого антисмыслового олигонуклеотида для FMRP или его фармацевтически приемлемой соли, приблизительно 40% по массе маннита, приблизительно 8% по массе микрокристаллической целлюлозы, приблизительно 5% по массе гидроксипропилметилцеллюлозы и приблизительно 2% по массе крахмалгликолята натрия; внегранулярную фазу, содержащую приблизительно 17% по массе микрокристаллической целлюлозы, приблизительно 2% по массе крахмалгликолята натрия, приблизительно 0,4% по массе стеарата магния; и покрывающую таблетку кишечнорастворимую оболочку, содержащую сополимер этилакрилата и метакриловой кислоты.

Согласно некоторым вариантам осуществления фармацевтическая композиция может содержать кишечнорастворимую оболочку, содержащую приблизительно 13 или приблизительно 15, 16, 17 или 18% по массе, например, Acryl-EZE® (см., например, публикацию согласно PCT № WO 2010/054826, которая включена в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте).

Скорость, при которой растворяется оболочка и высвобождается активный ингредиент, является скоростью растворения. Согласно некоторым вариантам осуществления таблетка может характеризоваться профилем растворения, например, при тестировании на приборе USP/EP типа 2 (лопастный) при 100 об/мин и 37°C в фосфатном буфере с pH 7,2, предусматривающим от приблизительно 50% до приблизительно 100% высвобождение антисмыслового олигонуклеотида для FMRP через промежуток времени, составляющий от приблизительно 120 до приблизительно 240 мин, например через 180 мин. Согласно определенным вариантам осуществления таблетка может характеризоваться профилем растворения, например, при тестировании на приборе USP/EP типа 2 (лопастный) при 100 об/мин и 37°C в разбавленной HCl с pH 1,0, при котором через 120 мин антисмысловой олигонуклеотид для FMRP практически не высвобождается. Согласно некоторым вариантам осуществления таблетка может характеризоваться профилем растворения, например, при тестировании на приборе USP/EP типа 2 (лопастный) при 100 об/мин и 37°C в фосфатном буфере с pH 6,6, предусматривающим от приблизительно 10% до приблизительно 30% или не более чем 50% высвобождение антисмыслового олигонуклеотида для FMRP через 30 мин.

Составы, например, таблетки, согласно некоторым вариантам осуществления при пероральном введении пациенту могут обеспечивать минимальную концентрацию антисмыслового олигонуклеотида для FMRP в плазме крови у пациента. Согласно другому варианту осуществления раскрытые составы при пероральном введении обеспечивают местную доставку к толстой кишке или прямой кишке пациента,

например, к пораженному или поврежденному вследствие заболевания участку организма пациента.

Введение пациенту раскрытого антисмыслового олигонуклеотида для FMRP может осуществляться ректально. Фармацевтические композиции для ректального введения включают пены, растворы (клизмы) и суппозитории (Block, глава 87 в: Remington's Pharmaceutical Sciences, 18-е изд., Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1990).

Согласно некоторым вариантам осуществления способы, представленные в настоящем документе, могут дополнительно включать введение пациенту по меньшей мере одного другого средства, которое направлено на лечение заболеваний и нарушений, раскрытых в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам осуществления предусмотренные другие средства можно вводить пациенту совместно (например, последовательно или одновременно).

Например, такие средства включают без ограничения химиотерапевтические средства, такие как даунорубин, дауномицин, дактиномицин, доксорубин, эпирубин, идарубин, эзрубин, блеомицин, мафосфамид, ифосфамид, цитозина арабинозид, бис-хлорэтилнитрозомочевина, бусульфид, митомицин C, актиномицин D, митрамицин, преднизон, гидроксипрогестерон, тестостерон, тамоксифен, дакарбазин, прокарбазин, гексаметилмеламин, пентаметилмеламин, митоксантрон, амсакрин, хлорамбуцил, метилциклогексилнитрозомочевина, азотистые иприты, мелфалан, циклофосфамид, 6-меркаптопурин, 6-тиогуанин, цитарабин (CA), 5-азацитидин, гидроксимочевина, дезоксикоформицин, 4-гидроксипероксициклофосфамид, 5-фторурацил (5-FU), 5-фтордезоксифуридин (5-FdR), метотрексат (MTX), колхицин, винкристин, винбластин, этопозид, триметрексат, тенипозид, цисплатин и диэтилстильбестрол (DES).

Средства также включают иммунодепрессивные средства, включая глюкокортикоиды, цитостатики, антитела, средства, действующие на иммунофилины, интерфероны, опиоиды, TNF-связывающие белки, микофенолат и низкомолекулярные биологические средства. Например, предусмотренные иммунодепрессивные средства включают без ограничения такролимус, циклоспорин, пимекролимус, сиролимус, эверолимус, микофеноловую кислоту, финголимод, дексаметазон, флударабин, циклофосфамид, метотрексат, азатиоприн, лефлуномид, терифлуномид, анакинру, антигемоцитарный глобулин, антилимфоцитарный глобулин, муромонаб-CD3, афугузумаб, ритуксимаб, теплизумаб, эфализумаб, даклизумаб, базиликсимаб, адалимумаб, инфликсимаб, цертолизумаб пэгол, натализумаб и этанерцепт. Другие средства включают антибиотики, противодиарейные средства, слабительные, обезболивающие средства, биологически активные добавки, содержащие железо, и биологически активные добавки, содержащие кальций или витамин D или B-12.

Дозировка и частота введения

Иллюстративные составы включают лекарственные формы, которые включают или состоят по существу из раскрытого антисмыслового олигонуклеотида для FMRP в количестве от приблизительно 35 до приблизительно 500 мг. Например, в настоящем документе предусмотрены составы, которые включают приблизительно 35 мг, 40 мг, 50 мг, 60 мг, 70 мг, 80 мг, 90 мг, 100 мг, 110 мг, 120 мг, 130 мг, 140 мг, 150 мг, 160 мг, 170 мг, 180 мг, 190 мг, 200 мг или 250 мг раскрытого антисмыслового олигонуклеотида для FMRP. Согласно одному варианту осуществления состав может включать приблизительно 40 мг, 80 мг или 160 мг раскрытого антисмыслового олигонуклеотида для FMRP. Согласно некоторым вариантам осуществления состав может включать по меньшей мере 100 мкг раскрытого антисмыслового олигонуклеотида для FMRP. Например, составы могут включать приблизительно 0,1 мг, 0,2 мг, 0,3 мг, 0,4 мг, 0,5 мг, 1 мг, 5 мг, 10 мг, 15 мг, 20 мг или 25 мг раскрытого антисмыслового олигонуклеотида для FMRP. Количество, вводимое пациенту, будет зависеть от таких переменных, как тип и степени выраженности заболевания или симптома, подлежащих лечению, общего состояния здоровья и размера пациента, *in vivo* активности антисмыслового олигонуклеотида для FMRP, фармацевтического состава и пути введения. Начальная дозировка может быть повышена относительно верхнего уровня с целью быстрого достижения требуемого уровня в крови или уровня в ткани. Начальная дозировка может быть ниже оптимальной, и дозировку можно постепенно повышать в ходе курса лечения. Дозировка для человека может быть оптимизирована, например, в ходе стандартного исследования I фазы с повышением дозы, предусматривающего дизайн с переходом от 40 до 160 мг. Частота дозирования может варьироваться в зависимости от таких факторов, как путь введения, величина дозировки и заболевание, подлежащее лечению. Иллюстративная частота дозирования предусматривает введение один раз в сутки, один раз в неделю и один раз в две недели. Согласно некоторым вариантам осуществления дозирование осуществляют один раз в сутки в течение 7 суток.

Способы диагностики

Настоящее раскрытие также относится к способу диагностики у пациента заболевания кишечника, который основывается на выявлении уровней сигналов, свидетельствующих об экспрессии FMRP, в одном или нескольких биологических образцах от пациента. В контексте настоящего документа термин "сигнал, свидетельствующий об экспрессии FMRP" может относиться к любому признаку экспрессии гена FMR1, продуктов гена FMR1 или активности FMRP. Продукты гена FMR1 включают РНК (например, мРНК), пептиды и белки (например, FMRP, его варианты, аналоги и/или части). Показатели экспрессии гена FMR1, которые можно оценивать, включают без ограничения взаимодействие гена FMR1

или гена FMR1 в составе хроматина с клеточными компонентами, которые осуществляют регуляцию экспрессии гена, уровни экспрессии продукта гена FMR1 (например, уровни экспрессии РНК FMRP, уровни экспрессии белка FMRP) или взаимодействие РНК или белка FMRP с транскрипционным, трансляционным или посттрансляционным процессинговым аппаратом. Показатели активности FMRP включают без ограничения оценку активации сигнального пути RIPK/MLKL (например, оценку фосфорилирования RIPK1, RIPK3 и/или MLKL) и экспрессии CREB (например, экспрессии мРНК и белка).

Выявление сигнала, свидетельствующего об экспрессии FMRP, можно выполнять с помощью *in vivo*, *in vitro* или *ex vivo* способов. Согласно предпочтительному варианту осуществления способы по настоящему раскрытию можно осуществлять *in vitro*. Способы выявления могут включать выявление в крови, сыворотке крови, кале, ткани или клетках пациента. Выявление можно проводить путем измерения сигнала, свидетельствующего об экспрессии FMRP, в цельной ткани, тканевых эксплантатах, культурах клеток, диссоциированных клетках, клеточном экстракте или биологических жидкостях, включая кровь или сыворотку крови. Предусмотренные способы выявления включают анализы, которые позволяют измерять уровни экспрессии продукта гена FMR1, такие как вестерн-блоттинг, проточная цитометрия, ELISA, другие количественные анализы связывания, анализы роста клеток или тканей, нозерн-блот, количественная или полуколичественная полимеразная цепная реакция, методы медицинской визуализации (например, MRI) или методы иммуноокрашивания (например, иммуногистохимический анализ или иммуноцитохимический анализ).

Примеры

Настоящее раскрытие дополнительно проиллюстрировано следующими примерами. Примеры представлены исключительно с целью иллюстрации и не должны истолковываться как ограничивающие каким-либо образом объем или содержание настоящего раскрытия.

Пример 1. Уровень экспрессии FMRP повышен при раке толстой и прямой кишки человека.

С целью изучения роли FMRP в онкогенезе CRC анализировали уровни мРНК и уровни белка FMRP в CRC-образцах от человека. В этом примере было продемонстрировано наличие повышенного уровня экспрессии FMRP в CRC-образцах от человека.

Пациенты и образцы

Парные образцы CRC-опухолей человека и смежных не пораженных на макроскопическом уровне областей брали у 48 пациентов, перенесших резекцию толстой кишки по поводу sporadического CRC в клинической больнице университета Тор Вергата (Рим, Италия). Ни один из пациентов не получал лучевую терапию или химиотерапию до операции.

Иммуногистохимический анализ

Иммуногистохимический анализ осуществляли с использованием фиксированных формалином, залитых парафином срезов нормальных тканей и парных образцов опухоли и окружающей опухоль ткани от пациентов с CRC. Срезы толстой кишки подвергали депарафинизации и дегидратации с применением ксилола и этанола и осуществляли демаскирование антигена в Tris-EDTA-цитратном буфере (pH 7,8) в течение 30 мин в термостатической бане при 98°C (Dako Agilent Technologies, Глоструп, Дания). Иммуногистохимическое окрашивание осуществляли с применением моноклонального антитела к FMRP человека (конечное разведение 1:500, LifeSpan BioSciences, Inc.), инкубированного при комнатной температуре в течение 1 ч с последующим применением безбiotиновой методики выявления с использованием HRP-полимера и 3,3'-диаминобензидина (DAB) в качестве хромогена (набор MACH 4™ Universal HRP-Polymer, Biocare Medical, Пачеко, Калифорния). Срезы подвергали контрастному окрашиванию гематоксилином, дегидратации и заливке. Окрашенные IgG в качестве изотипического контроля срезы готовили в условиях, идентичных вышеописанному иммуногистохимическому анализу, с замещением первичного антитела очищенным контрольным нормальным IgG-антителом мыши (R&D Systems, Миннеаполис, Миннесота).

Экспрессию FMRP анализировали в срезах (n=40), взятых из парных образцов CRC-опухолей от человека и смежных областей, и в образцах, взятых из тканей толстой кишки нормальных контролей (NC). Как показано на фиг. 1A, уровень экспрессии белка FMRP был значимо повышен в образцах CRC-опухоли (T) по сравнению с таковым в окружающих опухоль областях (P) и NC. FMRP экспрессировался на высоком уровне примерно в 61% CRC-образцов (24/40), по сравнению со смежными неопухолевыми областями и NC, в которых FMRP экспрессировался на относительно низком уровне.

Экспрессия мРНК FMRP

РНК экстрагировали из парных образцов CRC-опухоли человека и смежных не пораженных на макроскопическом уровне областей с применением набора PureLink® mRNA Mini (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс, США) в соответствии с инструкциями производителя. Постоянное количество РНК (1 мкг на образец) подвергали обратной транскрипции с образованием комплементарной ДНК (кДНК) и амплифицировали ее с применением следующих условий: денатурация в течение 1 мин при 95°C; отжиг в течение 30 с при 59°C для FMRP человека, 60°C для β-актина человека/мыши; 30 с элонгации при 72°C. В-актин применяли в качестве продукта гена домашнего хозяйства. Экспрессию гена считывали с применением алгоритма ΔΔCt. Последовательности праймеров были следующими: FMRP

человека (прямой 5'- GTTGAGCGGCCGAGTTTGTAG-3' (SEQ ID NO: 11); обратный 5'- CCCACTGGGAGAGGATTATTTGGG-3' (SEQ ID NO: 12)), β -актин человека и мыши (прямой 5'- AAGATGACCCAGATCATGTTTGTAGACC-3' (SEQ ID NO: 13); обратный 5'-AGCCAGTCCAGACGCAGGAT-34 SEQ ID NO: 14)).

Как видно на фиг. 1B, результаты RT-PCR подтверждали данные иммуногистохимического анализа и продемонстрировали, что уровень экспрессии мРНК FMRP был значимо повышен в образцах CRC-опухоли от человека (Т) по сравнению с таковым в образцах окружающей опухоль ткани (Р), которые были взяты из не пораженных на макроскопическом уровне областей от тех же пациентов.

Экспрессия белка FMRP

Общий белок экстрагировали из тканей толстой кишки человека и лизировали на льду в буфере, содержащем 10 mM HEPES [pH 7,9], 10 mM KCl, 0,1 mM этилендиаминтетрауксусную кислоту (EDTA), 0,2 mM этиленгликоль-бис-(β -аминоэтиловый эфир)-N,N,N',N'-тетрауксусную кислоту (EGTA) и 0,5% Nonidet P40, дополненный 1 mM дитиотреитолом (DTT), 10 мг/мл апротинина, 10 мг/мл лейпептина, 1 mM фенилметилсульфонил фторид (PMSF), 1 mM Na_3VO_4 и 1 mM NaF. Лизаты осветляли путем центрифугирования и разделяли с помощью электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (SDS). Мембраны для блоттинга инкубировали с антителами к FMRP (Cell Signaling, Данверс, Массачусетс) с последующим инкубированием с вторичным антителом, конъюгированным с пероксидазой хрена (Dako, Милан, Италия). После анализа каждую мембрану для блоттинга подвергали стрипированию и инкубировали с моноклональным антителом мыши к β -актину человека (Sigma-Aldrich) для того, чтобы убедиться в эквивалентности загрузки дорожек.

Как видно на фиг. 1C и 1D, результаты вестерн-блот-анализа подтверждали данные иммуногистохимического анализа и RT-PCR, и продемонстрировали, что уровень экспрессии белка FMRP был значимо повышен в образцах CRC-опухоли от человека (Т) по сравнению с таковым в образцах окружающей опухоль ткани (Р), которые были взяты из не пораженных на макроскопическом уровне областей от тех же пациентов.

Пример 2. Нокаутные по FMR1 мыши устойчивы к индуцируемому азоксиметаном онкогенезу.

Для выяснения роли FMRP в CRC применяли мышиную модель спорадического CRC, индуцируемого азоксиметаном (AOM). В этом примере описывается опухоль-резистентный фенотип нокаутных по FMR1 мышей в модели AOM-индуцируемого CRC.

Индукция CRC с помощью AOM

Мышам дикого типа (WT) и нокаутным по FMR1 (KO) мышам путем внутрибрюшинной инъекции вводили алкилирующее средство, AOM (10 мг/кг; Sigma Aldrich, Милан, Италия), один раз в неделю в течение 5 недель с целью индукции образования опухоли. За мышами наблюдали в отношении образования опухоли и подвергали их эндоскопическому скринингу с применением эндоскопической системы с высоким разрешением за 7 суток до умерщвления. К 22-й неделе мышей умерщвляли путем цервикальной дислокации и собирали ткани толстой кишки для анализа.

Процедуры колоноскопии выполняли в слепом режиме, чтобы отслеживать образование опухоли с помощью эндоскопической системы с высоким разрешением для мышей. Опухоли выявляли в ходе эндоскопического исследования, осуществляемого на 21-й неделе. После завершения лечения опухоли подсчитывали для определения общего числа очагов в толстой кишке. Все опухоли оценивали исходя из их размера и подсчитывали с применением протокола, описанного в Becker C. et al., Gut. 2005; 54(7):950-4., включенной в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте. Вкратце, опухоли были подвергнуты стадированию следующим образом: стадия 1 (очень маленькая, но выявляемая опухоль), стадия 2 (опухоль, покрывающая до одной восьмой окружности толстой кишки), стадия 3 опухоль, покрывающая до четверти окружности толстой кишки), стадия 4 (опухоль, покрывающая до половины окружности толстой кишки) и стадия 5 (опухоль, покрывающая более половины окружности толстой кишки).

Как видно на фиг. 2A и 2B, у мышей WT, обработанных AOM, развивалось несколько крупных опухолей, тогда как число и размер опухолей у AOM-обработанных FMR1-KO мышей были значимо уменьшены. Эти результаты подтверждали путем прямой оценки опухолей у мышей, умерщвленных к неделе 22 (данные не показаны). Как показано на фиг. 2C, AOM-обработанные мыши WT характеризовались 20% снижением жизнеспособности в сравнении с AOM-обработанными FMR1-KO животными.

Иммуногистохимический анализ

Гистологический анализ осуществляли на замороженных срезах толстой кишки мыши, полученных у WT и FMR1-KO мышей из опухолевых и окружающих опухоль областей, после окрашивания гематоксилином и эозином (H&E). Срезы толстой кишки подвергали депарафинизации и дегидратации с применением ксилола и этанола и осуществляли демаскирование антигена в Tris-EDTA-цитратном буфере (pH 7,8) в течение 30 мин в термостатической бане при 98°C (Dako Agilent Technologies, Глоструп, Дания) Иммуногистохимическое окрашивание осуществляли с применением моноклонального антитела к FMRP человека (конечное разведение 1:500, LifeSpan BioSciences, Inc.), инкубированного при комнатной температуре в течение 1 ч с последующим применением безбиотиновой методики выявления с использова-

нием HRP-полимера и 3,3'-диаминобензидина (DAB) в качестве хромогена (набор MACH 4™ Universal HRP-Polymer, Biocare Medical, Пачеко, Калифорния). Срезы подвергали контрастному окрашиванию гематоксилином, дегидратации и заливке. Окрашенные IgG в качестве изотипического контроля срезы готовили в условиях, идентичных вышеописанному иммуногистохимическому анализу, с замещением первичного антитела очищенным контрольным нормальным IgG-антителом мыши (R&D Systems, Миннеаполис, Миннесота).

В отсутствие АОМ-обработки ткани кишечника FMRP-КО мышей были нормальными, и макроскопических аномалий, по сравнению с мышами WT, не наблюдали (данные не показаны). Однако, как показано на фиг. 2D, опухоли, вырезанные через 22 недели после АОМ-обработки, свидетельствовали о том, что у мышей WT развивались опухоли с первазивной дисплазией, тогда как у FMR1-КО животных сохранялась нормальная архитектура слизистой оболочки, прилегающей к диспластическим областям.

Экспрессия белка FMRP

Общий белок экстрагировали из тканей толстой кишки мыши и лизировали на льду в буфере, содержащем 10 mM HEPES [pH 7,9], 10 mM KCl, 0,1 mM этилендиаминтетрауксусную кислоту (EDTA), 0,2 mM этиленгликоль-бис-(β-аминоэтиловый эфир)-N,N,N',N'-тетрауксусную кислоту (EGTA) и 0,5% Nonidet P40, дополненный 1 mM дитиотреитолом (DTT), 10 мг/мл апротинина, 10 мг/мл лейпептина, 1 mM фенилметилсульфонил фторид (PMSF), 1 mM Na₃VO₄ и 1 mM NaF. Лизаты освещали путем центрифугирования и разделяли с помощью электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (SDS). Мембраны для блоттинга инкубировали с антителами к FMRP (Cell Signaling, Данверс, Массачусетс) с последующим инкубированием с вторичным антителом, конъюгированным с пероксидазой хрена (Dako, Милан, Италия). После анализа каждую мембрану для блоттинга подвергали стрипированию и инкубировали с моноклональным антителом мыши к β-актину человека (Sigma-Aldrich) для того, чтобы убедиться в эквивалентности загрузки дорожек.

Как показано на фиг. 2E, что согласуется с образцами CRC человека, уровень экспрессии белка FMRP был повышен в опухолях слизистой оболочки (T) АОМ-обработанных мышей WT, по сравнению с таковым в смежных окружающих опухоль областях (P) у тех же животных.

TUNEL- и Ki67-окрашивание

Для определения того, был ли сниженный онкогенез, наблюдаемый у FMR1-КО животных, обусловлен повышенной гибелью клеток или сниженной пролиферацией опухолевых клеток, осуществляли TUNEL-окрашивание и иммуногистохимическое окрашивание по Ki67. В замороженных срезах толстой кишки, взятой от WT и FMR1-КО мышей, апоптотические клетки выявляли с применением набора для *in situ* выявления гибели клеток с помощью TUNEL (Roche Applied Science) в соответствии с инструкциями производителя. В качестве хромогена применяли 3-амино-9-этилкарбазол и срезы подвергали контрастному окрашиванию гематоксилином. Ядра апоптотических клеток выглядели как окрашенные в красный цвет структуры на сине-фиолетовом фоне.

Срезы для иммуноцитохимического анализа также инкубировали с моноклональным антителом мыши к Ki67 мыши (клон MIB-5, конечное разведение 1:100, DaKO, Agilent, Санта-Клара, Калифорния, США) при комнатной температуре в течение 30 мин, с последующим применением безбиотинного метода выявления с использованием HRP-полимера (система выявления Ultravision, Thermo Scientific, Уолтем, Массачусетс, США) и 3,3'-диаминобензидина в качестве хромогена (DaKO, Agilent). Срезы подвергали контрастному окрашиванию гематоксилином, дегидратации и заливке.

Как показано на фиг. 2F, с помощью TUNEL-окрашивания было выявлено, что АОМ-обработанные FMR1-КО мыши характеризовались повышенными уровнями фрагментации ДНК, по сравнению с таковыми у АОМ-обработанных животных WT. Однако, как видно на фиг. 2G, различий в количестве Ki67-положительных клеток не наблюдалось. Эти результаты в совокупности свидетельствуют о том, что FMRP ассоциирован с повышенной устойчивостью опухоли к гибели клеток.

Пример 3. Антисмысловые олигонуклеотиды для FMRP индуцируют гибель клеток в случае линий клеток CRC

Для определения того, как FMRP влияет на выживаемость CRC, гибель клеток, линии эпителиальных клеток CRC человека обрабатывали специфическим антисмысловым олигонуклеотидом для FMRP. В этом примере продемонстрировано, что антисмысловые олигонуклеотиды для FMRP могут индуцировать гибель клеток в случае линий клеток CRC посредством независимого от апоптоза механизма.

Экспрессия FMRP в культурах клеток рака толстой и прямой кишки

Линии клеток CRC человека, DLD-1 и HCT-116, были получены из Американской коллекции типовых культур (ATCC, Манассас, Вирджиния), и их культивировали в среде RPMI1640 (DLD-1) и среде МакКоя 5A (HCT-116) соответственно. Все среды были дополнены 10% фетальной телячьей сывороткой, 1% пенициллином/стрептомицином (оба от Lonza, Вербье, Бельгия). Нормальная линия эпителиальных клеток толстой кишки человека (HCEC-1ct) была получена от EVERCYTE GmbH (Вена, Австрия), и ее культивировали в среде ColoUp® (EVERCYTE GmbH). Клетки поддерживали в полностью увлажненном инкубаторе, установленном на 37°C, 5% CO₂. Готовили лизаты линии клеток и анализировали их с помощью методов электрофореза в полиакриламидном геле с SDS/иммуноблоттинга с применением спосо-

бов, описанных ранее в примере 2. Для иммунофлуоресцентного окрашивания линии клеток фиксировали 3,7% формальдегидом в течение 10 мин при 4°C, пермеабелизовали 0,1% Triton в течение 10 мин при комнатной температуре и блокировали (1% бычий сывороточный альбумин, Tween 0,1%, глицерин 2%) в течение 1 ч при комнатной температуре. Фиксированные и блокированные клетки инкубировали с моноклональным антителом к FMRP (1:500, Cell Signaling, Данверс, Массачусетс) в течение ночи при 4°C. После промывки PBS вносили конъюгированное с Alexa 488 вторичное антитело козы к IgG кролика (1:2000, A11008; Invitrogen) на 1 ч при комнатной температуре. Микропрепараты промывали PBS, заливали с применением реагента, препятствующего выгоранию флуоресценции, Prolong gold® с 4',6-диамидино-2-фенилиндолом (P36931; Invitrogen) и анализировали с помощью микроскопа Leica DMI4000 B с использованием пакета программного обеспечения Leica (V4.6.2).

Как показано на фиг. 3A-3C, FMRP экспрессировался на более высоком уровне в линиях клеток CRC человека (DLD-1 и HCT-116), по сравнению с эпителиальными клетками HCEC-1ct (т. е. нормальными клетками толстой кишки).

Нокдаун FMRP в культурах клеток рака толстой и прямой кишки

Синтезировали фосфоротиоатные однонитевые антисмысловые олигонуклеотиды, комплементарные FMRP человека [5'-TCCACCACCAGCTCCTCCAT-3' (SEQ ID NO: 6)], и однонитевые смысловые олигонуклеотиды [5'-ATGGAGGAGCTGGTGGTGA-3' (SEQ ID NO: 15)].

Линии клеток CRC и клетки HCEC-1ct трансфицировали либо антисмысловым (AS) олигонуклеотидом для FMRP (конечная концентрация 0,5-100 нМ), либо смысловым (S) олигонуклеотидом для FMRP (конечная концентрация 100 нМ) в течение 24 и 48 ч с применением среды Opti-MEM и реагента Lipofectamine 3000 (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс, США) в соответствии с инструкциями производителя.

Как видно на фиг. 3D, 3G и 3I, обработка клеток DLD-1 (фиг. 3C), клеток HCT-116 (фиг. 3G) и клеток HCEC-1ct клеток (фиг. 3I) антисмысловым (AS) олигонуклеотидом для FMRP приводила к значимому ингибированию экспрессии FMRP, и в клетках, обработанных смысловым олигонуклеотидом, значимого ингибирования не наблюдали.

Гибель клеток в случае клеток, обработанных антисмысловым олигонуклеотидом для FMRP

Клетки трансфицировали либо антисмысловым (AS) олигонуклеотидом для FMRP (конечная концентрация 0,5 нМ и 100 нМ), либо смысловым олигонуклеотидом (S) для FMRP (конечная концентрация 100 нМ). Спустя 24 ч (фиг. 3E, 3F, 3J и 3K) или 48 ч (фиг. 3H), клетки собирали, два раза промывали в буфере для мечения аннексином V (AV), окрашивали FITC-аннексином V (конечное разведение 1:100; Immunotools, Фризайте, Германия) в соответствии с инструкциями производителя и инкубировали с 5 мг/мл йодида пропидия (PI) в течение 30 мин при 4°C. Клетки также трансфицировали либо смысловым (S) олигонуклеотидом для FMRP, либо AS-олигонуклеотидом для FMRP (конечная концентрация 100 нМ) в течение 36 ч и анализировали в отношении активированной каспазы 3 и каспазы 8. В качестве положительных и отрицательных контролей, клетки обрабатывали соответственно стауроспорином (конечная концентрация 1 мкМ, Sigma-Aldrich, Милан, Италия) или Q-VD-OPh (ингибитором ряда каспаз; конечная концентрация 1 мкМ) (R&D Systems, Inc, Миннеаполис, Миннесота). Кроме того, спустя 36 ч (фиг. 4F и 4G) или 48 ч после трансфекции (фигуры 4D и 4E), клетки стимулировали 10М бромдезоксигуанидином в течение 60 мин, фиксировали в 70% охлажденном этаноле и хранили при -20°C в течение по меньшей мере 3 ч. Затем клетки разрушали в 2 М HCl и окрашивали моноклональным антителом к бромдезоксигуанидину (Immunotech, Марсель, Франция) с последующим применением конъюгированного с изотиоцианатом флуоресцеина вторичным антителом к иммуноглобулину G (Molecular Probes, Милан, Италия) и 100 г/мл PL Флуоресценцию измеряли с применением проточного цитометра Gallios (Beckman Coulter, Life Sciences, Пасадина, Калифорния, США) и анализировали с применением программного обеспечения Kaluza (Beckman Coulter). Живые клетки считались AV7PI⁺ клетками.

Как показано на фиг. 3E и 3F, обработка клеток DLD-1 антисмысловым олигонуклеотидом для FMRP приводила к повышенному числу аннексии V⁺ или аннексин V⁺PI⁺ клеток, что указывает на то, что такие CRC-клетки подвергались спонтанному апоптозу или некроптозу. Однако, как показано на фиг. 3H, 3J и 3K, ни клетки HCT-116, ни клетки HCRC-1ct, обработанные антисмысловым олигонуклеотидом для FMRP, не характеризовались повышенным числом аннексии V⁺ или аннексии V⁺PI⁺ клеток. Подобные результаты наблюдали при применении специфической siRNA для FMRP, которой трансфицировали линии клеток (данные не показаны).

Чтобы выявить механизмы гибели клеток, индуцируемой антисмысловым олигонуклеотидом для FMRP, анализировали эффект нокдауна FMRP в отношении активации проапоптотических каспазы 8 и каспазы 3. Как показано на фиг. 4A и 4B, обработка CRC-клеток антисмысловым олигонуклеотидом для FMRP не приводила к изменению процентной доли активированных каспаза 3-положительных или активированных каспаза 8-положительных клеток. Как и ожидалось, стауроспорин (Stauro) значительно повышал процентную долю активированных каспаза 3-положительных клеток.

Как видно на фиг. 4C, предварительная обработка клеток ингибитором ряда каспаз (Q-VD-OPh; Casin) не приводила к изменению в отношении гибели клеток, индуцированной антисмысловым олигонук-

леотидом для FMRP. Более того, чтобы проверить, является ли гибель клеток, индуцированная антисмысловым олигонуклеотидом для FMRP, вторичной по отношению к остановке роста клеток, анализировали прохождение по клеточному циклу линий клеток DLD-1. Как показано на фиг. 4D-4G, антисмысловой олигонуклеотид для FMRP не влиял на относительную процентную долю клеток в фазах клеточного цикла G2/M, S или G0/G1 до индукции гибели клеток. В совокупности эти данные свидетельствуют о том, что FMRP влияет на гибель клеток CRC посредством независимого от апоптоза пути, который не влияет на клеточный цикл.

Пример 4. Антисмысловые олигонуклеотиды для FMRP индуцируют некроптоз.

У раковых клеток развился целый механизм, чтобы избежать запрограммированной гибели клеток. Некроптоз представляет собой регулируемый независимый от каспаз путь гибели клеток, который является альтернативным механизмом устранения устойчивых к апоптозу клеток. В этом примере продемонстрировано, что антисмысловые олигонуклеотиды для FMRP индуцируют гибель клеток среди CRC-клеток посредством активации пути некроптоза.

FMRP ассоциируется с мРНК, ассоциированной с путем некроптоза

FMRP из CRC-образцов от человека и линий клеток CRC подвергали иммунопреципитации вместе с его ассоциированной РНК с применением FMRP-специфического антитела (фиг. 5A) для идентификации связанных транскриптов с помощью ПНР в режиме реального времени. В качестве отрицательного контроля применяли β -актин, а в качестве положительных контролей применяли Е-кадгерин и виментин. Как показано на фигурах 5B и 5C, мРНК RIPK3 не подвергалась коиммунопреципитации с FMRP в CRC-образцах от человека или линиях клеток CRC. В отличие от этого, мРНК RIPK1 подвергалась коиммунопреципитации с FMRP на значимых уровнях, по сравнению с IgG в качестве изотипического контроля.

Для подтверждения ассоциации FMRP с компонентами пути некроптоза клетки оставляли необработанными или трансфицировали либо антисмысловым олигонуклеотидом для FMRP (конечная концентрация 0,5 и 100 нМ), либо смысловым олигонуклеотидом для FMRP (конечная концентрация 100 нМ); инкубировали с ингибитором рMLKL (некросульфонамид, NSA; конечная концентрация 1 мкМ) (Calbiochem); или ингибитором рRIPK1 (некростатин-1, NEC1; конечная концентрация 10 мкМ) (Cayman Chemical, Энн-Арбор, Мичиган, США). Через 24 ч клетки собирали и анализировали с помощью вестерн-блота или окрашивали FITC-аннексином V и PI для анализа с использованием проточной цитометрии, как ранее было описано в примерах 1-3.

Как показано на фиг. 6A-6D, обработка антисмысловым олигонуклеотидом для FMRP приводила к повышению уровней экспрессии общего белка RIPK1 в линиях клеток CRC человека. Обработка антисмысловым олигонуклеотидом для FMRP дополнительно приводила к повышенному фосфорилированию RIPK1, RIPK3 и MLKL. Однако, как видно на фиг. 6G, подобного повышения фосфорилирования не наблюдали в клетках HCEC-1ct, обработанных антисмысловым олигонуклеотидом для FMRP.

Как показано на фиг. 6E и 6F, линии клеток CRC человека, инкубированные с RIPK1-специфическим ингибитором, некростатином-1 (NEC1), и MLKL-специфическим ингибитором, некросульфонамидом (NSA), были защищены от гибели клеток, индуцированной антисмысловым олигонуклеотидом для FMRP. В совокупности эти результаты свидетельствуют о том, что FMRP отменяет некроптоз в CRC-клетках путем ингибирования сигнального каскада с участием RIPK1, тем самым подавляя некроптоз.

Пример 5. Экспрессия FMRP регулируется CREB.

Сообщалось, что несколько внутриклеточных протеинкиназ, например, mTOR и MAPK, и факторы транскрипции, например, CREB, осуществляют положительную регуляцию экспрессии FMRP. В этом примере продемонстрировано, что положительную регуляцию экспрессии FMRP осуществляет фактор транскрипции CREB.

Экспрессия мРНК и экспрессия белка CREB

Чтобы оценить, осуществляет ли CREB регуляцию экспрессии FMRP, линии клеток CRC трансфицировали либо антисмысловым (ASc) олигонуклеотидом для CREB (5'-GCATCTCCACTCTGCTGGTT-3') (SEQ ID NO: 16), либо смысловым (Ss) олигонуклеотидом для (5'-AACCAGCAGAGTGGAGATGC-3') (SEQ ID NO: 17) (конечная концентрация 200 нМ) в течение 24 или 48 ч. Получали мРНК и общий белковый лизат и анализировали его с помощью RT-PCR и вестерн-блота соответственно, как ранее было описано в примерах 1-3.

Как показано на фиг. 7A, CRC-опухоли человека (Т) характеризовались значимо более высокими уровнями мРНК-транскриптов CREB по сравнению с уровнями в образцах окружающей опухоль ткани (Р). Подобным образом, как показано на фиг. 7B и 7C, уровень экспрессии белка CREB является значимо более высоким в CRC-опухолях человека (Т) по сравнению с таковым в образцах окружающей опухоль ткани (Р).

С целью изучения того, осуществляет ли CREB регуляцию экспрессии FMRP в линиях клеток CRC, экспрессию CREB ингибировали с применением специфического AS-олигонуклеотида. Как показано на фиг. 7D-7F, линии клеток CRC человека, обработанные антисмысловым олигонуклеотидом для CREB, характеризовались пониженным уровнем экспрессии белка CREB по сравнению с таковым в случае необработанных клеток или клеток, обработанных смысловым олигонуклеотидом в качестве контроля.

Кроме того, обработка антисмысловым олигонуклеотидом для CREB приводила к сопутствующему снижению уровня экспрессии белка FMRP. Эти данные свидетельствуют о том, что при CRC человека CREB осуществляет положительную регуляцию экспрессии FMRP.

Пример 6. Уровни FMRP влияют на миграцию и инвазию CRC.

С целью изучения роли FMRP в миграции и инвазии CRC применяли *in vitro* модели "раневой поверхности" и инвазии клеток. В этом примере описывается, что FMRP осуществляет регуляцию белков, вовлеченных в миграцию и инвазию клеток, включая следующее: Е-кадгерин, β -катенин и белок, мутировавший при раке толстой и прямой кишки (МСС), онкосупрессор, ген которого выключен за счет метилирования промотора при раке толстой и прямой кишки и, в частности, у пациентов с повышенным метастазированием в лимфатические узлы.

Уровни FMRP влияют на миграцию и инвазию клеток при CRC путем регуляции Е-кадгерина и β -катенина.

С целью изучения роли FMRP в миграции и инвазии опухолевых клеток, клетки HCT-116 высевали на каждой стороне вставки для культивирования клеток ibidi® и выращивали до конfluence, затем оставляли необработанными (U) или трансфицировали смысловым (S) олигонуклеотидом для FMRP (конечная концентрация 0,5 нМ) или антисмысловым (AS) олигонуклеотидом для FMRP (конечная концентрация 0,5 нМ). Кроме того, клетки HCT-116 высевали на вставки для культивирования клеток Transwell®, предварительно покрытые Matrigel®, и либо оставляли необработанными (U), либо трансфицировали смысловым (S) олигонуклеотидом (конечная концентрация 100 нМ) или антисмысловым (AS) олигонуклеотидом для FMRP (конечная концентрация 0,5 нМ) в течение 48 ч.

Как показано на фиг. 8А и 8В, трансфекция клеток HCT-116 антисмысловым олигонуклеотидом для FMRP обеспечивала значимое снижение процентной доли клеток, закрывающих псевдо-рану, по сравнению с необработанными клетками или клетками, трансфицированными смысловым олигонуклеотидом. На графике показана средняя процентная доля покрытой клетками области $\pm$ S.D. для 3 отдельных экспериментов.

Подобным образом, как показано на фиг. 8С и 8D, клетки HCT-116, трансфицированные антисмысловым олигонуклеотидом для FMRP, характеризовались значимо сниженной миграцией через покрытую Matrigel® вставку для культивирования клеток Transwell® по сравнению с таковой в случае необработанных клеток или клеток, трансфицированных смысловым олигонуклеотидом. На графике показано среднее число мигрирующих клеток $\pm$ S.D. для 3 независимых экспериментов.

Для определения того, регулирует ли FMRP уровни Е-кадгерина и/или β -катенина, ключевые белки, ассоциированные с клеточной адгезией, ремоделированием цитоскелета и ингибированием миграции и инвазии опухоли, клетки оставляли необработанными (U) или трансфицировали либо смысловым (S) олигонуклеотидом для FMRP (конечная концентрация 0,5 нМ), либо антисмысловым (AS) олигонуклеотидом для FMRP (конечная концентрация 0,5 нМ) в течение 48 ч.

Как показано на фиг. 8Е-8G, трансфекция клеток HCT-116 антисмысловым олигонуклеотидом для FMRP обеспечивала значимое повышение уровня экспрессии Е-кадгерина и β -катенина, по сравнению с необработанными клетками или клетками, трансфицированными смысловым олигонуклеотидом. На фиг. 8F и 8G значения выражены в относительных единицах (о.е.), и они обозначают среднее $\pm$ S.D. для 3 отдельных экспериментов.

FMRP подавляет экспрессию МСС, белка, который осуществляет регуляцию экспрессии Е-кадгерина и β -катенина.

С целью изучения того, осуществляет ли FMRP регуляцию МСС, белка, который, как известно, взаимодействует с комплексом Е-кадгерин/ β -катенин, клетки HCT-116 оставляли необработанными (U) или трансфицировали смысловым (S) олигонуклеотидом для FMRP (конечная концентрация 0,5 нМ) или антисмысловым (AS) олигонуклеотидом для FMRP (конечная концентрация 0,5 нМ) в течение 48 ч.

Как показано на фиг. 9А и 9В, клетки HCT-116, трансфицированные антисмысловым олигонуклеотидом для FMRP, характеризовались значимо повышенным уровнем экспрессии МСС, по сравнению с необработанными клетками или клетками, трансфицированными смысловым олигонуклеотидом для FMRP.

В последних исследованиях описана новая онкосупрессорная функция МСС в регуляции межклеточной адгезии, опосредованной комплексом Е-кадгерин/ β -катенин, в клетках рака толстой и прямой кишки. С целью изучения того, опосредует ли МСС наблюдаемое повышение уровня экспрессии Е-кадгерина и β -катенина в клетках HCT-116, трансфицированных антисмысловым олигонуклеотидом для FMRP (например, фиг. 8Е-8G), клетки оставляли необработанными (U) или трансфицировали смысловым олигонуклеотидом для FMRP (конечная концентрация 0,5 нМ), или антисмысловым олигонуклеотидом для FMRP (конечная концентрация 0,5 нМ), и/или siRNA в качестве контроля (контрольная siRNA), или siRNA, специфической в отношении МСС (siRNA для МСС) в течение 48 ч.

Как показано в репрезентативном вестерн-блоте (фиг. 9С) и соответствующих количественных анализах (фиг. 9D и 9Е), наличие siRNA для МСС отменяло положительную регуляцию экспрессии Е-кадгерина и β -катенин в клетках, трансфицированных антисмысловым олигонуклеотидом для FMRP от-

дельно.

Для определения того, требуется ли MCC-регуляция комплекса E-кадгерин/р-катенин также для наблюдаемого ингибирования миграции и инвазии в случае линии клеток рака толстой и прямой кишки (например, фиг. 8А и 8В), клетки НСТ-116 высевали на каждой стороне вставки для культивирования клеток ibidi и выращивали до конfluence, затем оставляли необработанными (U) или трансфицировали смысловым (S) олигонуклеотидом (конечная концентрация 0,5 нМ) или антисмысловым (AS) олигонуклеотидом (конечная концентрация 0,5 нМ) и/или контрольной siRNA или siRNA для MCC.

Как показано на фиг. 9F и 9G, наличие siRNA, специфической в отношении MCC, приводило к значимому снижению опосредованного антисмысловым олигонуклеотидом для FMRP ингибирования миграции и инвазии в случае линии клеток рака толстой и прямой кишки. В совокупности эти данные свидетельствуют о том, что FMRP осуществляет контроль межклеточной адгезии в клетках рака толстой кишки путем регуляции комплекса MCC/E-кадгерин/р-катенин.

Включение посредством ссылки

Полное раскрытие каждого из патентных документов и научных статей, цитируемых в настоящем документе, включено посредством ссылки во всех отношениях.

Эквиваленты

Настоящее раскрытие может быть воплощено в других конкретных формах без отступления от его существенных характеристик. Следовательно, вышеизложенные варианты осуществления следует рассматривать как иллюстративные, а не ограничивающие раскрытие, описанное в настоящем документе. Объем настоящего раскрытия определяется прилагаемой формулой изобретения, а не предшествующим описанием, и подразумевается, что все изменения, которые подпадают под значение и диапазон эквивалентности формулы изобретения, охватываются ею.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Олигонуклеотид для ингибирования экспрессии белка, ассоциированного с синдромом ломкой Х-хромосомы (FMRP), содержащий последовательность, выбранную из группы, состоящей из
 5'-CCACCACCAGCTCCTCCA-3' (SEQ ID NO: 1),
 5'-CTTCCACCACCAGCTCCT-3' (SEQ ID NO: 2),
 5'-TCCACCACCAGCTCCTCC-3' (SEQ ID NO: 3),
 5'-CTTCCACCACCAGCTCC-3' (SEQ ID NO: 4),
 5'-TCACCTTTATCATCCTC-3' (SEQ ID NO: 5),
 5'-TCCACCACCAGCTCCTCCAT-3' (SEQ ID NO: 6),
 5'-ACTTCCACCACCAGCTCCTC-3' (SEQ ID NO: 7),
 5'-TTCCACCACCAGCTCCTCCA-3' (SEQ ID NO: 8),
 5'-ACTTCCACCACCAGCTCCT-3' (SEQ ID NO: 9) и
 5'-CTCACCTTTATCATCCTCA-3' (SEQ ID NO: 10) или их комплементарной нити.
2. Олигонуклеотид по п.1, где олигонуклеотид содержит рибонуклеотиды, дезоксирибонуклеотиды или комбинацию рибонуклеотидов и дезоксирибонуклеотидов.
3. Олигонуклеотид по п.1, где олигонуклеотид представляет собой антисмысловый олигонуклеотид или часть siRNA, или ее фармацевтически приемлемую соль.
4. Олигонуклеотид по пп.1-3, где олигонуклеотид содержит один или несколько химически модифицированных нуклеозидов, выбранных из группы, состоящей из 5-метилцитидина, 5-метил-2'-дезоксцитидина, дезоксцитидина, 5-метил-2'-дезоксцитидин-5'-монофосфата и 5-метил-2'-дезоксцитидин-5'-монофосфотриоата, 2'-О-метилцитидина, 2'-О-метилгуанозина, 2'-О-метилтимидина, 2'-О-метилуридина, 2'-О-метиладенозина, 5-метилцитозина и 5-метилгуанина, 2'-О-(2-метоксиэтил)нуклеозидов, 2'-дезокс-2'-фторнуклеозидов и 2'-фтор-β-D-арабинонуклеозидов, мостиковых нуклеиновых кислот, запертых нуклеиновых кислот (LNA), нуклеиновых кислот с конформационно ограниченными этиловыми аналогами нуклеозидов (сЕТ), трицикло-ДНК (tcDNA), нуклеиновых кислот с 2'-О,4'-С-этиленовым мостиком (ЕНА) и пептидонуклеиновых кислот (PNA).
5. Олигонуклеотид по любому из пп.1-4, где олигонуклеотид содержит по меньшей мере одну межнауклеозидную связь, выбранную из группы, состоящей из фосфоротиоатной связи, фосфородитиоатной связи, фосфотриэфирной связи, алкилфосфонатной связи, аминоалкилфосфотриэфирной связи, алкиленфосфонатной связи, фосфинатной связи, фосфорамидатной связи, фосфоморфолидатной связи, фосфопиперазидатной связи, аминоалкилфосфорамидатной связи, тиофосфорамидатной связи, тионоалкилфосфонатной связи, тионоалкилфосфотриэфирной связи, тиофосфатной связи, селенофосфатной связи и боронофосфатной связи.
6. Олигонуклеотид по п.5, где олигонуклеотид содержит по меньшей мере одну фосфоротиоатную связь.
7. Олигонуклеотид по п.5, где все межнауклеозидные связи олигонуклеотида представляют собой фосфоротиоатные связи.
8. Олигонуклеотид по любому из пп.1-7, где олигонуклеотид способен индуцировать некроптоз.

9. Фармацевтическая композиция для ингибирования экспрессии белка, ассоциированного с синдромом ломкой X-хромосомы, содержащая: (а) олигонуклеотид по любому из пп.1-8 и (b) фармацевтически приемлемый носитель.

10. Применение олигонуклеотида по любому из пп.1-8 в изготовлении лекарственного препарата для лечения заболевания кишечника или лечения или предупреждения возникновения солидной раковой опухоли толстой и прямой кишки, инвазии раковой опухоли толстой и прямой кишки или метастазирования раковой опухоли толстой и прямой кишки.

11. Способ лечения заболевания кишечника или лечения или предупреждения возникновения солидной раковой опухоли толстой и прямой кишки, инвазии раковой опухоли толстой и прямой кишки или метастазирования раковой опухоли толстой и прямой кишки у нуждающегося в этом пациента, предусматривающий введение пациенту олигонуклеотида по любому из пп.1-8 или фармацевтической композиции по п.9.

12. Способ лечения заболевания кишечника или лечения или предупреждения возникновения солидной раковой опухоли толстой и прямой кишки, инвазии раковой опухоли толстой и прямой кишки или метастазирования раковой опухоли толстой и прямой кишки у нуждающегося в этом пациента, предусматривающий введение пациенту антисмыслового олигонуклеотида или siRNA, которая ингибирует экспрессию белка, ассоциированного с синдромом ломкой X-хромосомы (FMRP), где антисмысловый олигонуклеотид или siRNA содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из

5'-CCACCACCAGCTCCTCCA-3' (SEQ ID NO: 1),

5'-CTTCCACCACCAGCTCCT-3' (SEQ ID NO: 2),

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

5'-CTTCCACCACCAGCTCC-3' (SEQ ID NO: 4),

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

5'-TCCACCACCAGCTCCTCCAT-3' (SEQ ID NO: 6),

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

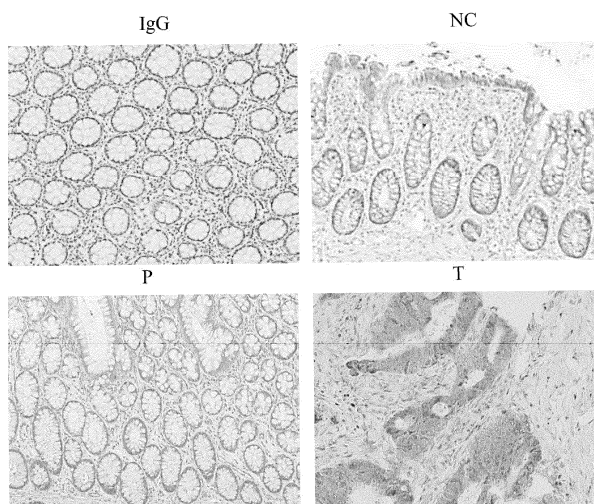
5'-TTCCACCACCAGCTCCTCCA-3' (SEQ ID NO: 8),

5'-ACTTCCACCACCAGCTCCT-3' (SEQ ID NO: 9) и

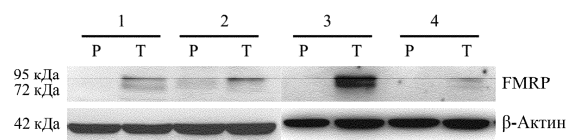
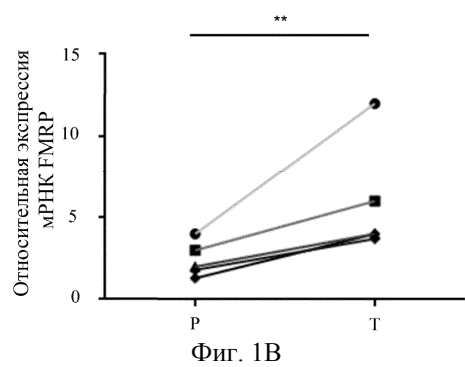
5'-CTCACCTTTATCATCCTCA-3' (SEQ ID NO: 10) или их комплементарной нити.

13. Применение по п.10 или способ по любому из пп.11-12, в котором заболевание кишечника представляет собой рак толстой и прямой кишки или воспалительное заболевание кишечника; воспалительное заболевание кишечника представляет собой болезнь Крона или язвенный колит и/или опухоль представляет собой раковую опухоль толстой и прямой кишки.

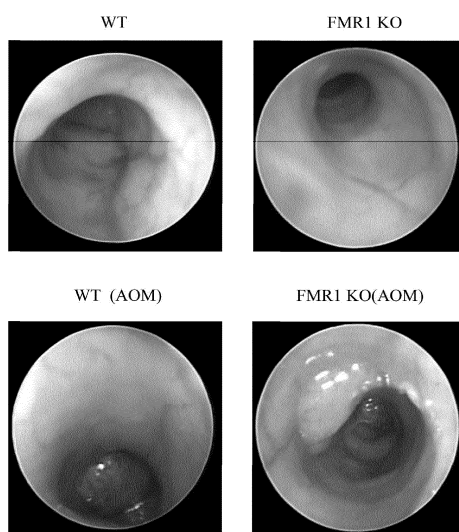
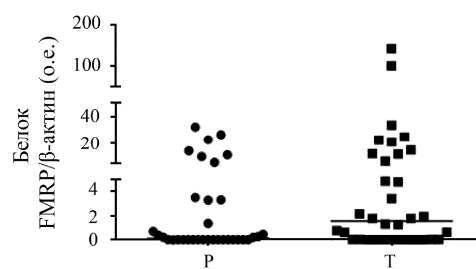
14. Способ по пп.11-13, где олигонуклеотид вводят пациенту перорально, сублингвально, желудочно, ректально, внутривенно, внутриопухолево, в тощую кишку в подвздошную кишку, в толстую кишку или в прямую кишку.



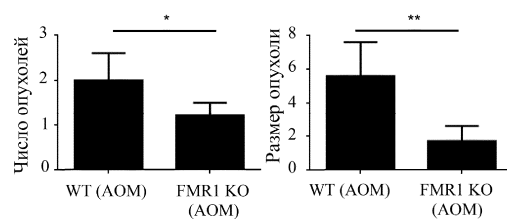
Фиг. 1А



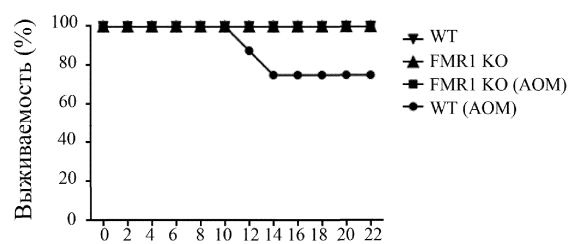
Фиг. 1С



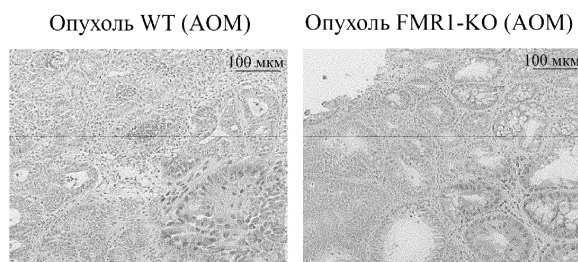
Фиг. 2А



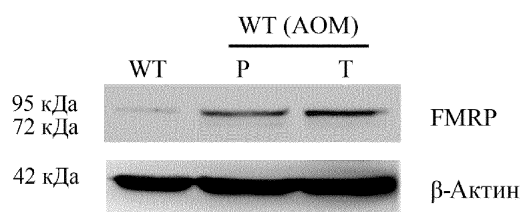
Фиг. 2В



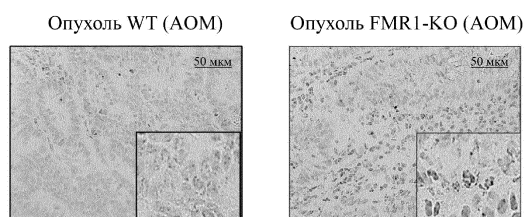
Фиг. 2С



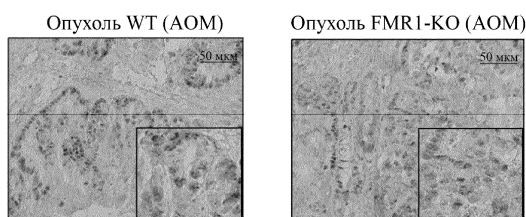
Фиг. 2D



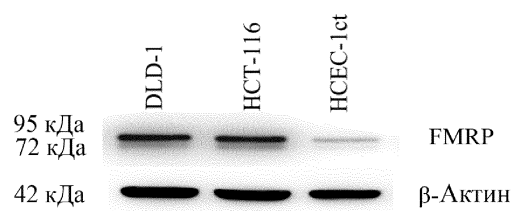
Фиг. 2Е



Фиг. 2F

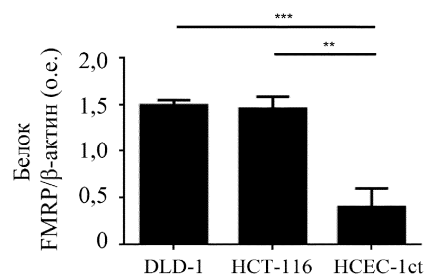


Фиг. 2G

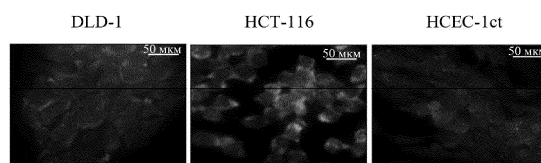


Фиг. 3А

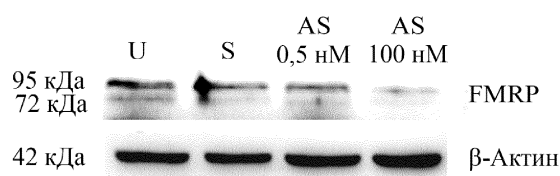
045399



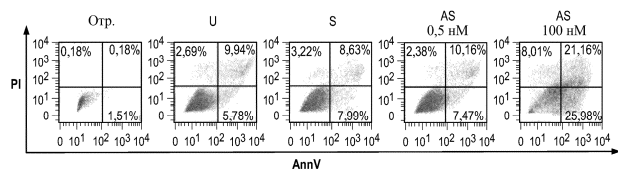
Фиг. 3В



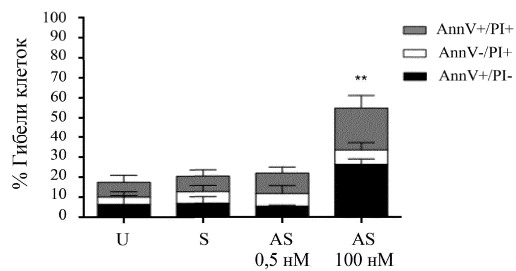
Фиг. 3С



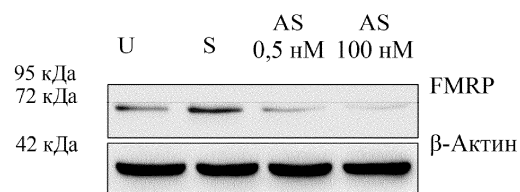
Фиг. 3D



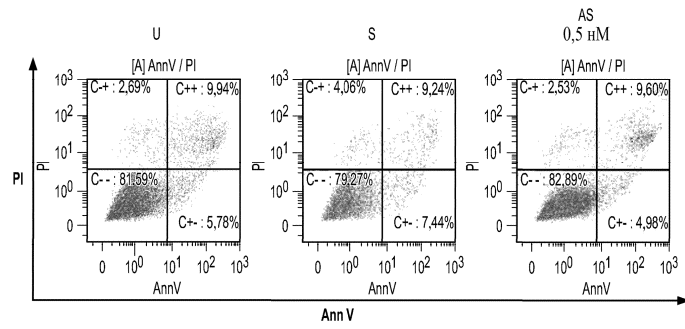
Фиг. 3Е



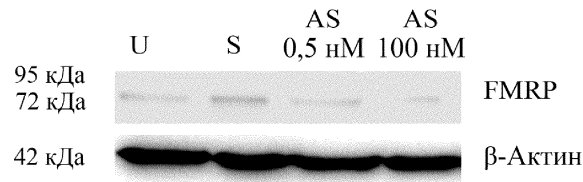
Фиг. 3F



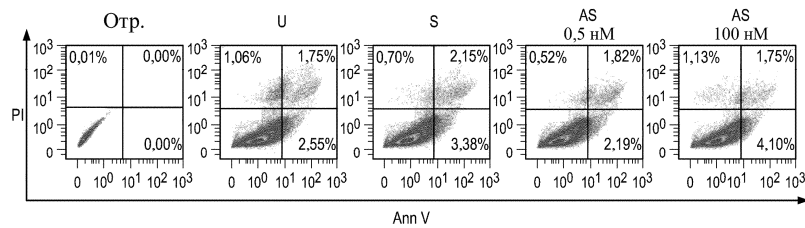
Фиг. 3G



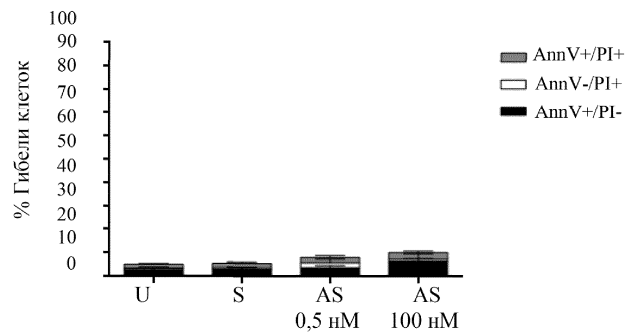
Фиг. 3Н



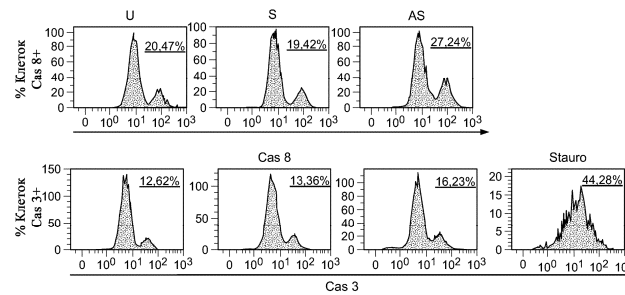
Фиг. 3И



Фиг. 3J

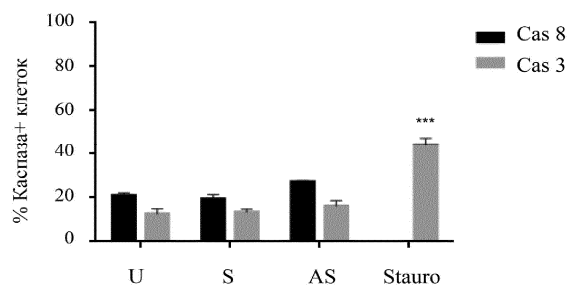


Фиг. 3К

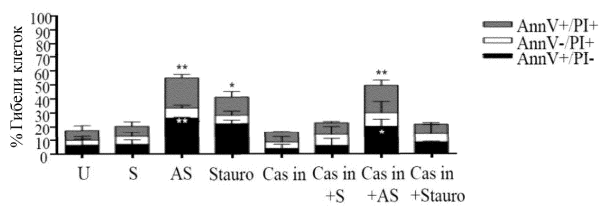


Фиг. 4А

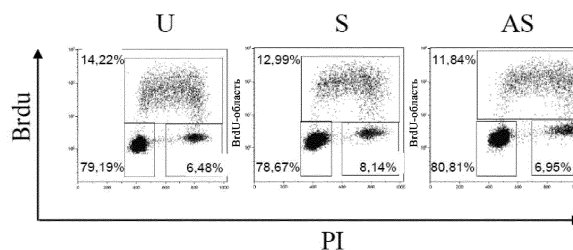
045399



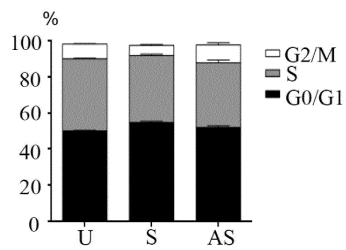
Фиг. 4В



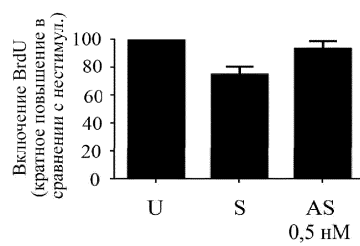
Фиг. 4С



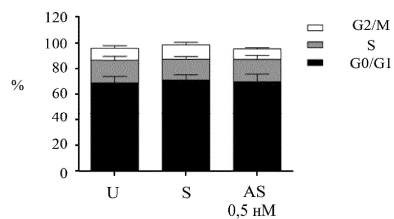
Фиг. 4D



Фиг. 4Е

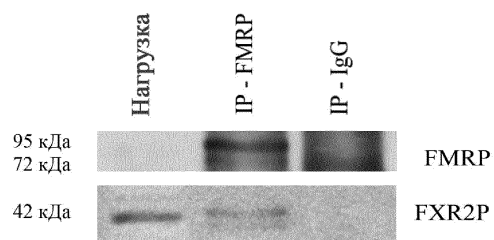


Фиг. 4F

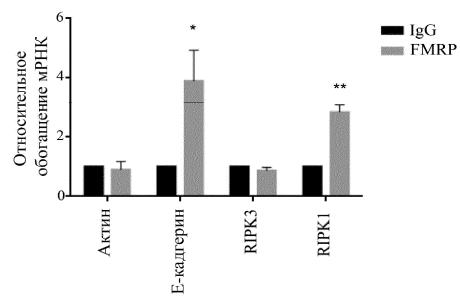


Фиг. 4G

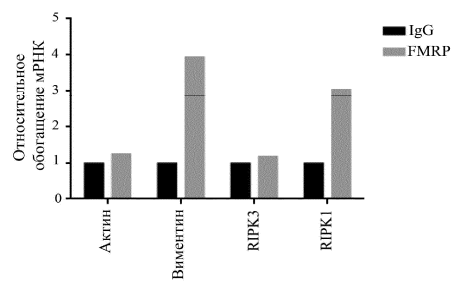
045399



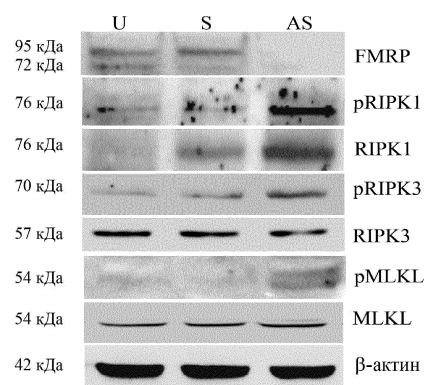
Фиг. 5А



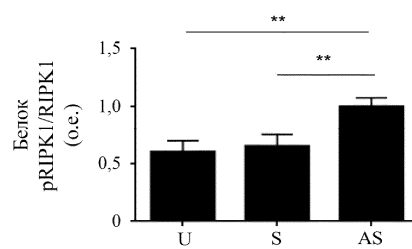
Фиг. 5В



Фиг. 5С

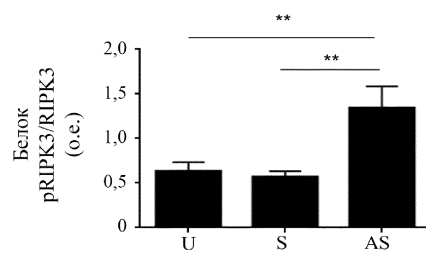


Фиг. 6А

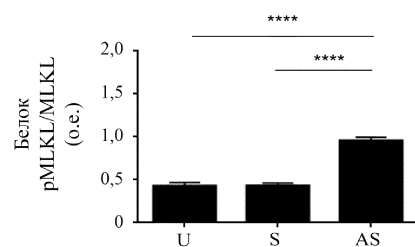


Фиг. 6В

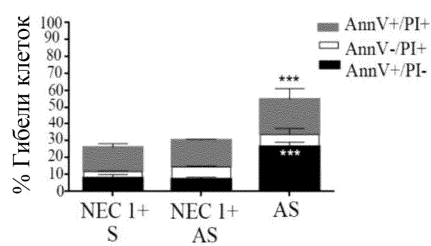
045399



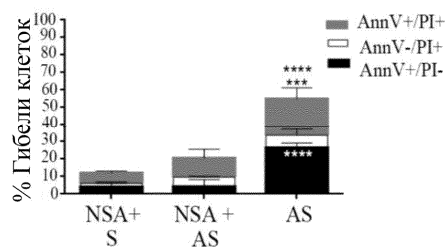
Фиг. 6C



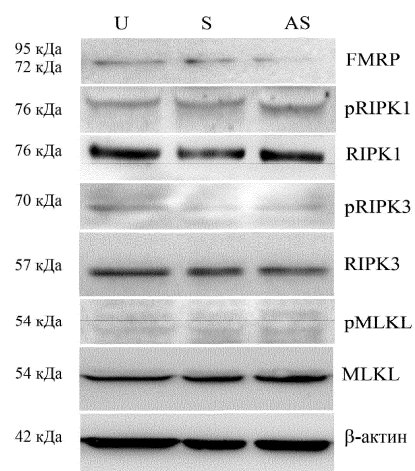
Фиг. 6D



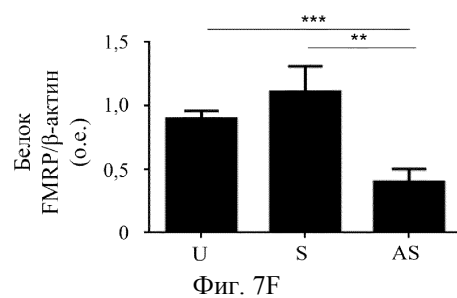
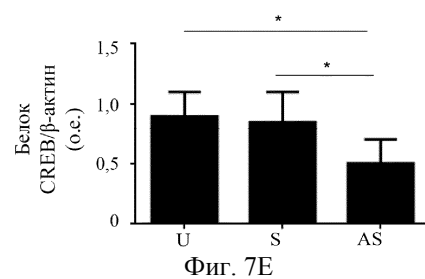
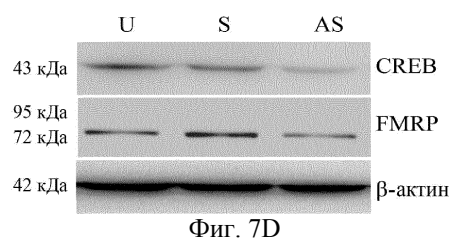
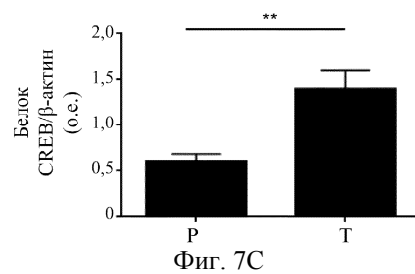
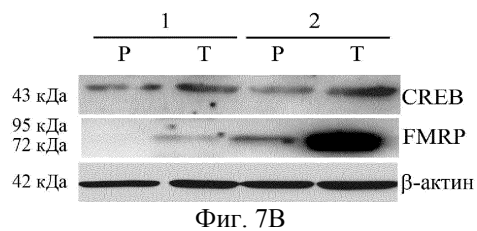
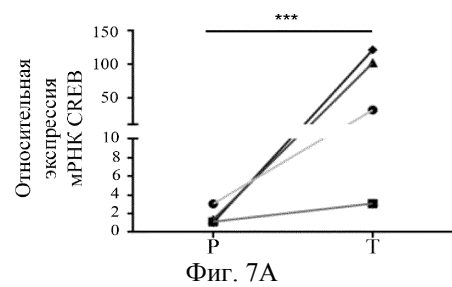
Фиг. 6E

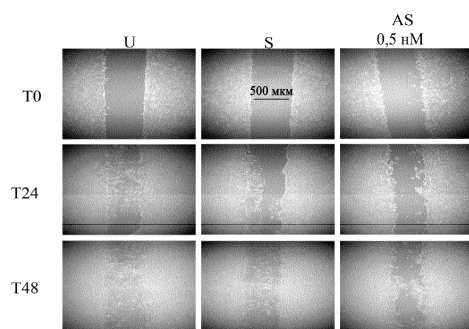


Фиг. 6F

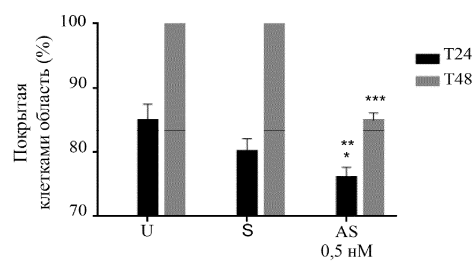


Фиг. 6G

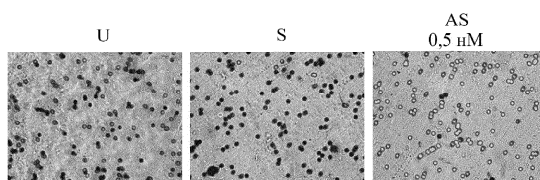




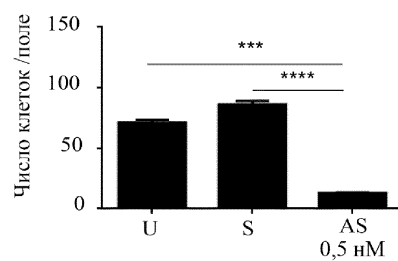
Фиг. 8А



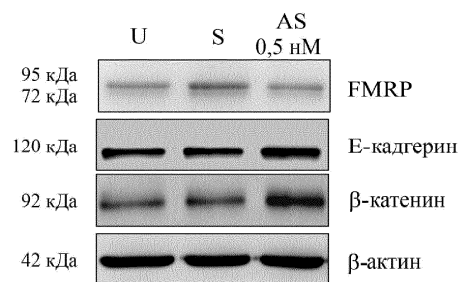
Фиг. 8В



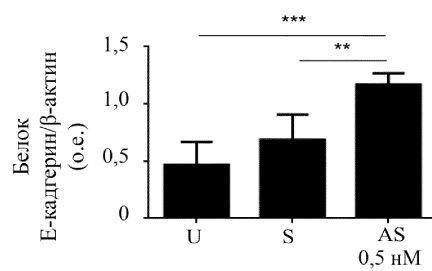
Фиг. 8С



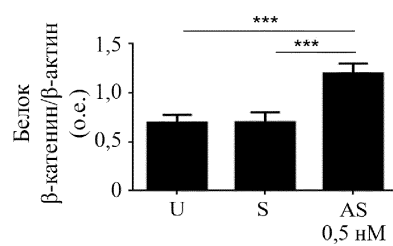
Фиг. 8D



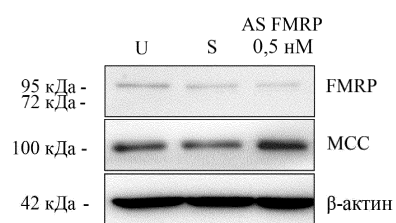
Фиг. 8Е



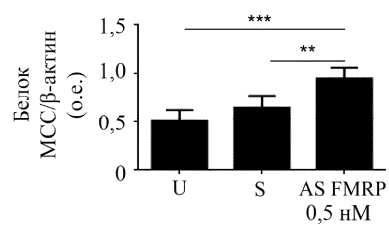
Фиг. 8F



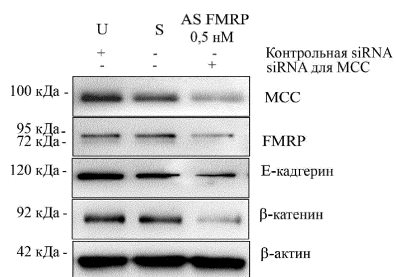
Фиг. 8G



Фиг. 9A

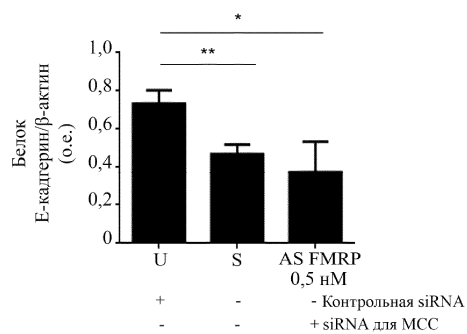


Фиг. 9B

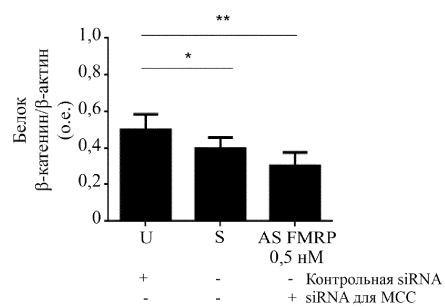


Фиг. 9C

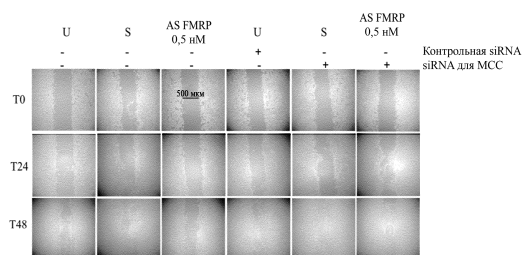
045399



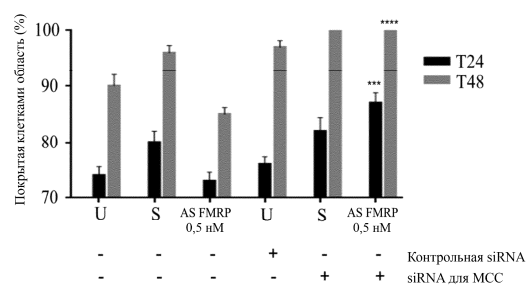
Фиг. 9D



Фиг. 9E



Фиг. 9F



Фиг. 9G

