

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202291338 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.01.18

(22) Дата подачи заявки
2020.11.16

(51) Int. Cl. *C12N 15/113* (2010.01)
A61K 31/7115 (2006.01)
A61K 31/7125 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)

(54) АНТИСМЫСЛОВЫЕ СРЕДСТВА ПРОТИВ IL-34 И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 62/935,819

(32) 2019.11.15

(33) US

(86) PCT/EP2020/082281

(87) WO 2021/094616 2021.05.20

(71) Заявитель:
НОГРА ФАРМА ЛИМИТЕД (IE)

(72) Изобретатель:

Вити Франческа (CH), Макналти
Мари (IE), Беллинвиа Сальваторе
(CH)

(74) Представитель:

Гизатуллин Ш.Ф., Угрюмов В.М.,
Гизатуллина Е.М., Строкова О.В.,
Джермакян Р.В. (RU)

(57) Изобретение относится к ингибиторам IL-34, включающим последовательности антисмысловых олигонуклеотидов IL-34, и к способам лечения воспалительных заболеваний, таких как воспалительное заболевание кишечника и/или фиброз, ассоциированных с повышенной активностью или экспрессией IL-34. Настоящее изобретение также относится к фармацевтическим композициям, содержащим ингибитор IL-34, например антисмысловой олигонуклеотид IL-34, применимый для лечения воспалительных заболеваний и/или фиброза и изготовления лекарственных средств, содержащих раскрытый ингибитор IL-34, для применения в лечении воспалительных заболеваний и/или фиброза.

A1

202291338

202291338

A1

АНТИСМЫСЛОВЫЕ СРЕДСТВА ПРОТИВ IL-34 И СПОСОБЫ ИХ
ПРИМЕНЕНИЯ
ОПИСАНИЕ

Ссылка на родственные заявки

[0001] Согласно настоящей заявке испрашивается преимущество и приоритет в соответствии с предварительной заявкой на выдачу патента США № 62/935819, поданной 15 ноября 2019, полное содержание которой, таким образом, включено в настоящий документ посредством ссылки для всех целей.

Список последовательностей

[0002] Настоящая заявка содержит список последовательностей, который был подан в электронной форме в формате ASCII и полное содержание которого, таким образом, включено в настоящий документ посредством ссылки. Указанная копия ASCII, созданная 13 ноября 2020 г., названа GIU-060WO_SL_ST25.txt и имеет размер 21080 байт.

Предшествующий уровень техники настоящего изобретения

[0003] Интерлейкин-34 (IL-34) представляет собой недавно открытый цитокин, функционально перекрывающийся с макрофагальным колониестимулирующим фактором (M-CSF, также известным как MCSF1 и MCSF-1), медиатор воспаления и остеокластогенеза в дегенеративных заболеваниях кости, таких как ревматоидный артрит. Воспалительные заболевания, как острые, так и хронические, представляют собой важную категорию заболеваний, которая еще не полностью понята.

[0004] Например, воспалительное заболевание кишечника представляет собой хроническое воспалительное нарушение желудочно-кишечного тракта, которым страдают приблизительно 1,4 миллионов пациентов в Соединенных Штатах. Оно представляет собой одну из пяти наиболее преобладающих нагрузок желудочно-кишечных заболеваний в Соединенных Штатах, с общими затратами на здравоохранение более 1,7 миллиардов \$. Каждый год в Соединенных Штатах воспалительное заболевание кишечника насчитывает более чем 700000 осмотров терапевта, 100000 госпитализаций и инвалидность у 119000 пациентов. В настоящее время не существует медицинского излечения, таким образом, управление течением заболевания требует медицинской помощи на протяжении жизни.

[0005] Двумя наиболее распространенными формами воспалительного заболевания кишечника являются болезнь Крона и язвенный колит. Несмотря на то, что 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 не полностью понятна, хотя как факторы внешней среды, так и генетические факторы считают играющими роль в заболевании. Компоненты внешней среды могут включать изменения в флоре кишечника, на которые влияет воздействие употребляемых внутрь пищевых продуктов и лекарственных средств.

[0006] Воспалительное заболевание кишечника ассоциировано с болью в области живота, рвотой, диареей, ректальным кровотечением, тяжелыми коликами, мышечными спазмами, потерей массы, недостаточностью питания, лихорадкой и анемией. Пациенты с воспалительным заболеванием кишечника могут также страдать кожными повреждениями, болью в суставах, воспалением глаза и повреждениями печени, и дети, страдающие язвенным колитом, могут страдать дефектами роста. Несмотря на то, что они редко бывают летальными, эти симптомы снижают качество жизни пациентов.

[0007] Таким образом, существует настоятельная необходимость в разработке надежных способов лечения воспалительных нарушений, таких как воспалительное заболевание кишечника. Существует дополнительная необходимость в идентификации способов лечения, которые обеспечивают эффективное и постоянное облегчение симптомов у широкого спектра пациентов и которые не ассоциированы с отрицательными побочными эффектами или циклами воспаления и ремиссии.

Краткое раскрытие настоящего изобретения

[0008] Настоящее изобретение относится к средствам, например, антисмысловым олигонуклеотидам IL-34, которые ингибируют экспрессию гена IL-34. Согласно некоторым вариантам осуществления, настоящее изобретение относится к антисмысловому олигонуклеотиду IL-34 или его фармацевтически приемлемой соли, включающим антисмысловую олигонуклеотидную последовательность из любой из SEQ ID NO:1-8, раскрытых в настоящем документе. Например, антисмысловой олигонуклеотид IL-34 по изобретению может представлять собой антисмысловой олигонуклеотид, включающий последовательность: 5'-CTCACCAGACCCACAG-3' (SEQ ID NO:1), в которой по меньшей мере один нуклеозид представляет собой химически модифицированный нуклеозид, и/или по меньшей мере одна связь представляет собой модифицированную межнуклеозидную связь; 5'-GGCTTTGGCCGCACCAGCT-3' (SEQ ID NO:2), в которой по меньшей мере один нуклеозид представляет собой химически модифицированный нуклеозид, и/или по

меньшей мере одна связь представляет собой модифицированную межнуклеозидную связь; 5'-CTTTGGGCCGCACCAGCTTC-3' (SEQ ID NO:3), в которой по меньшей мере один нуклеозид представляет собой химически модифицированный нуклеозид, и/или по меньшей мере одна связь представляет собой модифицированную межнуклеозидную связь; 5'-TGGGCCGCACCAGCTTCAGG-3' (SEQ ID NO:4), в которой по меньшей мере один нуклеозид представляет собой химически модифицированный нуклеозид, и/или по меньшей мере одна связь представляет собой модифицированную межнуклеозидную связь; 5'-TCCATGACCCGGAAGCAGTT-3' (SEQ ID NO:5), в которой по меньшей мере один нуклеозид представляет собой химически модифицированный нуклеозид, и/или по меньшей мере одна связь представляет собой модифицированную межнуклеозидную связь; или 5'-TGTTTCATGTACTGAAG-3' (SEQ ID NO:6), в которой по меньшей мере один нуклеозид представляет собой химически модифицированный нуклеозид, и/или по меньшей мере одна связь представляет собой модифицированную межнуклеозидную связь, или его фармацевтически приемлемую соль. Согласно некоторым вариантам осуществления, антисмысловой олигонуклеотид содержит последовательность из SEQ ID NO:3, в которой по меньшей мере один нуклеозид представляет собой химически модифицированный нуклеотид, и/или по меньшей мере одна связь представляет собой модифицированную межнуклеозидную связь. Согласно некоторым вариантам осуществления, антисмысловой олигонуклеотид содержит последовательность из SEQ ID NO:3, в которой по меньшей мере один цитидин является химически модифицированным. Согласно некоторым вариантам осуществления, антисмысловой олигонуклеотид содержит последовательность 5'-CTTTGGGCXGCACCAGCTTC-3' (SEQ ID NO:7), в которой X представляет собой 5-метилцитидин. Согласно некоторым вариантам осуществления, антисмысловой олигонуклеотид содержит последовательность из SEQ ID NO:5, в которой по меньшей мере один цитидин является химически модифицированным; необязательно, в которой цитидин в положении 10 из SEQ ID NO:5 является химически модифицированным, и нуклеотидная последовательность представляет собой 5'-TCCATGACCXGGAAGCAGTT-3' (SEQ ID NO:8), и в которой X представляет собой 5-метилцитидин.

[0009] Согласно некоторым вариантам осуществления, антисмысловой олигонуклеотид, раскрытый в настоящем документе, может включать рибонуклеотиды и/или дезоксирибонуклеотиды. Например, согласно некоторым вариантам осуществления, раскрытым в настоящем документе, антисмысловой олигонуклеотид IL-34, например, антисмысловой олигонуклеотид IL-34 из любой из SEQ ID NO:1-8, может включать один или несколько рибонуклеотидов. Согласно некоторым вариантам осуществления,

раскрытым в настоящем документе, антисмысловой олигонуклеотид IL-34, например, антисмысловой олигонуклеотид IL-34 из любой из SEQ ID NO:1-8, может включать один или несколько дезоксирибонуклеотидов. Согласно некоторым вариантам осуществления, раскрытым в настоящем документе, антисмысловой олигонуклеотид IL-34 может включать смесь рибонуклеотидов и дезоксирибонуклеотидов.

[0010] Согласно некоторым вариантам осуществления, раскрытым в настоящем документе, антисмысловой олигонуклеотид IL-34 может включать один или несколько нуклеотидов запертой нуклеиновой кислоты («LNA»). Антисмысловой олигонуклеотид IL-34, раскрытый в настоящем документе, например, антисмысловой олигонуклеотид IL-34 из любой из SEQ ID NO:1-8, может включать один или несколько LNA-нуклеотидов, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 1-5, 5-10, 5-12 или более LNA-нуклеотидов. Согласно некоторым вариантам осуществления, каждый из нуклеотидов антисмыслового олигонуклеотида IL-34, раскрытого в настоящем документе, представляет собой LNA-нуклеотид.

[0011] Согласно конкретным вариантам осуществления, антисмысловой олигонуклеотид IL-34 включает LNA-нуклеотиды, и последовательность антисмыслового олигонуклеотида IL-34 выбрана из одной из следующих:

- 5'-cttTGGGCXGCACCAGCttc-3' (SEQ ID NO:9), в которой с представляет собой LNA-цитидин, t представляет собой LNA-тимидин, и X представляет собой 5-метилцитидин;

- 5'-ctttGGGCXGCACCAGcttc-3' (SEQ ID NO:10), в которой с представляет собой LNA-цитидин, t представляет собой LNA-тимидин, и X представляет собой 5-метилцитидин;

- 5'-cttTGGGCcgCACCAGCttc-3' (SEQ ID NO:11), в которой с представляет собой LNA-цитидин, t представляет собой LNA-тимидин, и g представляет собой LNA-гуанозин;

- 5'-cttTGGGCcGCACCAGCttc-3' (SEQ ID NO:12), в которой с представляет собой LNA-цитидин, и t представляет собой LNA-тимидин;

- 5'-ggcXGCACCAGCttc-3' (SEQ ID NO:13), в которой с представляет собой LNA-цитидин, t представляет собой LNA-тимидин, g представляет собой LNA-гуанозин, и X представляет собой 5-метилцитидин;

- 5'-cttTGGGCXGCACcag-3' (SEQ ID NO:14), в которой с представляет собой LNA-цитидин, t представляет собой LNA-тимидин, g представляет собой LNA-гуанозин, a представляет собой LNA-аденозин, и X представляет собой 5-метилцитидин; и

• 5'-tgaCCXGGAAGCAgtt-3' (SEQ ID NO:15), в которой а представляет собой LNA-аденозин, t представляет собой LNA-тимидин, g представляет собой LNA-гуанозин, и X представляет собой 5-метилцитидин,

или их фармацевтически приемлемой соли.

[0012] Кроме того, согласно вариантам осуществления, раскрытым в настоящем документе, антисмысловые олигонуклеотиды IL-34 могут включать химически модифицированные нуклеозиды, например, 2'-O-метил- («2'-ОМе-») рибонуклеозиды, например, 2'-O-метилцитидин, 2'-O-метилгуанозин, 2'-O-метилтимидин, 2'-O-метилуридин и/или 2'-O-метиладенозин. Антисмысловые олигонуклеотиды IL-34, раскрытые в настоящем документе, могут также включать одно или несколько химически модифицированных оснований, включая 5-метилпиримидин, например, 5-метилцитозин; и/или 5-метилпурин, например, 5-метилгуанин. Антисмысловые олигонуклеотиды IL-34, раскрытые в настоящем документе, могут также включать любой из следующих химически модифицированных нуклеозидов: 5-метил-2'-O-метилцитидин, 5-метил-2'-O-метилтимидин, 5-метилцитидин, 5-метилуридин и/или 5-метил-2'-дезоксцитидин. Кроме того, антисмысловые олигонуклеотиды IL-34, раскрытые в настоящем документе, могут включать один или несколько 2'-O-(2-метоксиэтил)- («2'-МОЕ-») нуклеозидов, 2'-дезоксидов, 2'-фтор-нуклеозидов, 2'-фтор-β-D-арабинонуклеозидов, соединенных мостиком нуклеиновых кислот, LNA-нуклеотидов, конформационно затрудненных этилом (сЕТ) нуклеиновых кислот, трицикло-ДНК (tcDNA), соединенных 2'-O,4'-C-этиленовым мостиком нуклеиновых кислот (ЕНА) и/или пептидных нуклеиновых кислот (PNA). Варианты осуществления, раскрытые в настоящем документе, включают антисмысловые олигонуклеотиды IL-34 из любой из SEQ ID NO:1-15, или их фармацевтически приемлемую соль, включающие один или несколько из любых из вышеупомянутых химически модифицированных нуклеозидов. Согласно некоторым вариантам осуществления, по меньшей мере один нуклеозид из последовательности антисмыслового олигонуклеотида IL-34 представляет собой химически модифицированный нуклеозид. 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 нуклеозидов из последовательности антисмыслового олигонуклеотида IL-34 представляют собой химически модифицированные нуклеозиды.

[0013] Согласно конкретным вариантам осуществления, антисмысловой олигонуклеотид IL-34, раскрытый в настоящем документе, включает 2'-МОЕ-нуклеозиды. Согласно некоторым вариантам осуществления, последовательность антисмыслового олигонуклеотида IL-34 выбрана из одной из следующих:

- 5'-C_xT_xT_xG_xGGCXGCACCAG_xC_xT_xT_xC_x-3' (SEQ ID NO:16), в которой C_x представляет собой 2'-O-(2-метоксиэтил)цитидин, T_x представляет собой 2'-O-(2-метоксиэтил)тимидин, G_x представляет собой 2'-O-(2-метоксиэтил)гуанозин, и X представляет собой 5-метилцитидин;

- 5'-T_xC_xC_xA_xT_xGACCXGGAAGC_xA_xG_xT_xT_x-3' (SEQ ID NO:17), в которой C_x представляет собой 2'-O-(2-метоксиэтил)цитидин, T_x представляет собой 2'-O-(2-метоксиэтил)тимидин, G_x представляет собой 2'-O-(2-метоксиэтил)гуанозин, A_x представляет собой 2'-O-(2-метоксиэтил)аденозин, и X представляет собой 5-метилцитидин;

- 5'-C_xT_xT_xG_xG_xGCXGCACC A_xG_xC_xT_xT_xC_x-3' (SEQ ID NO:18), в которой C_x представляет собой 2'-O-(2-метоксиэтил)цитидин, T_x представляет собой 2'-O-(2-метоксиэтил)тимидин, G_x представляет собой 2'-O-(2-метоксиэтил)гуанозин, A_x представляет собой 2'-O-(2-метоксиэтил)аденозин, и X представляет собой 5-метилцитидин;

- 5'-T_xC_xC_xA_xT_xG_xACCXGGAAG_xC_xA_xG_xT_xT_x-3' (SEQ ID NO:19), в которой C_x представляет собой 2'-O-(2-метоксиэтил)цитидин, T_x представляет собой 2'-O-(2-метоксиэтил)тимидин, G_x представляет собой 2'-O-(2-метоксиэтил)гуанозин, A_x представляет собой 2'-O-(2-метоксиэтил)аденозин, и X представляет собой 5-метилцитидин;

- 5'-C_xT_xT_xG_xG_xG_xC_xXG_xC_xA_xC_xC_xA_xG_xC_xT_xT_xC_x-3' (SEQ ID NO:20), в которой C_x представляет собой 2'-O-(2-метоксиэтил)цитидин, T_x представляет собой 2'-O-(2-метоксиэтил)тимидин, G_x представляет собой 2'-O-(2-метоксиэтил)гуанозин, A_x представляет собой 2'-O-(2-метоксиэтил)аденозин, и X представляет собой 5-метилцитидин; и

- 5'-T_xC_xC_xA_xT_xG_xA_xC_xC_xXG_xG_xA_xA_xG_xC_xA_xG_xT_xT_x-3' (SEQ ID NO:21), в которой C_x представляет собой 2'-O-(2-метоксиэтил)цитидин, T_x представляет собой 2'-O-(2-метоксиэтил)тимидин, G_x представляет собой 2'-O-(2-метоксиэтил)гуанозин, A_x представляет собой 2'-O-(2-метоксиэтил)аденозин, и X представляет собой 5-метилцитидин,

или их фармацевтически приемлемой соли.

[0014] Кроме того, согласно некоторым вариантам осуществления, антисмысловой олигонуклеотид IL-34, раскрытый в настоящем документе, включает 2'-ОМе-нуклеозиды. Согласно некоторым вариантам осуществления, последовательность антисмыслового олигонуклеотида IL-34 выбрана из одной из следующих:

- 5'-CyTyTyTyGyGGCXGCACCAGyCyTyTyCy-3' (SEQ ID NO:22), в которой Cy представляет собой 2'-*O*-метилцитидин, Tu представляет собой 2'-*O*-метилтимидин, Gu представляет собой 2'-*O*-метилгуанозин, и X представляет собой 5-метилцитидин; и

- 5'-TyCyCyAuTyGACCXGGAAGCyAuGyTyTy-3' (SEQ ID NO:23), в которой Cy представляет собой 2'-*O*-метилцитидин, Tu представляет собой 2'-*O*-метилтимидин, Gu представляет собой 2'-*O*-метилгуанозин, Au представляет собой 2'-*O*-метиладенозин, и X представляет собой 5-метилцитидин,

или их фармацевтически приемлемой соли.

[0015] Согласно некоторым вариантам осуществления, антисмысловой олигонуклеотид IL-34, раскрытый в настоящем документе, включает одну или несколько модифицированных межнуклеозидных связей. Например, согласно некоторым вариантам осуществления, антисмысловой олигонуклеотид IL-34 представляет собой антисмысловой олигонуклеотид, в котором по меньшей мере одна межнуклеозидная связь из последовательности представляет собой фосфоротиаатную связь, фосфородитиоатную связь, фосфотриэфирную связь, алкилфосфонатную связь, аминокилфосфотриэфирную связь, алкиленфосфонатную связь, фосфинатную связь, фосфорамидатную связь и аминокилфосфорамидатную связь, тиофосфорамидатную связь, тионоалкилфосфонатную связь, тионоалкилфосфотриэфирную связь, тиофосфатную связь, селенофосфатную связь или боранофосфатную связь. Согласно конкретным вариантам осуществления, по меньшей мере одна межнуклеозидная связь из последовательности антисмыслового олигонуклеотида IL-34 представляет собой фосфоротиаатную 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 из последовательности антисмыслового олигонуклеотида IL-34 представляют собой фосфоротиаатные связи. Согласно некоторым вариантам осуществления, все из межнуклеозидных связей из последовательности антисмыслового олигонуклеотида представляют собой фосфоротиаатные связи.

[0016] Количество нуклеотидов, включенных в антисмысловые олигонуклеотиды IL-34, раскрытые в настоящем документе, можно менять. Например, согласно некоторым вариантам осуществления, антисмысловой олигонуклеотид имеет длину от 15 до 20, 15-25, 15-30, 15-35, 20-25, 20-30, 20-35, 25-30, 25-35 или 30-35 нуклеотидов. Согласно конкретным вариантам осуществления, антисмысловой олигонуклеотид имеет длину от 15 до 25 нуклеотидов. Согласно конкретным вариантам осуществления, антисмысловой олигонуклеотид имеет длину от 20 до 25 нуклеотидов. Согласно некоторым вариантам

осуществления, антисмысловой олигонуклеотид имеет длину 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34 или 35 нуклеотидов. Согласно некоторым вариантам осуществления, антисмысловой олигонуклеотид, раскрытый в настоящем документе, включает максимальное количество нуклеотидов. Согласно некоторым вариантам осуществления, антисмысловой олигонуклеотид IL-34 имеет длину не более, чем 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30 или 35 нуклеотидов.

[0017] Согласно одному варианту осуществления, настоящее изобретение относится к соединению, содержащему антисмысловой олигонуклеотид из любой из SEQ ID NO:1-23, или его фармацевтически приемлемую соль. Например, согласно некоторым вариантам осуществления, соединение содержит антисмысловой олигонуклеотид из SEQ ID NO:3, в котором по меньшей мере один цитидин является химически модифицированным. Согласно некоторым вариантам осуществления, соединение содержит антисмысловой олигонуклеотид из SEQ ID NO:7, в котором X представляет собой 5-метилцитидин.

[0018] Согласно вариантам осуществления, раскрытым в настоящем документе, нуклеозид антисмыслового олигонуклеотида IL-34, например, антисмыслового олигонуклеотида IL-34 из любой из SEQ ID NO:1-15, или его фармацевтически приемлемой соли, может быть замещен химически модифицированным нуклеозидом. Например, согласно некоторым вариантам осуществления, один или несколько остатков цитидина антисмыслового олигонуклеотида IL-34 заменены на 5-метилцитидин. Согласно некоторым вариантам осуществления, антисмысловой олигонуклеотид может включать один или несколько модифицированных нуклеотидов, например, 5-метил-2'-дезоксцитидин. Например, согласно различным вариантам осуществления, антисмысловой олигонуклеотид IL-34 по настоящему описанию включает или может включать нуклеотиды, включающие дезоксцитидин и/или 5-метил-2'-дезоксцитидин, включая, но без ограничения, 5-метил-2'-дезоксцитидин-5'-монофосфат и 5-метил-2'-дезоксцитидин-5'-монофосфотиоат. Например, согласно вариантам осуществления, раскрытым в настоящем документе, каждый один или несколько цитидиновых нуклеозидов антисмыслового олигонуклеотида IL-34 из любой из SEQ ID NO:1-15, или его фармацевтически приемлемой соли, может быть замещен 5-метилцитидином. В некоторых конкретных вариантах осуществления, один цитидиновый нуклеозид антисмыслового олигонуклеотида IL-34, раскрытого в настоящем документе, замещен 5-метилцитидином.

[0019] Настоящее изобретение также относится к способам лечения, в которых антисмысловой олигонуклеотид IL-34 вводят нуждающемуся в этом пациенту. Например,

настоящее изобретение относится к способам лечения воспалительного заболевания, предусматривающим введение нуждающемуся в этом пациенту эффективного количества антисмыслового олигонуклеотида IL-34, раскрытого в настоящем документе, например, антисмыслового олигонуклеотида IL-34 из любой из SEQ ID NO:1-23. Настоящее изобретение также относится к способу ингибирования продукции воспалительного цитокина в клетках пациента, страдающего воспалительным заболеванием, предусматривающему введение эффективного количества антисмыслового олигонуклеотида IL-34, раскрытого в настоящем документе, например, антисмыслового олигонуклеотида IL-34 из любой из SEQ ID NO:1-15.

[0020] Настоящее изобретение также относится к способу уменьшения или ингибирования опосредованного IL-34 воспалительного ответа в клетке или клетках пациента, страдающего воспалительным заболеванием, предусматривающему введение эффективного количества антисмыслового олигонуклеотида IL-34, например, антисмыслового олигонуклеотида IL-34 из любой из SEQ ID NO:1-15. Настоящее изобретение также относится к способу лечения воспалительного заболевания, ассоциированного с измененной экспрессией IL-34, у нуждающегося в этом пациента, предусматривающему введение эффективного количества антисмыслового олигонуклеотида IL-34. Например, настоящее изобретение относится к способу лечения воспалительного заболевания, ассоциированного с увеличенной экспрессией IL-34, у нуждающегося в этом пациента, предусматривающему введение эффективного количества антисмыслового олигонуклеотида IL-34 из любой из SEQ ID NO:1-23 или его фармацевтически приемлемой соли. Увеличенная экспрессия IL-34 может присутствовать относительно контрольного уровня экспрессии IL-34, например, среднего или медианного уровня IL-34, измеренного у здорового контрольного пациента или в когорте здоровых контрольных пациентов, или уровня IL-34, измеренного у пациента до начала или детекции заболевания, ассоциированного с увеличенной экспрессией IL-34.

[0021] Настоящее изобретение также относится к способу лечения воспалительного заболевания, ассоциированного с измененной экспрессией IL-34, у нуждающегося в этом пациента, предусматривающему введение эффективного количества антисмыслового олигонуклеотида IL-34 или его фармацевтически приемлемой соли, например, антисмыслового олигонуклеотида IL-34 из любой из SEQ ID NO:1-23.

[0022] Настоящее изобретение также относится к способу ингибирования опосредованной IL-34 передачи сигналов рецептора макрофагального колониестимулирующего фактора (M-CSFR-1) в клетках пациента, страдающего воспалительным заболеванием, предусматривающему введение эффективного количества

антисмыслового олигонуклеотида IL-34 или его фармацевтически приемлемой соли, например, антисмыслового олигонуклеотида IL-34 из любой из SEQ ID NO:1-23.

[0023] Настоящее изобретение также относится к способу уменьшения или уничтожения фиброзной стриктуры у пациента, страдающего воспалительным заболеванием, предусматривающему введение эффективного количества антисмыслового олигонуклеотида IL-34, или его фармацевтически приемлемой соли, например, антисмыслового олигонуклеотида IL-34 из любой из SEQ ID NO:1-23. Согласно некоторым вариантам осуществления, фиброзная стриктура локализована в кишечнике, например, в толстом кишечнике или в тонком кишечнике. Согласно конкретным вариантам осуществления, фиброзная стриктура локализована в толстом кишечнике. Согласно некоторым вариантам осуществления, фиброзная стриктура локализована в одной или нескольких частях толстого и/или тонкого кишечника, например, слепой кишке, подвздошной кишке, восходящей толстой кишке, поперечной толстой кишке, нисходящей толстой кишке, сигмовидной толстой кишке, прямой кишке, анусе, двенадцатиперстной кишке и/или тощей кишке.

[0024] Способы, раскрытые в настоящем документе, можно использовать для лечения одного или нескольких воспалительных заболеваний, включая, но без ограничения, воспалительное заболевание кишечника, ревматоидный артрит, псориаз, остеоартрит, диабет (типа I и II), отторжение ткани или органа, рассеянный склероз, воспаление пародонта, периодонтит, пигментный виллезнодулярный синовит, гепатит, синусит, рак толстого кишечника, колоректальный рак, ассоциированный с колитом рак толстого кишечника, спорадический колоректальный рак, болезнь коронарных артерий, синдром Шегрена (SS), ожирение, хроническое воспаление, легочный саркоидоз, кожные повреждения, воспалительное заболевание ЦНС и аутоиммунное заболевание. Согласно некоторым вариантам осуществления, способы по изобретению можно использовать для лечения астмы, хронического обструктивного заболевания легких (COPD) или идиопатического легочного фиброза (IPF). Согласно некоторым вариантам осуществления, воспалительное заболевание представляет собой воспалительное заболевание кишечника. Согласно некоторым вариантам осуществления, воспалительное заболевание кишечника представляет собой болезнь Крона, болезнь Крона желудка и двенадцатиперстной кишки, (гранулематозный) колит Крона, воспалительную болезнь Крона, фиброзно-стриктурирующую болезнь Крона, язвенный колит, коллагенозный колит, лимфоцитарный колит, ишемический колит, диверсионный колит, болезнь Бехчета, микроскопический колит, язвенный проктит, проктосигмоидит, еуноилеит, левосторонний колит, панколит, илеоколит, илеит или неуточненный колит. Согласно

конкретным вариантам осуществления, воспалительное заболевание кишечника представляет собой воспалительную болезнь Крона или фиброзно-стриктурирующую болезнь Крона.

[0025] Согласно некоторым вариантам осуществления, антисмысловой олигонуклеотид IL-34 или его фармацевтически приемлемую соль вводят местно, парентерально, перорально, внутривенно, интратрахеально, интраназально, чрескожно или интрадуоденально. В конкретном варианте осуществления, антисмысловой олигонуклеотид IL-34 или его фармацевтически приемлемую соль вводят перорально.

[0026] Согласно некоторым вариантам осуществления, пациент, нуждающийся в лечении, представляет собой человека.

[0027] Настоящее изобретение также относится к фармацевтически приемлемой композиции, содержащей антисмысловой олигонуклеотид IL-34, раскрытый в настоящем документе, например, антисмысловой олигонуклеотид IL-34 или его фармацевтически приемлемую соль из любой из SEQ ID NO:1-23, и фармацевтически приемлемый наполнитель. Согласно некоторым вариантам осуществления, фармацевтическая композиция является пригодной для местного, парентерального, перорального, внутривенного, интратрахеального, интраназального, чрескожного или интрадуоденального введения.

[0028] Настоящее изобретение также относится к антисмысловому олигонуклеотиду IL-34 для применения в качестве лекарственного средства. Например, антисмысловой олигонуклеотид IL-34 из любой из SEQ ID NO:1-23 может быть предназначен для применения в качестве лекарственного средства.

[0029] Настоящее изобретение также относится к применению антисмыслового олигонуклеотида IL-34, например, антисмыслового олигонуклеотида IL-34 из любой из SEQ ID NO:1-23, в изготовлении лекарственного средства для лечения воспалительного заболевания. Согласно некоторым вариантам осуществления, воспалительное заболевание представляет собой воспалительное заболевание кишечника, ревматоидный артрит, псориаз, остеоартрит, диабет (типа I и II), отторжение ткани или органа, рассеянный склероз, воспаление пародонта, периодонтит, пигментный виллезнодулярный синовит, гепатит, синусит, рак толстого кишечника, колоректальный рак, ассоциированный с колитом рак толстого кишечника, спорадический колоректальный рак, болезнь коронарных артерий, синдром Шегрена (SS), ожирение, хроническое воспаление, легочный саркоидоз, кожные повреждения, воспалительное заболевание ЦНС, или аутоиммунное заболевание. Настоящее изобретение также относится к применению антисмыслового олигонуклеотида IL-34 в изготовлении лекарственного средства для

лечения астмы, хронического обструктивного заболевания легких (COPD) или идиопатического легочного фиброза (IPF). Согласно некоторым вариантам осуществления, воспалительное заболевание представляет собой воспалительное заболевание кишечника. Согласно некоторым вариантам осуществления, воспалительное заболевание кишечника представляет собой болезнь Крона, воспалительную болезнь Крона, фиброзно-стриктурирующую болезнь Крона, болезнь Крона желудка и двенадцатиперстной кишки, (гранулематозный) колит Крона, язвенный колит, коллагенозный колит, лимфоцитарный колит, ишемический колит, диверсионный колит, болезнь Бехчета, микроскопический колит, язвенный проктит, проктосигмоидит, еюноилеит, левосторонний колит, панколит, илеоколит, илеит или неуточненный колит. Согласно некоторым вариантам осуществления, воспалительное заболевание кишечника представляет собой воспалительную болезнь Крона или фиброзно-стриктурирующую болезнь Крона.

[0030] Настоящее изобретение также относится к антисмысловому олигонуклеотиду IL-34, например, антисмысловому олигонуклеотиду IL-34 из любой из SEQ ID NO:1-23, для применения в лечении воспалительного заболевания. Согласно некоторым вариантам осуществления, воспалительное заболевание представляет собой воспалительное заболевание кишечника, ревматоидный артрит, псориаз, остеоартрит, диабет (типа I и II), отторжение ткани или органа, рассеянный склероз, воспаление пародонта, периодонтит, пигментный виллезнодулярный синовит, гепатит, синусит, рак толстого кишечника, колоректальный рак, ассоциированный с колитом рак толстого кишечника, спорадический колоректальный рак, болезнь коронарных артерий, синдром Шегрена (SS), ожирение, хроническое воспаление, легочный саркоидоз, кожные повреждения, воспалительное заболевание ЦНС или аутоиммунное заболевание. Настоящее изобретение также относится к антисмысловому олигонуклеотиду IL-34 для применения в лечении астмы, хронического обструктивного заболевания легких (COPD), или идиопатического легочного фиброза (IPF). Согласно некоторым вариантам осуществления, воспалительное заболевание представляет собой воспалительное заболевание кишечника. Согласно некоторым вариантам осуществления, воспалительное заболевание кишечника представляет собой болезнь Крона, воспалительную болезнь Крона, фиброзно-стриктурирующую болезнь Крона, болезнь Крона желудка и двенадцатиперстной кишки, (гранулематозный) колит Крона, язвенный колит, коллагенозный колит, лимфоцитарный колит, ишемический колит, диверсионный колит, болезнь Бехчета, микроскопический колит, язвенный проктит, проктосигмоидит, еюноилеит, левосторонний колит, панколит, илеоколит, илеит или неуточненный колит.

Согласно некоторым вариантам осуществления, воспалительное заболевание кишечника представляет собой воспалительную болезнь Крона или фиброзно-стриктурирующую болезнь Крона.

[0031] Настоящее изобретение также относится к способу ингибирования экспрессии IL-34 в клетке субъекта, предусматривающий введение субъекту фармацевтически эффективного количества фармацевтического препарата, включающего антисмысловой олигонуклеотид IL-34 или его фармацевтически приемлемую соль, например, антисмысловой олигонуклеотид из любой из SEQ ID NO:1-23. Настоящее изобретение также относится к способу ингибирования экспрессии одного или нескольких коллагенов в клетке субъекта, предусматривающему введение субъекту фармацевтически эффективного количества фармацевтического препарата, содержащего антисмысловой олигонуклеотид IL-34 или его фармацевтически приемлемую соль, например, антисмысловой олигонуклеотид из любой из SEQ ID NO:1-23. Согласно некоторым вариантам осуществления вышеупомянутых способов, клетка представляет собой клетку кишечника, например, стромальную клетку кишечника, эпителиальную клетку кишечника, стволовую клетку кишечника, секреторную клетку, энтероцит, бокаловидную клетку, энтероэндокринную клетку, клетку Панета, транзиторную амплифицирующуюся клетку, микроскладчатую клетку, чашеобразную клетку или пучковую клетку. Согласно некоторым вариантам осуществления, клетка формирует часть кишечной фиброзной стриктуры. Согласно вышеупомянутым вариантам осуществления, субъект может представлять собой субъекта, нуждающегося в лечении воспалительного заболевания или фиброза, например, воспалительную болезнь Крона или фиброзно-стриктурирующую болезнь Крона. Согласно некоторым вариантам осуществления, способы, раскрытые в настоящем документе, можно использовать для ингибирования экспрессии одного или нескольких коллагенов в клетке субъекта, например, коллагена типа I, коллагена типа II, коллагена типа III, коллагена типа IV, коллагена типа V, коллагена типа VI, коллагена типа VII, коллагена типа VIII, коллагена типа IX, коллагена типа X, коллагена типа XI, коллагена типа XII, коллагена типа XIII, коллагена типа XIV, коллагена типа XV, коллагена типа XVI, коллагена типа XVII, коллагена типа XVIII, коллагена типа XIX, коллагена типа XX, коллагена типа XXI, коллагена типа XXII, коллагена типа XXIII, коллагена типа XXIV, коллагена типа XXV, коллагена типа XXVI, коллагена типа XXVII, коллагена типа XXVIII или коллагена типа XXIX. Например, согласно вариантам осуществления, раскрытым в настоящем документе, коллаген представляет собой COL1A1, COL1A2II, COL2A1, COL3A1, COL4A1, COL4A2, COL4A3, COL4A4, COL4A5, COL4A6, COL5A1, COL5A2, COL5A3, COL6A1, COL6A2, COL6A3, COL6A5, COL7A1,

COL8A1, COL8A2, COL9A1, COL9A2, COL9A3, COL10A1, COL11A1, COL11A2, COL12A1, COL13A1, COL14A1, COL15A1, COL16A1, COL17A1, COL18A1, COL19A1, COL20A1, COL21A1, COL22A1, COL23A1, COL24A1, COL25A1, EMID2, COL27A1, COL28A1 или COL29A1. Согласно конкретным вариантам осуществления, коллаген представляет собой COL1A1 (коллаген 1A), COL3A1 (коллаген 3A) или их смесь. Согласно конкретным вариантам осуществления, фармацевтический препарат можно вводить перорально. Согласно конкретным вариантам осуществления, субъект представляет собой человека.

[0032] Согласно различным вариантам осуществления, настоящее изобретение относится к способу лечения или предотвращения фиброза, например, кишечного фиброза, легочного фиброза или фиброза печени, или предотвращения отложения коллагена, предусматривающему ингибирование IL-34 у пациента, страдающего фиброзом. Настоящее изобретение также может относиться к способу лечения или предотвращения фиброза, или предотвращения отложения коллагена, предусматривающему ингибирование IL-34 в клетке, например, клетке кишечника. Согласно некоторым вариантам осуществления, настоящее изобретение может относиться к способу лечения или предотвращения фиброза, или предотвращения отложения коллагена у пациента, предусматривающему введение пациенту эффективного количества специфического ингибитора IL-34, например, антисмыслового олигонуклеотида IL-34, например, антисмыслового олигонуклеотида IL-34, включающего нуклеотидную последовательность из любой из SEQ ID NO:1-23, или его фармацевтически приемлемой соли.

[0033] Настоящее изобретение также относится к применению антисмыслового олигонуклеотида IL-34 в изготовлении лекарственного средства для лечения фиброза. Согласно некоторым вариантам осуществления, фиброз представляет собой кишечный фиброз. Согласно некоторым вариантам осуществления, фиброз представляет собой легочный фиброз. Согласно другим вариантам осуществления, фиброз представляет собой почечный фиброз, сердечный фиброз, эндомикардиальный фиброз, миелофиброз, ретроперитонеальный фиброз или нефрогенный системный фиброз.

[0034] Настоящее изобретение также относится к антисмысловому олигонуклеотиду IL-34 для применения в лечении фиброза. Согласно некоторым вариантам осуществления, фиброз представляет собой кишечный фиброз. Согласно некоторым вариантам осуществления, фиброз представляет собой легочный фиброз. Согласно другим вариантам осуществления, фиброз представляет собой почечный

фиброз, сердечный фиброз, эндомикардиальный фиброз, миелофиброз, ретроперитонеальный фиброз или нефрогенный системный фиброз.

[0035] Согласно некоторым вариантам осуществления, пациент, страдающий фиброзом, например, кишечным фиброзом, ранее страдал воспалительным заболеванием кишечника или страдает воспалительным заболеванием кишечника, или воспалительное заболевание кишечника предшествовало кишечному фиброзу у пациента. Согласно некоторым вариантам осуществления, воспалительное заболевание кишечника представляет собой воспалительную болезнь Крона или фиброзно-стриктурирующую болезнь Крона.

[0036] Согласно некоторым вариантам осуществления, пациент, страдающий кишечным фиброзом, ранее страдал колитом или страдает колитом, или колит предшествовал кишечному фиброзу у пациента. Согласно некоторым вариантам осуществления, колит представляет собой острый колит. Согласно некоторым вариантам осуществления, колит представляет собой хронический колит.

[0037] Согласно некоторым вариантам осуществления изобретения пациент представляет собой млекопитающее, например, примата, например, человека.

[0038] Понятно, что антисмысловой олигонуклеотид IL-34, вводимый пациенту с фиброзом в способах по изобретению, раскрытых в настоящем документе, можно вводить посредством различных способов введения. Согласно различным вариантам осуществления, антисмысловой олигонуклеотид IL-34 можно вводить посредством одного или нескольких способов, включая пероральный, местный, парентеральный, например, посредством подкожной инъекции, посредством спрея для ингаляции или ректально. Термин парентеральный, в рамках изобретения, включает подкожные инъекции, интрапанкреатическое введение, и способы внутривенной, внутримышечной, внутривентрикулярной и интратеральной инъекции или инфузии. Согласно предпочтительному варианту осуществления, антисмысловой олигонуклеотид IL-34 можно вводить перорально пациенту с фиброзом, например, кишечным фиброзом или легочным фиброзом.

[0039] Настоящее изобретение может относиться к способам, предусматривающим введение антисмыслового олигонуклеотида IL-34, способного к нацеливанию на РНК IL-34 для деградации, создания помех для сплайсинга РНК или предотвращения экспрессии гена или трансляции белка IL-34. Антисмысловые олигонуклеотиды IL-34 по изобретению могут нацеливаться для связывания на различные области мРНК IL-34 мыши и/или человека. Последовательность мРНК IL-34 человека представляет собой последовательность из эталонной последовательности в NCBI: NM_001172771.1 (SEQ ID

NO:24), NM_001172772.1 (SEQ ID NO:25) или NM_152456.2 (SEQ ID NO:26). Последовательность мРНК IL-34 мыши представляет собой последовательность из эталонной последовательности в NCBI: NM_001135100.2 (SEQ ID NO:27) или NM_029646.3 (SEQ ID NO:28).

[0040] Последовательность антисмыслового олигонуклеотида IL-34 может быть выбрана из множества последовательностей, способных к нацеливанию на РНК IL-34. Согласно некоторым вариантам осуществления изобретения, антисмысловой олигонуклеотид представляет собой фосфоротиоатный антисмысловой олигонуклеотид, т.е., олигонуклеотид, в котором по меньшей мере некоторые из межнуклеотидных связей представляют собой фосфоротиоатные связи, пригодный для доставки в клетки пациента. Кроме того, антисмысловые олигонуклеотиды по изобретению могут включать модифицированные нуклеотиды, например, нуклеотиды, содержащие модифицированные основания, например, 5-метил-2'-дезоксцитидин.

[0041] Согласно некоторым вариантам осуществления изобретения, способ лечения фиброза, например, кишечного фиброза, предотвращения кишечного фиброза или легочного фиброза, или предотвращения отложения коллагена у пациента предусматривает введение фармацевтической композиции, например, фармацевтической композиции, содержащей специфический ингибитор IL-34, например, антисмысловой олигонуклеотид IL-34, и фармацевтически приемлемый наполнитель. Согласно некоторым вариантам осуществления, фармацевтическую композицию вводят парентерально. Согласно некоторым вариантам осуществления, фармацевтическую композицию вводят перорально. Согласно некоторым вариантам осуществления, фармацевтическая композиция включает кишечнорастворимое покрытие, например, кишечнорастворимое покрытие, содержащее сополимер этилакрилата-метакриловой кислоты.

[0042] Согласно вариантам осуществления изобретения, способы лечения и/или предотвращения воспалительного заболевания (например, воспалительной болезни Крона или фиброзно-стриктурирующей болезни Крона), лечения, уменьшения и/или уничтожения фиброзных стриктур у пациента (например, у пациента, страдающего фиброзно-стриктурирующей болезнью Крона), лечения фиброза (например, кишечного фиброза или легочного фиброза), предотвращения фиброза (например, кишечного фиброза или легочного фиброза), или лечения, облегчения или предотвращения отложения коллагена у пациента, предусматривают введение различных количеств антисмыслового олигонуклеотида IL-34 или его фармацевтически приемлемой соли, или фармацевтической композиции, содержащей антисмысловой олигонуклеотид IL-34,

например, антисмысловой олигонуклеотид IL-34, включающий последовательность из одной из SEQ ID NO:1-23, или его фармацевтически приемлемую соль. Согласно некоторым вариантам осуществления, способы по изобретению предусматривают введение 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 или по меньшей мере 100 мкг антисмыслового олигонуклеотида. Согласно некоторым вариантам осуществления, способы по изобретению предусматривают введение от 35 мг до 500 мг, от 1 мг до 10 мг, от 10 мг до 20 мг, от 20 мг до 30 мг, от 30 мг до 40 мг, от 40 мг до 50 мг, от 50 мг до 60 мг, от 60 мг до 70 мг, от 70 мг до 80 мг, от 80 мг до 90 мг, от 90 мг до 100 мг, от 100 мг до 150 мг, от 150 мг до 200 мг, от 200 мг до 250 мг, от 250 мг до 300 мг, от 300 мг до 350 мг, от 350 мг до 400 мг, от 400 мг до 450 мг, от 450 мг до 500 мг, от 500 мг до 600 мг, от 600 мг до 700 мг, от 700 мг до 800 мг, от 800 мг до 900 мг, от 900 мг до 1 г, от 1 мг до 50 мг, от 20 мг до 40 мг или от 1 мг до 500 мг антисмыслового олигонуклеотида IL-34 или фармацевтической композиции, содержащей антисмысловой олигонуклеотид IL-34.

[0043] Настоящее изобретение относится также к способу предотвращения или лечения фиброза печени, легочного фиброза или кишечного фиброза, предусматривающему введение нуждающемуся в этом пациенту фармацевтического препарата, содержащего ингибитор IL-34, например, антисмысловой олигонуклеотид IL-34, такой как антисмысловой олигонуклеотид IL-34, раскрытый в настоящем документе. Настоящее изобретение относится также к способам предотвращения или лечения почечного фиброза, сердечного фиброза, эндомикардиального фиброза, идиопатического легочного фиброза, миелофиброза, ретроперитонеального фиброза и/или нефрогенного системного фиброза, предусматривающим введение нуждающемуся в этом пациенту фармацевтического препарата, содержащего антисмысловой олигонуклеотид IL-34, такой как антисмысловой олигонуклеотид IL-34, раскрытый в настоящем документе.

[0044] Настоящее изобретение относится также к ингибиторам IL-34 на основе нуклеотидов, которые включают, но без ограничения, короткошпилечные РНК (кшРНК) IL-34, малые интерферирующие РНК (миРНК) IL-34 и морфолиновые олигомеры IL-34, микроРНК (мкРНК) IL-34, и композиции, включающие такие соединения. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор IL-34, раскрытый в настоящем документе, может включать нуклеотидную последовательность из любой из SEQ ID NO:1-23, или ее фармацевтически приемлемую соль. Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор IL-34, раскрытый в настоящем документе, может включать

нуклеотидную последовательность из любой из SEQ ID NO:1-8 или ее фармацевтически приемлемую соль. Например, ингибиторы IL-34 включают короткошпичечные РНК IL-34, малые интерферирующие РНК IL-34, микроРНК IL-34 и морфолиновые олигомеры IL-34, включающие нуклеотидную последовательность из любой из SEQ ID NO:1-23, например, нуклеотидную последовательность из любой из SEQ ID NO:1-8, и композиции, включающие такие соединения, например, композиции, включающие фармацевтически приемлемый наполнитель.

[0045] Согласно конкретным вариантам осуществления, раскрытым в настоящем документе, ингибитор IL-34 представляет собой миРНК IL-34, включающую нуклеотидную последовательность из любой из SEQ ID NO:1-23, например, нуклеотидную последовательность из любой из SEQ ID NO:1-8 или ее фармацевтически приемлемую соль. Например, миРНК IL-34 по изобретению может представлять собой миРНК, включающую последовательность: 5'-CTCACCAAGACCCACAG-3' (SEQ ID NO:1); 5'-GGCTTTGGGCCGACACAGCT-3' (SEQ ID NO:2); 5'-CTTTGGGCCGACACAGCTTC-3' (SEQ ID NO:3); 5'-TGGGCCGACACAGCTTCAGG-3' (SEQ ID NO:4); 5'-TCCATGACCCGGAAGCAGTT-3' (SEQ ID NO:5); 5'-TGTTTCATGTACTGAAG-3' (SEQ ID NO:6); 5'-CTTTGGGCXGCACACAGCTTC-3' (SEQ ID NO:7), в которой X представляет собой 5-метилцитидин; или 5'-TCCATGACCCXGGAAGCAGTT-3' (SEQ ID NO:8), в которой X представляет собой 5-метилцитидин, или фармацевтически приемлемую соль миРНК IL-34 из одной из SEQ ID NO:1-8.

[0046] Настоящее изобретение относится также к фармацевтически приемлемым композициям, включающим миРНК IL-34 из любой из SEQ ID NO:1-23, например, миРНК из нуклеотидной последовательности из любой из SEQ ID NO:1-8, или ее фармацевтически приемлемую соль, и фармацевтически приемлемый наполнитель.

[0047] Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор IL-34, раскрытый в настоящем документе, например, миРНК IL-34, раскрытая в настоящем документе, включает одну или несколько модифицированных межнуклеозидных связей. Например, согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор IL-34 представляет собой миРНК IL-34, в которой по меньшей мере одна межнуклеозидная связь из последовательности представляет собой фосфотриэфирную связь, фосфоритиоатную связь, фосфотриэфирную связь, алкилфосфонатную связь, аминоклфосфотриэфирную связь, алкиленфосфонатную связь, фосфинатную связь, фосфорамидатную связь и аминоклфосфорамидатную связь, тиофосфорамидатную связь, тиоалкилфосфонатную связь, тиоалкилфосфотриэфирную связь, тиофосфатную

связь, селенофосфатную связь или боранофосфатную связь. Согласно конкретным вариантам осуществления, по меньшей мере одна межнуклеозидная связь из последовательности ингибитора IL-34 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 из последовательности ингибитора IL-34 представляют собой фосфоротиоатные связи. Согласно некоторым вариантам осуществления, все из межнуклеозидных связей из последовательности ингибитора IL-34 представляют собой фосфоротиоатные связи.

[0048] Количество нуклеотидов, включенных в ингибиторы IL-34, раскрытые в настоящем документе, можно менять. Например, согласно некоторым вариантам осуществления, миРНК IL-34 имеет длину от 20 до 25, 20-30 или 25-30 нуклеотидов. Согласно некоторым вариантам осуществления, миРНК IL-34 имеет длину 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30 нуклеотидов. Согласно некоторым вариантам осуществления миРНК IL-34, раскрытая в настоящем документе, включает максимальное количество нуклеотидов. Согласно некоторым вариантам осуществления, миРНК IL-34 имеет длину не более, чем 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30 нуклеотидов.

[0049] Согласно вариантам осуществления, раскрытым в настоящем документе, нуклеозид ингибитора IL-34, например, миРНК IL-34 из любой из SEQ ID NO:1-23, например, миРНК IL-34 из нуклеотидной последовательности из любой из SEQ ID NO:1-8, может быть замещен химически модифицированным нуклеозидом. Например, согласно некоторым вариантам осуществления, один или несколько остатков цитидина миРНК IL-34 заменены на 5-метилцитидин. Согласно некоторым вариантам осуществления, миРНК IL-34 может включать один или несколько модифицированных нуклеотидов, например, 5-метил-2'-дезоксцитидин. Например, согласно различным вариантам осуществления, миРНК IL-34 по настоящему описанию включает или может включать нуклеотиды, включая дезоксцитидин и/или 5-метил-2'-дезоксцитидин, включая, но без ограничения, 5-метил-2'-дезоксцитидин-5'-монофосфат и 5-метил-2'-дезоксцитидин-5'-монофосфоротиоат. Например, согласно вариантам осуществления, раскрытым в настоящем документе, каждый один или несколько цитидиновых нуклеозидов миРНК IL-34 из любой из SEQ ID NO:1-23 или ее фармацевтически приемлемой соли, может быть замещен 5-метилцитидином.

[0050] Кроме того, согласно вариантам осуществления, раскрытым в настоящем документе, ингибиторы IL-34, например, миРНК IL-34, раскрытые в настоящем документе, могут включать химически модифицированные нуклеозиды, например, 2'-O-

метил («2'-ОМе-») рибонуклеозиды, например, 2'-*O*-метилцитидин, 2'-*O*-метилгуанозин, 2'-*O*-метилтимидин, 2'-*O*-метилюридин и/или 2'-*O*-метиладенозин. Ингибиторы IL-34, раскрытые в настоящем документе, могут также включать одно или несколько химически модифицированных оснований, включая 5-метилпиримидин, например, 5-метилцитозин, и/или 5-метилпурин, например, 5-метилгуанин. Ингибиторы IL-34, раскрытые в настоящем документе, могут также включать любой из следующих химически модифицированных нуклеозидов: 5-метил-2'-*O*-метилцитидин, 5-метил-2'-*O*-метилтимидин, 5-метилцитидин, 5-метилюридин и/или 5-метил-2'-дезокситидин. Кроме того, ингибиторы IL-34, раскрытые в настоящем документе, могут включать один или несколько 2'-*O*-(2-метоксиэтил) («2'-МОЕ-») нуклеозидов, 2'-дезоксид-2'-фтор-нуклеозидов, 2'-фтор-β-D-арабинонуклеозидов, соединенных мостиком нуклеиновых кислот, LNA-нуклеотидов, конформационно затрудненных этилом (сЕТ) нуклеиновых кислот, трицикло-ДНК (tcDNA), соединенных 2'-*O*,4'-*C*-этиленовым мостиком нуклеиновых кислот (ЕНА), и/или пептидных нуклеиновых кислот (PNA). Варианты осуществления, раскрытые в настоящем документе, включают ингибиторы IL-34 из любой из SEQ ID NO:1-23, или их фармацевтически приемлемую соль, включающие один или несколько из любых из вышеупомянутых химически модифицированных нуклеозидов. Согласно конкретным вариантам осуществления, миРНК IL-34 или ее фармацевтически приемлемая соль включает последовательность из любой из SEQ ID NO:1-23, модифицированную для включения одного или нескольких из любых из вышеупомянутых химически модифицированных нуклеозидов.

[0051] Согласно некоторым вариантам осуществления, настоящее изобретение относится к способу лечения воспалительного заболевания, к способу ингибирования продукции воспалительного цитокина в клетках пациента, страдающего воспалительным заболеванием, к способу уменьшения или ингибирования опосредованного IL-34 воспалительного ответа в одной или нескольких клетках пациента, страдающего воспалительным заболеванием, к способу лечения воспалительного заболевания, ассоциированного с измененной экспрессией IL-34, у нуждающегося в этом пациента, к способу ингибирования опосредованной IL-34 передачи сигналов M-CSFR-1 в одной или нескольких клетках пациента, страдающего воспалительным заболеванием, к способу предотвращения или лечения фиброза, к способу предотвращения или лечения кишечного фиброза, и/или к способу уменьшения или уничтожения фиброзной стриктуры у пациента, страдающего воспалительным заболеванием, предусматривающему введение ингибитора IL-34, раскрытого в настоящем документе, например, миРНК IL-34. Вышеупомянутые способы могут предусматривать стадию введения нуждающемуся в этом пациенту

эффективного количества ингибитора IL-34 (например, короткошпилечной РНК IL-34, малой интерферирующей РНК IL-34, микроРНК IL-34 или морфолинового олигомера IL-34 из SEQ ID NO:1-23, например, любой одной из SEQ ID NO:1-8, или композиции, включающей такой ингибитор IL-34) или его фармацевтически приемлемой соли. Например, вышеупомянутые способы могут предусматривать стадию введения нуждающемуся в этом пациенту эффективного количества миРНК IL-34 из любой из SEQ ID NO:1-23, например, любой из SEQ ID NO:1-8, или композиции, включающей такую миРНК IL-34 или ее фармацевтически приемлемую соль. Согласно некоторым вариантам осуществления, воспалительное заболевание представляет собой воспалительное заболевание кишечника, например, воспалительную болезнь Крона или фиброзно-стриктурирующую болезнь Крона.

[0052] Настоящее изобретение относится также к способу ингибирования экспрессии IL-34 в клетке субъекта или ингибирования экспрессии одного или нескольких коллагенов в клетке субъекта, предусматривающему введение ингибитора IL-34, например, миРНК IL-34, раскрытой в настоящем документе. Например, вышеупомянутые способы могут предусматривать стадию введения субъекту фармацевтически эффективного количества фармацевтического препарата, включающего ингибитор IL-34 (например, короткошпилечную РНК IL-34, малую интерферирующую РНК IL-34, микроРНК IL-34 или морфолиновый олигомер IL-34 из SEQ ID NO:1-23, например, любую одну из SEQ ID NO:1-8, или композиции, включающей такой ингибитор IL-34) или его фармацевтически приемлемую соль. Например, вышеупомянутые способы могут предусматривать стадию введения субъекту фармацевтически эффективного количества фармацевтического препарата, включающего миРНК IL-34 из любой из SEQ ID NO:1-23, например, любой одной из SEQ ID NO:1-8, или композиции, включающей такую миРНК IL-34 или ее фармацевтически приемлемую соль. Согласно некоторым вариантам осуществления вышеупомянутых способов, субъект нуждается в лечении воспалительной болезни Крона или фиброзно-стриктурирующей болезни Крона.

[0053] Настоящее изобретение относится также к способам лечения, в которых миРНК IL-34 вводят нуждающемуся в этом пациенту. Например, настоящее изобретение относится к способам лечения воспалительного заболевания, предусматривающим введение нуждающемуся в этом пациенту эффективного количества миРНК IL-34 из любой из SEQ ID NO:1-8. Настоящее изобретение также относится к способу ингибирования продукции воспалительного цитокина в клетках пациента, страдающего воспалительным заболеванием, предусматривающему введение эффективного количества миРНК IL-34 из любой из SEQ ID NO:1-8.

[0054] Настоящее изобретение также относится к способу уменьшения или ингибирования опосредованного IL-34 воспалительного ответа в клетке или клетках пациента, страдающего воспалительным заболеванием, предусматривающему введение эффективного количества миРНК IL-34 из любой из SEQ ID NO:1-8. Настоящее изобретение также относится к способу лечения воспалительного заболевания, ассоциированного с измененной экспрессией IL-34, у нуждающегося в этом пациента, предусматривающему введение эффективного количества миРНК IL-34. Например, настоящее изобретение относится к способу лечения воспалительного заболевания, ассоциированного с увеличенной экспрессией IL-34, у нуждающегося в этом пациента, предусматривающему введение эффективного количества миРНК IL-34 из любой из SEQ ID NO:1-8 или ее фармацевтически приемлемой соли. Увеличенная экспрессия IL-34 может присутствовать относительно контрольного уровня экспрессии IL-34, например, среднего или медианного уровня IL-34, измеренного у здорового контрольного пациента или в когорте здоровых контрольных пациентов, или уровня IL-34, измеренного у пациента до начала или детекции заболевания, ассоциированного с увеличенной экспрессией IL-34.

[0055] Настоящее изобретение также относится к способу лечения воспалительного заболевания, ассоциированного с измененной экспрессией IL-34, у нуждающегося в этом пациента, предусматривающему введение эффективного количества миРНК IL-34 из любой из SEQ ID NO:1-8 или ее фармацевтически приемлемой соли.

[0056] Настоящее изобретение также относится к способу ингибирования опосредованной IL-34 передачи сигналов M-CSFR-1 в клетках пациента, страдающего воспалительным заболеванием, предусматривающему введение эффективного количества миРНК IL-34 из любой из SEQ ID NO:1-8 или ее фармацевтически приемлемой соли.

[0057] Настоящее изобретение также относится к способу уменьшения или уничтожения фиброзной стриктуры у пациента, страдающего воспалительным заболеванием, предусматривающему введение эффективного количества миРНК IL-34 из любой из SEQ ID NO:1-8 или ее фармацевтически приемлемой соли. Согласно некоторым вариантам осуществления, фиброзная стриктура локализована в кишечнике, например, толстом кишечнике или тонком кишечнике. Согласно конкретным вариантам осуществления, фиброзная стриктура локализована в толстом кишечнике. Согласно некоторым вариантам осуществления, фиброзная стриктура локализована в одной или нескольких частях толстого и/или тонкого кишечника, например, слепой кишке, подвздошной кишке, восходящей толстой кишке, поперечной толстой кишке, нисходящей

толстой кишке, сигмовидной толстой кишке, прямой кишке, анусе, двенадцатиперстной кишке и/или тощей кишке.

[0058] Согласно некоторым вариантам осуществления, ингибитор IL-34, например, миРНК IL-34, вводят местно, парентерально, перорально, внутрилегочно, интратрахеально, интраназально, чрескожно или интрадуоденально. В конкретном варианте осуществления, IL-миРНК, или ее фармацевтически приемлемую соль вводят перорально.

[0059] Настоящее изобретение также относится к фармацевтически приемлемой композиции, содержащей ингибитор IL-34, раскрытый в настоящем документе, например, миРНК IL-34 из любой из SEQ ID NO:1-8 или ее фармацевтически приемлемую соль, и фармацевтически приемлемый наполнитель. Согласно некоторым вариантам осуществления, фармацевтическая композиция является пригодной для местного, парентерального, перорального, внутрилегочного, интратрахеального, интраназального, чрескожного или интрадуоденального введения.

[0060] Настоящее изобретение также относится к ингибитору IL-34, например, миРНК IL-34, для применения в качестве лекарственного средства. Например, миРНК IL-34 из любой из SEQ ID NO:1-8 может быть предназначена для применения в качестве лекарственного средства.

[0061] Настоящее изобретение также относится к применению ингибитора IL-34, например, миРНК IL-34 из любой из SEQ ID NO:1-8, в изготовлении лекарственного средства для лечения воспалительного заболевания. Настоящее изобретение также относится к ингибитору IL-34, например, миРНК IL-34 из любой из SEQ ID NO:1-8, для применения в лечении воспалительного заболевания. Согласно некоторым вариантам осуществления, воспалительное заболевание представляет собой воспалительное заболевание кишечника, ревматоидный артрит, псориаз, остеоартрит, диабет (типа I и II), отторжение ткани или органа, рассеянный склероз, воспаление пародонта, периодонтит, пигментный виллезнодулярный синовит, гепатит, синусит, рак толстого кишечника, колоректальный рак, ассоциированный с колитом рак толстого кишечника, спорадический колоректальный рак, болезнь коронарных артерий, синдром Шегрена (SS), ожирение, хроническое воспаление, легочный саркоидоз, кожные повреждения, воспалительное заболевание ЦНС или аутоиммунное заболевание. Настоящее изобретение также относится к применению антисмыслового олигонуклеотида IL-34 в изготовлении лекарственного средства для лечения астмы, хронического обструктивного заболевания легких (COPD) или идиопатического легочного фиброза (IPF). Согласно некоторым вариантам осуществления, воспалительное заболевание представляет собой

воспалительное заболевание кишечника. Согласно некоторым вариантам осуществления, воспалительное заболевание кишечника представляет собой болезнь Крона, воспалительную болезнь Крона, фиброзно-стриктурирующую болезнь Крона, болезнь Крона желудка и двенадцатиперстной кишки, (гранулематозный) колит Крона, язвенный колит, коллагенозный колит, лимфоцитарный колит, ишемический колит, диверсионный колит, болезнь Бехчета, микроскопический колит, язвенный проктит, проктосигмоидит, еуноилеит, левосторонний колит, панколит, илеоколит, илеит или неуточненный колит. Согласно некоторым вариантам осуществления, воспалительное заболевание кишечника представляет собой воспалительную болезнь Крона или фиброзно-стриктурирующую болезнь Крона.

[0062] Настоящее изобретение также относится к способу ингибирования экспрессии IL-34 в клетке субъекта, предусматривающему введение субъекту фармацевтически эффективного количества фармацевтического препарата, включающего ингибитор IL-34 или его фармацевтически приемлемую соль, например, миРНК IL-34 из любой из SEQ ID NO:1-8. Настоящее изобретение также относится к способу ингибирования экспрессии одного или нескольких коллагенов в клетке субъекта, предусматривающему введение субъекту фармацевтически эффективного количества фармацевтического препарата, содержащего ингибитор IL-34 или его фармацевтически приемлемую соль, например, миРНК IL-34 из любой из SEQ ID NO:1-8. Согласно некоторым вариантам осуществления вышеупомянутых способов, клетка представляет собой клетку кишечника, например, стромальную клетку кишечника, эпителиальную клетку кишечника, стволовую клетку кишечника, секреторную клетку, энтероцит, бокаловидную клетку, энтероэндокринную клетку, клетку Панета, транзиторную амплифицирующуюся клетку, микроскладчатую клетку, чашеобразную клетку или пучковую клетку. Согласно некоторым вариантам осуществления, клетка формирует часть кишечной фиброзной стриктуры. Согласно вышеупомянутым вариантам осуществления, субъект может представлять собой субъекта, нуждающегося в лечении воспалительного заболевания или фиброза, например, воспалительной болезни Крона или фиброзно-стриктурирующей болезни Крона. Согласно некоторым вариантам осуществления, способы, раскрытые в настоящем документе, можно использовать для ингибирования экспрессии одного или нескольких коллагенов в клетке субъекта. Согласно конкретным вариантам осуществления, фармацевтический препарат можно вводить перорально. Согласно конкретным вариантам осуществления, субъект представляет собой человека.

[0063] Согласно некоторым вариантам осуществления, настоящее изобретение может относиться к способу лечения или предотвращения фиброза или предотвращения отложения коллагена у пациента, предусматривающему введение пациенту эффективного количества специфического ингибитора IL-34, например, миРНК IL-34 из любой из SEQ ID NO:1-8, или ее фармацевтически приемлемой соли.

[0064] Настоящее изобретение также относится к применению ингибитора IL-34, например, миРНК IL-34, в изготовлении лекарственного средства для лечения фиброза. Согласно некоторым вариантам осуществления, фиброз представляет собой кишечный фиброз. Согласно некоторым вариантам осуществления, фиброз представляет собой легочный фиброз. Согласно другим вариантам осуществления, фиброз представляет собой почечный фиброз, сердечный фиброз, эндомикардиальный фиброз, миелофиброз, ретроперитонеальный фиброз или нефрогенный системный фиброз.

[0065] Настоящее изобретение также относится к ингибитору IL-34, например, миРНК IL-34, для применения в лечении фиброза. Согласно некоторым вариантам осуществления, фиброз представляет собой кишечный фиброз. Согласно некоторым вариантам осуществления, фиброз представляет собой легочный фиброз. Согласно другим вариантам осуществления, фиброз представляет собой почечный фиброз, сердечный фиброз, эндомикардиальный фиброз, миелофиброз, ретроперитонеальный фиброз или нефрогенный системный фиброз.

[0066] Согласно различным вариантам осуществления, ингибитор IL-34, например, миРНК IL-34, можно вводить посредством одного или нескольких способов, включая перорально, местно, парентерально, например, посредством подкожной инъекции, посредством спрея для ингаляции или ректально. Согласно предпочтительному варианту осуществления, ингибитор IL-34 можно вводить перорально пациенту с фиброзом, например, кишечным фиброзом или легочным фиброзом.

[0067] Настоящее изобретение может относиться к способам, предусматривающим введение ингибитора IL-34, способного к нацеливанию на РНК IL-34 для деградации, создания помех для сплайсинга РНК, или предотвращения экспрессии гена или трансляции белка IL-34. Ингибиторы IL-34 по изобретению, включая миРНК IL-34 по изобретению, могут нацеливаться для связывания на различные области мРНК IL-34 мыши и/или человека.

[0068] Согласно некоторым вариантам осуществления изобретения, способ лечения фиброза, например, кишечного фиброза, предотвращения кишечного фиброза или легочного фиброза, или предотвращения отложения коллагена у пациента предусматривает введение фармацевтической композиции, например, фармацевтической

композиции, содержащей специфический ингибитор IL-34, например, миРНК IL-34, и фармацевтически приемлемый наполнитель. Согласно некоторым вариантам осуществления, фармацевтическую композицию вводят парентерально. Согласно некоторым вариантам осуществления, фармацевтическую композицию вводят перорально. Согласно некоторым вариантам осуществления, фармацевтическая композиция включает кишечнорастворимое покрытие, например, кишечнорастворимое покрытие, содержащее сополимер этилакрилата-метакриловой кислоты.

[0069] Согласно вариантам осуществления изобретения, способы лечения и/или предотвращения воспалительного заболевания (например, воспалительной болезни Крона или фиброзно-стриктурирующей болезни Крона), лечения, уменьшения и/или уничтожения фиброзных стриктур у пациента (например, у пациента, страдающего фиброзно-стриктурирующей болезнью Крона), лечения фиброза (например, кишечного фиброза или легочного фиброза), предотвращения фиброза (например, кишечного фиброза или легочного фиброза), или лечения, облегчения или предотвращения отложения коллагена у пациента предусматривают введение различных количеств ингибитора IL-34, например, миРНК IL-34, или его фармацевтически приемлемой соли, или фармацевтической композиции, содержащей ингибитор IL-34, например, миРНК IL-34 из любой из SEQ ID NO:1-8, или его фармацевтически приемлемую соль. Согласно некоторым вариантам осуществления, способы по изобретению предусматривают введение 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 ингибитора IL-34. Согласно некоторым вариантам осуществления, способы по изобретению предусматривают введение от 35 мг до 500 мг, от 1 мг до 10 мг, от 10 мг до 20 мг, от 20 мг до 30 мг, от 30 мг до 40 мг, от 40 мг до 50 мг, от 50 мг до 60 мг, от 60 мг до 70 мг, от 70 мг до 80 мг, от 80 мг до 90 мг, от 90 мг до 100 мг, от 100 мг до 150 мг, от 150 мг до 200 мг, от 200 мг до 250 мг, от 250 мг до 300 мг, от 300 мг до 350 мг, от 350 мг до 400 мг, от 400 мг до 450 мг, от 450 мг до 500 мг, от 500 мг до 600 мг, от 600 мг до 700 мг, от 700 мг до 800 мг, от 800 мг до 900 мг, от 900 мг до 1 г, от 1 мг до 50 мг, от 20 мг до 40 мг или от 1 мг до 500 мг ингибитора IL-34, или фармацевтической композиции, содержащей ингибитор IL-34.

[0070] Настоящее изобретение относится также к способу предотвращения или лечения фиброза печени, легочного фиброза или кишечного фиброза, предусматривающему введение нуждающемуся в этом пациенту фармацевтического препарата, содержащего ингибитор IL-34, например, миРНК IL-34, раскрытую в

настоящем документе. Настоящее изобретение относится также к способам предотвращения или лечения почечного фиброза, сердечного фиброза, эндомиокардиального фиброза, идиопатического легочного фиброза, миелофиброза, ретроперитонеального фиброза и/или нефрогенного системного фиброза, предусматривающим введение нуждающемуся в этом пациенту фармацевтического препарата, содержащего ингибитор IL-34, такой как мРНК IL-34, раскрытая в настоящем документе.

Краткое описание фигур

[0071] Фиг. 1 представляет собой график, показывающий нормализованные уровни экспрессии мРНК IL-34 в клетках DLD-1, HT-29, HCT-116 и NCM-460.

[0072] Фиг. 2А представляет собой график, показывающий нормализованную экспрессию мРНК IL-34 в клетках HT-29, трансфицированных рандомизированным отрицательным контрольным олигонуклеотидом (Src AS) или антисмысловым олигонуклеотидом IL-34 из SEQ ID NO:1, 2, 3 или 4 (AS34New1, AS34New2, AS34New3, AS34New4, соответственно) в течение 24 часов.

[0073] На фиг. 2В показаны Вестерн-блоты экстрактов из клеток HT-29, трансфицированных контрольным олигонуклеотидом SrcAS или антисмысловыми олигонуклеотидами IL-34 AS34New1 или AS34New3. Вестерн-блоты анализировали с использованием зондов для IL-34 (верх) или β -актина (низ).

[0074] На фиг. 2С показаны Вестерн-блоты экстрактов из клеток RAW 264.7, трансфицированных контрольным олигонуклеотидом SrcAS или антисмысловыми олигонуклеотидами IL-34 AS34New1, AS34New3 или AS34New4. Вестерн-блоты анализировали с использованием зондов для IL-34 (верх) или β -актина (низ).

[0075] На фиг. 3А показаны Вестерн-блоты экстрактов из культивированных пораженных фиброзно-стриктурирующей болезнью Крона (FS CD) фибробластов, трансфицированных контрольным олигонуклеотидом SrcAS или антисмысловыми олигонуклеотидами IL-34 AS34New1 или AS34New3. Вестерн-блоты анализировали с использованием зондов для IL-34 (верх) или β -актина (низ).

[0076] На фиг. 3В показаны Вестерн-блоты экстрактов из ассоциированных с раком фибробластов, трансфицированных контрольным олигонуклеотидом SrcAS или антисмысловым олигонуклеотидом IL-34 AS34New3. Вестерн-блоты анализировали с использованием зондов для IL-34 (верх) или β -актина (низ).

[0077] На фиг. 4А показаны Вестерн-блоты экстрактов из клеток HT-29 трансфицированных одним из двух контрольных рандомизированных антисмысловых

олигонуклеотидов (КонтрольASNew-1-PS или КонтрольASNew-3-PS) или антисмысловым олигонуклеотидом IL-34 из SEQ ID NO:1, 3 или 7 (New1-PS, New-3-PS и New-3-PS-MEC, соответственно). Вестерн-блоты анализировали с использованием зондов для IL-34 (верх) или β -актина (низ).

[0078] На фиг. 4B показаны Вестерн-блоты экстрактов из клеток RAW 264.7, трансфицированных одним из двух контрольных рандомизированных антисмысловых олигонуклеотидов (КонтрольASNew-1-PS или КонтрольASNew-3-PS) или антисмысловым олигонуклеотидом IL-34 из SEQ ID NO:1, 3 или 7 (New1-PS, New-3-PS и New-3-PS-MEC, соответственно). Вестерн-блоты анализировали с использованием зондов для IL-34 (верх) или β -актина (низ).

[0079] На фиг. 4C показаны Вестерн-блоты экстрактов из клеток MC-38 трансфицированных одним из двух контрольных рандомизированных антисмысловых олигонуклеотидов (КонтрольASNew-1-PS или КонтрольASNew-3-PS) или антисмысловым олигонуклеотидом IL-34 из SEQ ID NO:1, 3 или 7 (New1-PS, New-3-PS и New-3-PS-MEC, соответственно). Вестерн-блоты анализировали с использованием зондов для IL-34 (верх) или β -актина (низ).

[0080] Фиг. 5A представляет собой график, показывающий нормализованную экспрессию мРНК M-CSFR-1 в контрольных образцах подвздошной кишки из не пораженных областей подвздошной кишки пациентов, подвергаемых хирургической операции из-за рака толстого кишечника (Подвздошн. КОНТР.) и образцах для подвздошнокишечной воспалительной CD (I CD) и фиброзно-стриктурирующей болезни Крона (FS CD) от пациентов с CD, как оценено посредством RT-ПЦР.

[0081] На фиг. 5B показаны Вестерн-блоты экстрактов из образцов ткани для Подвздошн. КОНТР., I CD и FS CD. Вестерн-блоты анализировали с использованием зондов для M-CSFR-1 (верх) или β -актина (низ).

[0082] На фиг. 5C показан количественный анализ относительного сигнала M-CSFR-1 на Вестерн-блотах экстрактов из образцов ткани для Подвздошн. КОНТР., I CD и FS CD. Сигнал M-CSFR-1 нормализовали относительно сигнала β -актина.

[0083] На фиг. 5D показана иммуногистохимическая детекция M-CSFR-1 в срезах подвздошной кишки пациентов, подвергаемых хирургической операции из-за рака толстого кишечника (Подвздошн. КОНТР.).

[0084] На фиг. 5D показана иммуногистохимическая детекция M-CSFR-1 в образцах для фиброзно-стриктурирующей болезни Крона из срезов подвздошной кишки пациентов с CD (FS CD).

[0085] На фиг. 5F показано окрашивание антителом против M-CSFR-1 срезов подвздошной кишки с контролем изотипа (Изотип).

[0086] Фиг. 5G представляет собой график, показывающий нормализованную экспрессию мРНК M-CSFR-1 в контрольных образцах подвздошной кишки (Подвздошн. КОНТР.) и при фиброзно-стриктурирующей болезни Крона (FS CD), как оценено посредством RT-ПЦР.

[0087] Фиг. 6A представляет собой столбчатую диаграмму, показывающую нормализованную экспрессию мРНК цепи альфа 1 коллагена типа I (COL1A1) в культивированных фибробластах кишечника, либо оставленных нестимулированными (Нестим.), либо стимулированных рекомбинантным IL-34 человека (IL-34), как оценено посредством RT-ПЦР.

[0088] Фиг. 6B представляет собой столбчатую диаграмму, показывающую нормализованную экспрессию мРНК цепи альфа 1 коллагена типа III (COL3A1) в культивированных фибробластах кишечника, либо оставленных нестимулированными (Нестим.), либо стимулированных рекомбинантным IL-34 человека (IL-34), как оценено посредством RT-ПЦР.

[0089] На фиг. 6C показаны Вестерн-блоты экстрактов из культивированных фибробластов кишечника, либо оставленных нестимулированными (Нестим.), либо стимулированных рекомбинантным IL-34 человека (IL-34). Вестерн-блоты анализировали с использованием зондов для COL1A1 (верхняя панель), COL3A1 (средняя панель) или β -актина (низ).

[0090] На фиг. 6D показаны графики нормализованной экспрессии белка COL1A1 в культивированных фибробластах кишечника, либо оставленных нестимулированными (Нестим.), либо стимулированных рекомбинантным IL-34 человека (IL-34), как оценено посредством Вестерн-блоттинга.

[0091] На фиг. 6E показаны графики нормализованной экспрессии белка COL3A1 в культивированных фибробластах кишечника, либо оставленных нестимулированными (Нестим.), либо стимулированных рекомбинантным IL-34 человека (IL-34), как оценено посредством Вестерн-блоттинга.

[0092] На фиг. 6F показано общее содержание коллагена в супернатантах культивированных фибробластов кишечника, либо оставленных нестимулированными (Нестим.), либо стимулированных рекомбинантным IL-34 человека (IL-34).

[0093] На фиг. 7A показаны Вестерн-блоты экстрактов из культивированных в среде с недостаточностью сыворотки фибробластов кишечника, которые были либо оставленными нестимулированными (Нестим.), либо стимулированными

рекомбинантным IL-34 человека, TNF- α или IL-6. Блоты анализировали с использованием зондов для общей (p38) и фосфорилированной по p38 (p-p38) активируемой митогенами протеинкиназы (MAP).

[0094] На фиг. 7B показаны Вестерн-блоты экстрактов из фибробластов, предварительно подвергнутых либо контрольной обработке диметилсульфоксидом (DMSO), либо обработке ингибитором p38 SB202190 (SB202190), и оставленных нестимулированными, либо подвергнутых обработке DMSO или SB202190, с последующей стимуляцией рекомбинантным IL-34 человека (IL-34). Блоты анализировали с использованием зондов для COL1A1 (верхняя панель), COL3A1 (средняя панель) или β -актина (низ).

[0095] На фиг. 7C показана количественная оценка сигнала COL1A1 на Вестерн-блотах экстрактов из фибробластов, предварительно обработанных либо DMSO, либо SB202190, и оставленных нестимулированными, или предварительно обработанных DMSO или SB202190 с последующей стимуляцией рекомбинантным IL-34 человека. Сигнал COL1A1 нормализовали по сигналу β -актина.

[0096] На фиг. 7D показана количественная оценка сигнала COL3A1 на Вестерн-блотах экстрактов из фибробластов, предварительно обработанных либо DMSO, либо SB202190, и оставленных нестимулированными, или предварительно обработанных DMSO или SB202190 с последующей стимуляцией рекомбинантным IL-34 человека. Сигнал COL3A1 нормализовали по сигналу β -актина.

[0097] На фиг. 7E показано общее содержание коллагена в супернатантах фибробластов, предварительно обработанных либо DMSO, либо SB202190, и оставленных нестимулированными, или предварительно обработанных DMSO или SB202190 с последующей стимуляцией рекомбинантным IL-34 человека.

[0098] Фиг. 8A представляет собой столбчатую диаграмму, показывающую нормализованную экспрессию IL-34 в образцах кишечника, взятых из контрольных образцов подвздошной кишки (Подвздошн. КОНТР.) или образцов ткани кишечника, пораженной воспалительной (I CD) или фиброзно-стриктурирующей болезнью Крона (FS CD), как оценено посредством RT-ПЦР.

[0099] На фиг. 8B показаны Вестерн-блоты экстрактов из парных образцов слизистой оболочки кишечника из контрольных образцов подвздошной кишки (Подвздошн. КОНТР.) или от пациентов с воспалительной (I CD) или фиброзно-стриктурирующей болезнью Крона (FS CD). Блоты анализировали с использованием зондов для IL-34 (верхняя панель) или β -актина (нижняя панель).

[0100] На фиг. 8С показана количественная оценка сигнала IL-34 на Вестерн-блотах экстрактов из образцов Подвздошн. КОНТР., I CD и FS CD.

[0101] На фиг. 8D показано иммуногистохимическое окрашивание IL-34 в контрольной ткани подвздошной кишки (Подвздошн. КОНТР.).

[0102] На фиг. 8Е показано иммуногистохимическое окрашивание IL-34 в пораженной фиброзно-стриктурирующей болезнью Крона ткани кишечника (FS CD).

[0103] На фиг. 8F показано окрашивание ткани кишечника с контролем изотипа (Изотип).

[0104] Фиг. 8G представляет собой график, показывающий относительную экспрессию мРНК IL-34 в фибробластах, выделенных из образцов подвздошной кишки для контрольной ткани (Подвздошн. КОНТР.) и ткани пациента с фиброзно-стриктурирующей болезнью Крона (FS CD).

[0105] На фиг. 8H показаны Вестерн-блоты экстрактов из фибробластов, выделенных из образцов подвздошной кишки, для контрольных пациентов (Подвздошн. КОНТР.) и пациентов с фиброзно-стриктурирующей болезнью Крона (FS CD), и анализированных с использованием зондов по сигналу IL-34 (верх) и β -актина (низ).

[0106] На фиг. 9A показаны Вестерн-блоты экстрактов из культивированных фибробластов от пациентов с фиброзно-стриктурирующей болезнью Крона (FS CD), трансфицированных либо антисмысловым олигонуклеотидом IL-34 из SEQ ID NO:3 (IL-34AS), либо комплементарным смысловым олигонуклеотидом (NCAS). Блоты анализировали с использованием зондов по сигналу IL-34, COL1A1, COL3A1 и β -актина.

[0107] На фиг. 9B показана количественная оценка сигнала IL-34 на Вестерн-блотах экстрактов из культивированных и трансфицированных пораженных FS CD фибробластов.

[0108] На фиг. 9C показана количественная оценка сигнала COL1A1 на Вестерн-блотах экстрактов из культивированных и трансфицированных пораженных FS CD фибробластов.

[0109] На фиг. 9D показана количественная оценка сигнала COL3A1 на Вестерн-блотах экстрактов из культивированных и трансфицированных пораженных FS CD фибробластов.

[0110] На фиг. 9E показано общее содержание коллагена в супернатантах культур пораженных FS CD фибробластов, трансфицированных антисмысловым олигонуклеотидом IL-34 из SEQ ID NO:3 (IL-34AS) или комплементарным смысловым олигонуклеотидом (NCAS).

[0111] Фиг. 9F представляет собой график, показывающий процент клеточной смерти в культивированных пораженных FS CD фибробластах, трансфицированных антисмысловым олигонуклеотидом IL-34 из SEQ ID NO:3 (IL-34AS) или комплементарным смысловым олигонуклеотидом (NCAS).

[0112] На фиг. 9G показаны графики активированной флуоресценцией сортировки клеток (FACS) для культивированных пораженных FS CD фибробластов, трансфицированных NCAS. Клетки окрашивали по аннексину V и изотиоцианату флуоресцеина (Аннексин V FITC-A; y-ось), и иодиду пропидия (Иодид пропидия-A; x-ось).

[0113] На фиг. 9H показаны графики активированной флуоресценцией сортировки клеток (FACS) для культивированных пораженных FS CD фибробластов, трансфицированных IL-34AS. Клетки окрашивали по аннексину V и изотиоцианату флуоресцеина (Аннексин V FITC-A; y-ось), и иодиду пропидия (Иодид пропидия-A; x-ось).

Подробное раскрытие настоящего изобретения

Ингибиторы IL-34

[0114] Уровни (например, уровни мРНК или белка IL-34) и/или активность (например, биологическую активность, например, стимуляцию рецептора IL-34) IL-34 можно уменьшать с использованием соединений или композиций, нацеленных на ген IL-34 или продукт гена IL-34 (например, мРНК IL-34).

[0115] Ингибиторы IL-34 могут представлять собой, но без ограничения, ингибиторы IL-34 на основе нуклеотидов (например, короткошпилечные РНК IL-34 (кшРНК), микроРНК IL-34 (мкРНК), малые интерферирующие РНК IL-34 (миРНК), и антисмысловые олигонуклеотиды IL-34, включая антисмысловые олигонуклеотиды IL-34, включающие LNA-нуклеотиды, пептидные нуклеиновые кислоты (PNA) и морфолиновые олигомеры), и композиции, включающие такие соединения.

Антисмысловые лекарственные средства против IL-34

[0116] Антисмысловые лекарственные средства представляют собой класс соединений на основе нуклеиновой кислоты, которые можно использовать для ингибирования экспрессии гена. Антисмысловые лекарственные средства могут представлять собой соединения на основе одно- или двухцепочечной дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК), на основе рибонуклеиновой кислоты (РНК), на основе смешанных ДНК и РНК или представляющие собой химический аналог ДНК/РНК. Как правило, антисмысловые лекарственные средства разработаны для включения

нуклеотидной последовательности, которая является комплементарной или почти комплементарной последовательности мРНК или пре-мРНК, транскрибированной с данного гена, чтобы способствовать связыванию между антисмысловым лекарственным средством и пре-мРНК или мРНК. Без связи с теорией, считают, что, в большинстве случаев, антисмысловые лекарственные средства действуют посредством связывания с мРНК или пре-мРНК, таким образом, ингибирования трансляции белка, изменения сплайсинга пре-мРНК в зрелую мРНК и/или вызова разрушения мРНК. В большинстве случаев, нуклеотидная последовательность антисмыслового лекарственного средства является комплементарной части смысловой последовательности подвергаемых нацеливанию гена или мРНК. Антисмысловые лекарственные средства против IL-34, раскрытые в настоящем документе, представляют собой соединения на основе олигонуклеотидов, включающие олигонуклеотидную последовательность, комплементарную смысловой последовательности гена IL-34, смысловой последовательности пре-мРНК IL-34 и/или смысловой последовательности мРНК IL-34, или ее части. Антисмысловые лекарственные средства против IL-34, раскрытые в настоящем документе, могут также представлять собой соединения на основе химических аналогов нуклеотидов, способные к связыванию со смысловой последовательностью гена IL-34, смысловой последовательностью пре-мРНК IL-34 и/или смысловой последовательностью мРНК IL-34, или ее частью. Антисмысловые лекарственные средства против IL-34 включают антисмысловые олигонуклеотиды IL-34, кшРНК IL-34, миРНК IL-34, PNA IL-34, LNA IL-34 и морфолиновые олигомеры IL-34.

[0117] Антисмысловые олигонуклеотиды (AON) представляют собой короткие последовательности на основе олигонуклеотидов, включающие олигонуклеотидную последовательность, комплементарную последовательности РНК-мишени. AON, как правило, имеют длину от 8 до 50 нуклеотидов, например, длину 20 нуклеотидов.

[0118] AON, раскрытые в настоящем документе, могут включать химически модифицированные нуклеозиды. В рамках изобретения, «химически модифицированные нуклеозиды» означают любой нуклеозид, отличный от аденозина, цитидина, тимидина, гуанозина или уридина. Например, согласно некоторым вариантам осуществления, химически модифицированный нуклеозид может включать, но без ограничения: запертую нуклеиновую кислоту (LNA), например, LNA-цитидин, LNA-тимидин, LNA-аденозин или LNA-гуанозин; нуклеозид, включающий стабилизированный 5'-фосфат или устойчивый к фосфатазе аналог 5'-фосфата, например, 5'-метилфосфонат, 5'-метилфосфонат, аналог 5'-метилфосфоната, 5'-*E*-винилфосфонат (5'-*E*-VP), 5'-фосфоротиоат и аналог 5'-*C*-метила; 2'-*O*-метил-рибонуклеозид, например, 2'-*O*-метилцитидин, 2'-*O*-метилгуанозин, 2'-

O-метилуридин, 2'-*O*-метилтимидин и 2'-*O*-метиладенозин; 5-метилпиримидин, например, 5-метилцитозин; 5-метилпуридин, например, 5-метилгуанин; 5-метил-2'-*O*-метилцитидин; 5-метил-2'-*O*-метилтимидин; 5-метилцитидин; 5-метилуридин; или 5-метил 2'-дезокситидин.

[0119] AON, раскрытые в настоящем документе, могут включать по меньшей мере одну модифицированную межнуклеозидную связь. В рамках изобретения, «межнуклеозидная связь» означает соединение между 3'-положением нуклеозида и 5'-положением соседнего нуклеозида. «Модифицированная межнуклеозидная связь» относится к соединению между 3'-положением нуклеозида и 5'-положением соседнего нуклеозида, которое не является природным. Например, согласно некоторым вариантам осуществления, модифицированная межнуклеозидная связь может включать, но без ограничения: фосфоротиоатную связь; фосфородитиоатную связь, фосфотриэфирную связь, алкилфосфонатную связь, аминокилфосфотриэфирную связь, алкиленфосфонатную связь, фосфинатную связь, фосфорамидатную связь, аминокилфосфорамидатную связь, тиофосфорамидатную связь, тионокилфосфонатную связь, тионокилфосфотриэфирную связь, тиофосфатную связь, селенофосфатную связь или боранофосфатную связь

[0120] Согласно некоторым вариантам осуществления, AON, раскрытые в настоящем документе, могут включать по меньшей мере один химически модифицированный нуклеозид и по меньшей мере одну модифицированную межнуклеозидную связь. Согласно некоторым вариантам осуществления, AON, раскрытые в настоящем документе, могут включать по меньшей мере один химически модифицированный нуклеозид или по меньшей мере одну модифицированную межнуклеозидную связь.

[0121] AON IL-34, раскрытые в настоящем документе, включают олигонуклеотидные последовательности, комплементарные последовательностям РНК IL-34.

[0122] Пептидные нуклеиновые кислоты (PNA) представляют собой короткие, искусственно синтезированные полимеры со структурой, имитирующей ДНК или РНК. PNA включают остов, состоящий из повторяющихся N-(2-аминоэтил)-глициновых звеньев, связанных пептидными связями. IL-34 PNA, раскрытые в настоящем документе, можно использовать в качестве антисмысловых лекарственных средств, которые связывают последовательности РНК IL-34 с высокой специфичностью и ингибируют экспрессию гена IL-34.

[0123] Запертые нуклеиновые кислоты (LNA) представляют собой олигонуклеотидные последовательности, включающие один или несколько модифицированных РНК-нуклеотидов, в которых рибозная группа является модифицированной с использованием дополнительного мостика, соединяющего 2'-кислород и 4'-углерод. Считают, что LNA имеют более высокие T_m , чем аналогичные олигонуклеотидные последовательности. IL-34 LNA, раскрытые в настоящем документе, можно использовать в качестве антисмысловых лекарственных средств, которые связывают последовательности РНК IL-34 с высокой специфичностью и ингибируют экспрессию гена IL-34.

[0124] Морфолиновые олигомеры представляют собой олигонуклеотидные соединения, включающие основания ДНК, присоединенные к остову из метиленморфолиновых колец, связанных через фосфородиамидатные группы. Морфолиновые олигомеры по настоящему изобретению можно конструировать для связывания со специфическими последовательностями представляющей интерес РНК IL-34 (например, последовательностями представляющей интерес мРНК IL-34 или пре-мРНК IL-34), таким образом, предотвращения экспрессии гена. Морфолиновые олигомеры IL-34, раскрытые в настоящем документе, можно использовать в качестве антисмысловых лекарственных средств, которые связывают последовательности мРНК IL-34 с высокой специфичностью и ингибируют экспрессию гена IL-34. Морфолиновые олигомеры IL-34, раскрытые в настоящем документе, можно также использовать для связывания последовательностей пре-мРНК IL-34, изменения сплайсинга пре-мРНК IL-34 и экспрессии гена IL-34.

[0125] Короткошпилечные РНК (кшРНК), как правило, представляют собой молекулы РНК с подобной шпильке структурой, которые можно использовать для сайленсинга экспрессии гена. кшРНК, как правило, экспрессируются с плазмид, кодирующих последовательность кшРНК, и могут быть экспрессированы с вирусных векторов для обеспечения лентивирусной, аденовирусной или аденоассоциированной вирусной экспрессии. Без связи с теорией, считают, что кшРНК ингибирует экспрессию гена, пользуясь преимуществами процессов РНК-интерференции (РНКи). Кратко, транскрипт кшРНК подвергается процессингу посредством Droscha и Dicer, и затем загрузке в индуцируемый РНК комплекс сайленсинга (RISC), позволяя нацеливание на специфическую мРНК, и либо деградацию мРНК, либо репрессию трансляции белка. кшРНК IL-34, раскрытые в настоящем документе, могут ингибировать экспрессию гена IL-34.

[0126] Малые интерферирующие РНК (миРНК) представляют собой двухцепочечные молекулы РНК длиной приблизительно 20-25 пар оснований (но которые могут также иметь длину, например, 18-30 пар оснований), которые пользуются преимуществами аппарата РНКи (например, Drosha и RISC) для связывания с и нацеливания на мРНК для деградации. миРНК не зависят от плазмид или векторов для экспрессии, и могут быть, как правило, доставлены напрямую в клетку-мишень, например, посредством трансфекции. миРНК IL-34 представляют собой двухцепочечные последовательности РНК, включающие последовательность РНК, которые являются комплементарными последовательности мРНК IL-34, и которые предотвращают трансляцию белка IL-34. миРНК IL-34, раскрытые в настоящем документе, включают миРНК, включающие нуклеотидную последовательность из любой из SEQ ID NO:1-23, например, нуклеотидную последовательность из любой из SEQ ID NO:1-8 или ее фармацевтически приемлемую соль.

[0127] МикроРНК (мкРНК) представляют собой малые некодирующие молекулы РНК, содержащие приблизительно 22 нуклеотидов, которые функционируют в сайленсинге РНК и посттранскрипционной регуляции экспрессии гена. мкРНК включают последовательности, комплементарные частям последовательности мРНК. мкРНК образуются из длинных, одноцепочечных молекул РНК, имеющих высоко специфические структуры стебель–петля. Искусственные мкРНК конструируют посредством замены 21-нуклеотидной последовательности из природных последовательностей мкРНК на 21-нуклеотидные последовательности из мишени, например, мРНК-мишени IL-34.

[0128] Ингибиторы IL-34, раскрытые в настоящем документе, могут включать химические модификации, способствующие стабилизации концевой 5'-фосфата олигонуклеотида и устойчивых к фосфатазе аналогов 5'-фосфата. Химические модификации, способствующие стабилизации концевой 5'-фосфата олигонуклеотида или представляющие собой устойчивые к фосфатазе аналоги 5'-фосфата, включают, но без ограничения, 5'-метилфосфонат, 5'-метиленфосфонат, аналоги 5'-метиленфосфоната, 5'-*E*-винилфосфонат (5'-*E*-VP), 5'-фосфоротиоат и 5'-*C*-метил-аналоги. Химические модификации, способствующие стабилизации концевой 5'-фосфата AON, и устойчивые к фосфатазе аналоги 5'-фосфата раскрыты в Khvorova and Watts, (2017) «The chemical evolution of oligonucleotide therapies of clinical utility» *Nat Biotechnol.*, 35(3):238-48, содержание которого включено в настоящий документ посредством ссылки.

[0129] Согласно некоторым вариантам осуществления, раскрытым в настоящем документе, ингибиторы IL-34 могут включать химически модифицированные нуклеозиды, например, 2'-*O*-метил рибонуклеозиды, например, 2'-*O*-метилцитидин, 2'-*O*-

метилгуанозин, 2'-*O*-метилуридин, 2'-*O*-метилтимидин и/или 2'-*O*-метиладенозин. Ингибиторы П-34, раскрытые в настоящем документе, могут включать одно или несколько химически модифицированных оснований, включая 5-метилпиримидин, например, 5-метилцитозин и/или 5-метилпурин, например, 5-метилгуанин. Ингибиторы П-34, раскрытые в настоящем документе, могут включать любые из следующих химически модифицированных нуклеозидов: 5-метил-2'-*O*-метилцитидин, 5-метил-2'-*O*-метилтимидин, 5-метилцитидин, 5-метилуридин и/или 5-метил 2'-дезокситидин.

[0130] 2'-ОМе-нуклеотиды обнаружены в природе в тРНК и других малых РНК. Включение 2'-ОМе-нуклеотидов в олигонуклеотидные последовательности предотвращает деградацию нуклеазами и увеличивает стабильность против гидролиза. Включение 2'-ОМе-модификации в олигонуклеотиды, как правило, увеличивает T_m дуплексов РНК-РНК на 1-4°C на добавление.

[0131] Введение группы 2'-МОЕ, как правило, увеличивает T_m полученного олигонуклеотида на приблизительно 1,1°C и улучшает устойчивость к деградации посредством нуклеазы. Кроме того, 2'-МОЕ-олигонуклеотиды часто используют в гэмперных соединениях для сохранения опосредованной РНКазой Н деградации цепей мРНК-мишени.

[0132] Ингибиторы П-34, раскрытые в настоящем документе, могут включать фосфатный остов, в котором одна или несколько из олигонуклеозидных связей представляют собой фосфатную связь. Ингибиторы П-34, раскрытые в настоящем документе, могут включать модифицированный олигонуклеотидный остов, в котором одна или несколько из нуклеозидных связей из нуклеотидной последовательности выбраны из группы, состоящей из фосфоротиоатной связи, фосфородитиоатной связи, фосфотриэфирной связи, алкилфосфонатной связи, аминоалкилфосфотриэфирной связи, алкиленфосфонатной связи, фосфинатной связи, фосфорамидатной связи, аминоалкилфосфорамидатной связи, тиофосфорамидатной связи, тионоалкилфосфонатной связи, тионоалкилфосфотриэфирной связи, тиофосфатной связи, селенофосфатной связи и боранофосфатной связи. Согласно некоторым вариантам осуществления ингибиторов П-34, раскрытых в настоящем документе, по меньшей мере одна межнуклеозидную связь из нуклеотидной последовательности представляет собой фосфоротиоатную связь. Например, согласно некоторым вариантам осуществления ингибиторов П-34, раскрытых в настоящем документе, одна, две, три или более межнуклеозидных связей из нуклеотидной последовательности представляют собой фосфоротиоатную связь. Согласно некоторым вариантам осуществления ингибиторов П-34, раскрытых в настоящем документе, все межнуклеозидные связи из нуклеотидной

последовательности представляют собой фосфоротиоатные связи. Таким образом, согласно некоторым вариантам осуществления, все из нуклеотидных связей ингибитора IL-34 из любой из SEQ ID NO:1-23 представляют собой фосфоротиоатные связи. Согласно некоторым вариантам осуществления, одна или несколько из нуклеотидных связей ингибитора IL-34 из любой из SEQ ID NO:1-23 представляют собой фосфоротиоатные связи. Например, миРНК IL-34, раскрытая в настоящем документе, может включать 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или более фосфоротиоатных связей. Согласно некоторым вариантам осуществления, все из нуклеотидных связей миРНК IL-34 из любой из SEQ ID NO:1-8 представляют собой фосфоротиоатные связи.

Антисмысловые олигонуклеотиды IL-34

[0133] Антисмысловые олигонуклеотиды (AON) IL-34, раскрытые в настоящем документе, представляют собой короткие синтетические олигонуклеотидные последовательности, комплементарные транскрипту IL-34 (например, транскрипту мРНК IL-34).

[0134] AON IL-34 включают нуклеотидную последовательность, полностью или почти полностью комплементарную последовательности мРНК IL-34. Согласно некоторым вариантам осуществления, AON IL-34 может включать недуплексный олигонуклеотид. Согласно некоторым вариантам осуществления, AON IL-34 может включать дуплекс из двух олигонуклеотидов, в котором первый олигонуклеотид включает нуклеотидную последовательность, которая является полностью или почти полностью комплементарной последовательности мРНК IL-34, и второй олигонуклеотид включает нуклеотидную последовательность, которая является комплементарной нуклеотидной последовательности первого олигонуклеотида. Специфичность связывания AON можно оценивать посредством измерения таких параметров, как константа диссоциации, температура плавления (T_m), или других критериев, таких как изменения уровней экспрессии белка или РНК, или других анализов, измеряющих активность или экспрессию IL-34.

[0135] AON IL-34, такой как раскрытый в настоящем документе, может представлять собой олигонуклеотидную последовательность, например, длиной 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 нуклеотидов, или длиной 15-20, 15-25, 15-30, 15-35, 20-25, 20-30, 20-35, 25-30, 25-35 или 30-35 нуклеотидов. Согласно некоторым вариантам осуществления, антисмысловой олигонуклеотид IL-34 ограничен верхним пределом размера, так что AON имеет длину не более чем 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34 или 35 нуклеотидов.

[0136] AON IL-34 может представлять собой олигонуклеотидную последовательность, комплементарную части последовательности мРНК IL-34 или последовательности гена IL-34, например, последовательности мРНК или гена IL-34 мыши или человека.

[0137] Согласно некоторым вариантам осуществления настоящего изобретения, AON IL-34 включает нуклеотидную последовательность, которая является комплементарной или почти комплементарной части варианта транскрипта мРНК IL-34, или его части, например, последовательности мРНК IL-34 человека из эталонной последовательности в NCBI NM_001172771.1 (SEQ ID NO:24), NM_001172772.1 (SEQ ID NO:25) или NM_152456.2 (SEQ ID NO:26); или последовательность мРНК IL-34 мыши из эталонной последовательности в NCBI NM_001135100.2 (SEQ ID NO:27) или NM_029646.3 (SEQ ID NO:28).

[0138] Согласно вариантам осуществления изобретения, раскрытым в настоящем документе, AON IL-34 может нацеливаться на мРНК IL-34, продуцированную с генов IL-34 из одного или нескольких видов, например, транскрипты мРНК IL-34 мыши и человека. Например, AON IL-34 может нацеливаться на мРНК IL-34 с гена IL-34 млекопитающего, например, гена IL-34 человека (т.е., *Homo sapiens*) или гена IL-34 мыши (т.е., *mus musculus*). Согласно конкретным вариантам осуществления, AON IL-34 нацеливается на мРНК IL-34 человека. Согласно некоторым вариантам осуществления, AON IL-34 включает нуклеотидную последовательность, комплементарную нуклеотидной последовательности гена IL-34 или мРНК IL-34, или ее части.

[0139] AON IL-34, раскрытые в настоящем документе, включают AON IL-34, включающий нуклеотидную последовательность: 5'-CTCACCAAGACCCACAG-3' (SEQ ID NO:1); 5'-GGCTTTGGGCCGACACAGCT-3' (SEQ ID NO:2); 5'-CTTTGGGCCGACACAGCTTC-3' (SEQ ID NO:3); 5'-TGGGCCGACACAGCTTCAGG-3' (SEQ ID NO:4); 5'-TCCATGACCCGGAAGCAGTT-3' (SEQ ID NO:5); 5'-TGTTTCATGTACTGAAG-3' (SEQ ID NO:6); 5'-CTTTGGGCXGCACACAGCTTC-3' (SEQ ID NO:7); или 5'-TCCATGACCCXGGAAGCAGTT-3' (SEQ ID NO:8), или его фармацевтически приемлемую соль, в которых X представляет собой 5-метилцитидин.

[0140] AON IL-34, раскрытый в настоящем документе, может включать химически модифицированные нуклеозиды, включая модифицированные рибонуклеозиды и модифицированные дезоксирибонуклеозиды. Химически модифицированные нуклеозиды включают, но без ограничения, 2'-O-(2-метоксиэтил)-модификации, например, 2'-O-(2-метоксиэтил)гуанозин, 2'-O-(2-метоксиэтил)аденозин, 2'-O-(2-метоксиэтил)цитозин, 2'-O-(2-метоксиэтил)уридин, и 2'-O-(2-метоксиэтил)тимидин. Согласно конкретным вариантам

осуществления, настоящее изобретение относится к смешанным вариантам ингибиторов IL-34, например, к комбинации пептидной нуклеиновой кислоты (PNA) IL-34 и запертой нуклеиновой кислоты (LNA) IL-34. Химически модифицированные нуклеозиды также включают, но без ограничения, запертые нуклеиновые кислоты (LNA), модификации 2'-O-метил-, 2'-фтор- и 2'-фтор-β-D-арабинонуклеотидов (FANA). Химически модифицированные нуклеозиды, которые можно включать в AON IL-34, раскрытые в настоящем документе, раскрыты в Johannes and Lucchino, (2018) «Current Challenges in Delivery and Cytosolic Translocation of Therapeutic RNAs» *Nucleic Acid Ther.* 28(3): 178–93; Rettig and Behlke, (2012) «Progress toward in vivo use of siRNAs-II» *Mol Ther* 20:483–512; и Khvorova and Watts, (2017) «The chemical evolution of oligonucleotide therapies of clinical utility» *Nat Biotechnol.*, 35(3):238-48, содержание каждого из которых включено в настоящий документ посредством ссылки.

[0141] AON IL-34, раскрытые в настоящем документе, могут включать химические модификации, способствующие стабилизации концевой 5'-фосфата олигонуклеотида, и устойчивые к фосфатазе аналоги 5'-фосфата. Химические модификации, которые способствуют стабилизации концевой 5'-фосфата олигонуклеотида, или которые представляют собой устойчивые к фосфатазе аналоги 5'-фосфата, включают, но без ограничения, 5'-метилфосфонат, 5'-метиленфосфонат, аналоги 5'-метиленфосфоната, 5'-E-винилфосфонат (5'-E-VP), 5'-фосфоротиоат и 5'-C-метил-аналоги. Химические модификации, способствующие стабилизации концевой 5'-фосфата AON, и устойчивые к фосфатазе аналоги 5'-фосфата раскрыты в Khvorova and Watts, (2017) «The chemical evolution of oligonucleotide therapies of clinical utility» *Nat Biotechnol.*, 35(3):238-48, содержание которого включено в настоящий документ посредством ссылки.

[0142] Согласно некоторым вариантам осуществления, раскрытым в настоящем документе, AON IL-34, раскрытые в настоящем документе, могут включать химически модифицированные нуклеозиды, включая 2'-O-метил-рибонуклеозиды, например, 2'-O-метилцитидин, 2'-O-метилгуанозин, 2'-O-метилуридин, 2'-O-метилтимидин и/или 2'-O-метиладенозин. AON IL-34, раскрытые в настоящем документе, могут включать один или несколько химически модифицированных нуклеозидов, в которых химически модифицированные нуклеозиды содержат основания, включающие 5-метилпиримидин, например, 5-метилцитозин и/или 5-метилпурин, например, 5-метилгуанин. AON IL-34, раскрытые в настоящем документе, могут включать любые из следующих химически модифицированных нуклеозидов: 5-метил-2'-O-метилцитидин, 5-метил-2'-O-метилтимидин, 5-метилцитидин, 5-метилуридин и/или 5-метил-2'-дезокситидин.

[0143] Согласно некоторым вариантам осуществления, AON IL-34, раскрытые в настоящем документе, включают AON IL-34, включающий нуклеотидную последовательность: 5'-CTCACCAAGACCCACAG-3' (SEQ ID NO:1), в которой по меньшей мере один нуклеозид представляет собой химически модифицированный нуклеозид, и/или по меньшей мере одна связь представляет собой модифицированную межнуклеозидную связь; 5'-GGCTTTGGGCCGCACCAGCT-3' (SEQ ID NO:2), в которой по меньшей мере один нуклеозид представляет собой химически модифицированный нуклеозид, и/или по меньшей мере одна связь представляет собой модифицированную межнуклеозидную связь; 5'-CTTTGGGCCGCACCAGCTTC-3' (SEQ ID NO:3), в которой по меньшей мере один нуклеозид представляет собой химически модифицированный нуклеозид, и/или по меньшей мере одна связь представляет собой модифицированную межнуклеозидную связь; 5'-TGGGCCGCACCAGCTTCAGG-3' (SEQ ID NO:4), в которой по меньшей мере один нуклеозид представляет собой химически модифицированный нуклеозид, и/или по меньшей мере одна связь представляет собой модифицированную межнуклеозидную связь; 5'-TCCATGACCCGGAAGCAGTT-3' (SEQ ID NO:5), в которой по меньшей мере один нуклеозид представляет собой химически модифицированный нуклеозид, и/или по меньшей мере одна связь представляет собой модифицированную межнуклеозидную связь; или 5'-TGTTTCATGTACTGAAG-3' (SEQ ID NO:6), в которой по меньшей мере один нуклеозид представляет собой химически модифицированный нуклеозид, и/или по меньшей мере одна связь представляет собой модифицированную межнуклеозидную связь, или ее фармацевтически приемлемую соль.

[0144] Согласно некоторым вариантам осуществления, AON IL-34 содержит нуклеотидную последовательность из SEQ ID NO:3, в которой по меньшей мере один нуклеозид представляет собой химически модифицированный нуклеозид. Например, согласно некоторым вариантам осуществления, третий цитидин (от 5'-конца) из SEQ ID NO:3 может быть замещен химически модифицированным нуклеозидом. Согласно некоторым вариантам осуществления, третий цитидин (от 5'-конца) из SEQ ID NO:3 замещен 5-метилцитидином, с получением в результате AON IL-34, содержащего нуклеотидную последовательность из SEQ ID NO:7. Согласно некоторым вариантам осуществления, нуклеозид, отличный от третьего цитидина (от 5'-конца) из SEQ ID NO:3, замещен химически модифицированным нуклеозидом, с получением в результате AON IL-34, имеющего нуклеотидную последовательность, отличную от SEQ ID NO:7. Согласно некоторым вариантам осуществления, третий цитидин (от 5'-конца) из SEQ ID NO:3 замещен химически модифицированным нуклеозидом, не представляющим собой 5-

метилцитидин, с получением в результате AON IL-34, имеющего нуклеотидную последовательность, отличную от SEQ ID NO:7.

[0145] Согласно некоторым вариантам осуществления, AON IL-34 содержит нуклеотидную последовательность из SEQ ID NO:5, в которой по меньшей мере один нуклеозид представляет собой химически модифицированный нуклеозид. Например, согласно некоторым вариантам осуществления, пятый цитидин (от 5'-конца) из SEQ ID NO:5 может быть замещен химически модифицированным нуклеозидом. Согласно некоторым вариантам осуществления, пятый цитидин (от 5'-конца) из SEQ ID NO:5 замещен 5-метилцитидином, с получением в результате AON IL-34, содержащего нуклеотидную последовательность из SEQ ID NO:8. Согласно некоторым вариантам осуществления, нуклеозид, отличный от пятого цитидина (от 5'-конца) из SEQ ID NO:3 замещен химически модифицированным нуклеозидом, с получением в результате AON IL-34, имеющего нуклеотидную последовательность, отличную от SEQ ID NO:8. Согласно некоторым вариантам осуществления, пятый цитидин (от 5'-конца) из SEQ ID NO:3 замещен химически модифицированным нуклеозидом, не представляющим собой 5-метилцитидин, с получением в результате AON IL-34, имеющего нуклеотидную последовательность, отличную от SEQ ID NO:8.

[0146] AON IL-34, раскрытые в настоящем документе, также включают AON IL-34, включающие один или несколько LNA-нуклеотидов. Например, AON IL-34, раскрытые в настоящем документе, включают AON IL-34, включающий нуклеотидную последовательность из любой из следующих:

- 5'-cttTGGGCXGCACCAGCttc-3' (SEQ ID NO:9), в которой с представляет собой LNA-цитидин, t представляет собой LNA-тимидин, и X представляет собой 5-метилцитидин;

- 5'-ctttGGGCXGCACCAGcttc-3' (SEQ ID NO:10), в которой с представляет собой LNA-цитидин, t представляет собой LNA-тимидин, и X представляет собой 5-метилцитидин;

- 5'-cttTGGGCcgCACCAGCttc-3' (SEQ ID NO:11), в которой с представляет собой LNA-цитидин, t представляет собой LNA-тимидин, и g представляет собой LNA-гуанозин;

- 5'-cttTGGGCcGCACCAGCttc-3' (SEQ ID NO:12), в которой с представляет собой LNA-цитидин, и t представляет собой LNA-тимидин;

- 5'-ggcXGCACCAGCttc-3' (SEQ ID NO:13), в которой с представляет собой LNA-цитидин, t представляет собой LNA-тимидин, g представляет собой LNA-гуанозин, и X представляет собой 5-метилцитидин;

- 5'-cttTGGGCXGCACcag-3' (SEQ ID NO:14), в которой c представляет собой LNA-цитидин, t представляет собой LNA-тимидин, g представляет собой LNA-гуанозин, а представляет собой LNA-аденозин, и X представляет собой 5-метилцитидин; и

- 5'-tgaCCXGGAAGCAgtt-3' (SEQ ID NO:15), в которой a представляет собой LNA-аденозин, t представляет собой LNA-тимидин, g представляет собой LNA-гуанозин, и X представляет собой 5-метилцитидин,

или их фармацевтически приемлемой соли.

[0147] Согласно некоторым вариантам осуществления, AON IL-34 содержит нуклеотидную последовательность из SEQ ID NO:3, в которой по меньшей мере один нуклеозид представляет собой LNA. Например, согласно некоторым вариантам осуществления, каждый из первого и двадцатого нуклеозида из SEQ ID NO:3 (относительно 5'-конца) независимо замещен LNA-цитидином; каждый из второго, третьего, восемнадцатого и девятнадцатого нуклеозидов из SEQ ID NO:3 независимо замещен LNA-тимидином; и девятый нуклеозид из SEQ ID NO:3 замещен 5-метилцитидином, с получением в результате AON IL-34, содержащего нуклеотидную последовательность из SEQ ID NO:9.

[0148] Согласно другому варианту осуществления, каждый из первого, семнадцатого и двадцатого нуклеозидов из SEQ ID NO:3 (относительно 5'-конца) независимо замещен LNA-цитидином; каждый из второго, третьего, четвертого, восемнадцатого и девятнадцатого нуклеозидов из SEQ ID NO:3 независимо замещен LNA-тимидином; и девятый нуклеозид из SEQ ID NO:3 замещен 5-метилцитидином, с получением в результате AON IL-34, содержащего нуклеотидную последовательность из SEQ ID NO:10.

[0149] Согласно другому варианту осуществления, каждый из первого, девятого и двадцатого нуклеозидов из SEQ ID NO:3 (относительно 5'-конца) независимо замещен LNA-цитидином; каждый из второго, третьего, восемнадцатого и девятнадцатого нуклеозидов из SEQ ID NO:3 независимо замещен LNA-тимидином; и десятый нуклеозид из SEQ ID NO:3 замещен LNA-гуанозином, с получением в результате AON IL-34, содержащего нуклеотидную последовательность из SEQ ID NO:11.

[0150] Согласно другому варианту осуществления, каждый из первого, девятого и двадцатого нуклеозидов из SEQ ID NO:3 (относительно 5'-конца) независимо замещен LNA-цитидином; и каждый из второго, третьего, восемнадцатого и девятнадцатого нуклеозидов из SEQ ID NO:3 независимо замещен LNA-тимидином, с получением в результате AON IL-34, содержащего нуклеотидную последовательность из SEQ ID NO:12.

[0151] Согласно другим вариантам осуществления, один или несколько нуклеозид(ов) в SEQ ID NO:3 могут быть замещены LNA-нуклеотидами, отличными от замещенных в любой одной из SEQ ID NO:9, 10, 11 или 12. Согласно другим вариантам осуществления, SEQ ID NO:3 может быть замещена LNA-нуклеотидами в одном или нескольких положениях, отличных от положений, замещенных в любой одной из SEQ ID NO:9, 10, 11 или 12.

[0152] Согласно конкретным вариантам осуществления, AON IL-34 включает 2'-МОЕ-нуклеозиды, и последовательность AON IL-34 выбрана из одной из следующих:

- 5'-C_xT_xT_xT_xG_xGGCXGCACCAG_xC_xT_xT_xC_x-3' (SEQ ID NO:16), в которой C_x представляет собой 2'-O-(2-метоксиэтил)цитидин, T_x представляет собой 2'-O-(2-метоксиэтил)тимидин, G_x представляет собой 2'-O-(2-метоксиэтил)гуанозин, и X представляет собой 5-метилцитидин;

- 5'-T_xC_xC_xA_xT_xGACCXGGAAGC_xA_xG_xT_xT_x-3' (SEQ ID NO:17), в которой C_x представляет собой 2'-O-(2-метоксиэтил)цитидин, T_x представляет собой 2'-O-(2-метоксиэтил)тимидин, G_x представляет собой 2'-O-(2-метоксиэтил)гуанозин, A_x представляет собой 2'-O-(2-метоксиэтил)аденозин, и X представляет собой 5-метилцитидин;

- 5'-C_xT_xT_xT_xG_xG_xGCXGCACC A_xG_xC_xT_xT_xC_x-3' (SEQ ID NO:18), в которой C_x представляет собой 2'-O-(2-метоксиэтил)цитидин, T_x представляет собой 2'-O-(2-метоксиэтил)тимидин, G_x представляет собой 2'-O-(2-метоксиэтил)гуанозин, A_x представляет собой 2'-O-(2-метоксиэтил)аденозин, и X представляет собой 5-метилцитидин;

- 5'-T_xC_xC_xA_xT_xG_xACCXGGAAGC_xA_xG_xT_xT_x-3' (SEQ ID NO:19), в которой C_x представляет собой 2'-O-(2-метоксиэтил)цитидин, T_x представляет собой 2'-O-(2-метоксиэтил)тимидин, G_x представляет собой 2'-O-(2-метоксиэтил)гуанозин, A_x представляет собой 2'-O-(2-метоксиэтил)аденозин, и X представляет собой 5-метилцитидин;

- 5'-C_xT_xT_xT_xG_xG_xG_xC_xXG_xC_xA_xC_xC_xA_xG_xC_xT_xT_xC_x-3' (SEQ ID NO:20), в которой C_x представляет собой 2'-O-(2-метоксиэтил)цитидин, T_x представляет собой 2'-O-(2-метоксиэтил)тимидин, G_x представляет собой 2'-O-(2-метоксиэтил)гуанозин, A_x представляет собой 2'-O-(2-метоксиэтил)аденозин, и X представляет собой 5-метилцитидин; и

- 5'-T_xC_xC_xA_xT_xG_xA_xC_xC_xXG_xG_xA_xA_xG_xC_xA_xG_xT_xT_x-3' (SEQ ID NO:21), в которой C_x представляет собой 2'-O-(2-метоксиэтил)цитидин, T_x представляет собой 2'-O-(2-метоксиэтил)тимидин, G_x представляет собой 2'-O-(2-метоксиэтил)гуанозин, A_x

представляет собой 2'-*O*-(2-метоксиэтил)аденозин, и X представляет собой 5-метилцитидин,

или их фармацевтически приемлемой соли.

[0153] Например, согласно некоторым вариантам осуществления, AON IL-34 содержит нуклеотидную последовательность из SEQ ID NO:3, в которой по меньшей мере один нуклеозид представляет собой 2'-МОЕ-нуклеозид. Например, согласно некоторым вариантам осуществления, каждый из первого, семнадцатого и двадцатого нуклеозидов из SEQ ID NO:3 (относительно 5'-конца) независимо замещен 2'-*O*-(2-метоксиэтил)цитидином; каждый из второго, третьего, четвертого, восемнадцатого и девятнадцатого нуклеозидов из SEQ ID NO:3 независимо замещен 2'-*O*-(2-метоксиэтил)тимидином; каждый из пятого и шестнадцатого нуклеозидов из SEQ ID NO:3 независимо замещен 2'-*O*-(2-метоксиэтил)гуанозином; и девятый нуклеозид из SEQ ID NO:3 замещен 5-метилцитидином, с получением в результате AON IL-34, содержащего нуклеотидную последовательность из SEQ ID NO:16.

[0154] Согласно некоторым вариантам осуществления, каждый из первого, семнадцатого и двадцатого нуклеозидов из SEQ ID NO:3 (относительно 5'-конца) независимо замещен 2'-*O*-(2-метоксиэтил)цитидином; каждый из второго, третьего, четвертого, восемнадцатого и девятнадцатого нуклеозидов из SEQ ID NO:3 независимо замещен 2'-*O*-(2-метоксиэтил)тимидином; каждый из пятого, шестого и шестнадцатого нуклеозидов из SEQ ID NO:3 независимо замещен 2'-*O*-(2-метоксиэтил)гуанозином; пятнадцатый нуклеозид из SEQ ID NO:3 замещен 2'-*O*-(2-метоксиэтил)аденозином; и девятый нуклеозид из SEQ ID NO:3 замещен 5-метилцитидином, с получением в результате AON IL-34, содержащего нуклеотидную последовательность из SEQ ID NO:18.

[0155] Согласно некоторым вариантам осуществления, каждый из первого, восьмого, одиннадцатого, тринадцатого, четырнадцатого, семнадцатого и двадцатого нуклеозидов из SEQ ID NO:3 (относительно 5'-конца) независимо замещен 2'-*O*-(2-метоксиэтил)цитидином; каждый из остатков тимидина из SEQ ID NO:3 независимо замещен 2'-*O*-(2-метоксиэтил)тимидином; каждый из остатков гуанозина из SEQ ID NO:3 независимо замещен 2'-*O*-(2-метоксиэтил)гуанозином; каждый из остатков аденозина из SEQ ID NO:3 независимо замещен 2'-*O*-(2-метоксиэтил)аденозином; и девятый нуклеозид из SEQ ID NO:3 замещен 5-метилцитидином, с получением в результате AON IL-34, содержащего нуклеотидную последовательность из SEQ ID NO:20.

[0156] Согласно другим вариантам осуществления, один или несколько нуклеозид(ов) в SEQ ID NO:3 могут быть замещены 2'-МОЕ-нуклеозидами, отличными от замещенных в любой одной из SEQ ID NO:16, 18 или 20. Согласно другим вариантам

осуществления, SEQ ID NO:3 может быть замещена 2'-МОЕ-нуклеозидами в одном или нескольких положениях, отличных от положений, замещенных в любой одной из SEQ ID NO:16, 18 или 20.

[0157] Согласно некоторым вариантам осуществления, AON IL-34 содержит нуклеотидную последовательность из SEQ ID NO:5, в которой по меньшей мере один нуклеозид представляет собой 2'-МОЕ-нуклеозид. Например, согласно некоторым вариантам осуществления, каждый из первого, пятого, девятнадцатого и двадцатого нуклеозидов из SEQ ID NO:5 (относительно 5'-конца) независимо замещен 2'-*O*-(2-метоксиэтил)тимидином; каждый из второго, третьего и шестнадцатого нуклеозидов из SEQ ID NO:5 независимо замещен 2'-*O*-(2-метоксиэтил)цитидином; каждый из четвертого и семнадцатого нуклеозидов из SEQ ID NO:5 независимо замещен 2'-*O*-(2-метоксиэтил)аденозином; восемнадцатый нуклеозид из SEQ ID NO:5 замещен 2'-*O*-(2-метоксиэтил)гуанозином; и десятый нуклеозид из SEQ ID NO:5 замещен 5-метилцитидином, с получением в результате AON IL-34, содержащего нуклеотидную последовательность из SEQ ID NO:17.

[0158] Согласно некоторым вариантам осуществления, каждый из первого, пятого, девятнадцатого и двадцатого нуклеозидов из SEQ ID NO:5 (относительно 5'-конца) независимо замещен 2'-*O*-(2-метоксиэтил)тимидином; каждый из второго, третьего и шестнадцатого нуклеозидов из SEQ ID NO:5 независимо замещен 2'-*O*-(2-метоксиэтил)цитидином; каждый из четвертого и семнадцатого нуклеозидов из SEQ ID NO:5 независимо замещен 2'-*O*-(2-метоксиэтил)аденозином; каждый из шестого, пятнадцатого и восемнадцатого нуклеозидов из SEQ ID NO:5 независимо замещен 2'-*O*-(2-метоксиэтил)гуанозином; и десятый нуклеозид из SEQ ID NO:5 замещен 5-метилцитидином, с получением в результате AON IL-34, содержащего нуклеотидную последовательность из SEQ ID NO:19.

[0159] Согласно некоторым вариантам осуществления, каждый из второго, третьего, восьмого, девятого и шестнадцатого нуклеозидов из SEQ ID NO:5 (относительно 5'-конца) независимо замещен 2'-*O*-(2-метоксиэтил)цитидином; каждый из остатков тимидина из SEQ ID NO:5 независимо замещен 2'-*O*-(2-метоксиэтил)тимидином; каждый из остатков гуанозина из SEQ ID NO:5 независимо замещен 2'-*O*-(2-метоксиэтил)гуанозином; каждый из остатков аденозина из SEQ ID NO:5 независимо замещен 2'-*O*-(2-метоксиэтил)аденозином; и десятый нуклеозид из SEQ ID NO:5 замещен 5-метилцитидином, с получением в результате AON IL-34, содержащего нуклеотидную последовательность из SEQ ID NO:21.

[0160] Согласно другим вариантам осуществления, один или несколько нуклеозид(ов) в SEQ ID NO:5 могут быть замещены 2'-МОЕ-нуклеозидами, отличными от замещенных в любой одной из SEQ ID NO:17, 19 или 21. Согласно другим вариантам осуществления, SEQ ID NO:5 может быть замещена 2'-МОЕ-нуклеозидами в одном или нескольких положениях, отличных от положений, замещенных в любой одной из SEQ ID NO:17, 19 или 21.

[0161] Кроме того, согласно некоторым вариантам осуществления, AON IL-34 включает 2'-ОМе-нуклеозиды, и последовательность AON IL-34 выбрана из одной из следующих:

- 5'-CyTyTyTyGyGGCXGCACCAGyCyTyTyCy-3' (SEQ ID NO:22), в которой Cy представляет собой 2'-*O*-метилцитидин, Tu представляет собой 2'-*O*-метилтимидин, Gu представляет собой 2'-*O*-метилгуанозин, и X представляет собой 5-метилцитидин; и

- 5'-TyCyCyAuTyGACCCXGGAAGCyAuGyTyTy-3' (SEQ ID NO:23), в которой Cy представляет собой 2'-*O*-метилцитидин, Tu представляет собой 2'-*O*-метилтимидин, Gu представляет собой 2'-*O*-метилгуанозин, Au представляет собой 2'-*O*-метиладенозин, и X представляет собой 5-метилцитидин,

или их фармацевтически приемлемой соли.

[0162] Например, согласно некоторым вариантам осуществления, AON IL-34 содержит нуклеотидную последовательность из SEQ ID NO:3, в которой по меньшей мере один нуклеозид представляет собой 2'-ОМе-нуклеозид. Например, согласно некоторым вариантам осуществления, каждый из первого, семнадцатого и двадцатого нуклеозидов из SEQ ID NO:3 (относительно 5'-конца) независимо замещен 2'-*O*-метилцитидином; каждый из второго, третьего, четвертого, восемнадцатого и девятнадцатого нуклеозидов из SEQ ID NO:3 независимо замещен 2'-*O*-метилтимидином; каждый из пятого и шестнадцатого нуклеозидов из SEQ ID NO:3 независимо замещен 2'-*O*-метилгуанозином; и девятый нуклеозид из SEQ ID NO:3 замещен 5-метилцитидином, с получением в результате AON IL-34, содержащего нуклеотидную последовательность из SEQ ID NO:22.

[0163] Согласно другим вариантам осуществления, один или несколько нуклеозид(ов) в SEQ ID NO:3 могут быть замещены 2'-ОМе-нуклеозидами, отличными от замещенных в SEQ ID NO:22. Согласно другим вариантам осуществления, SEQ ID NO:3 может быть замещена 2'-ОМе-нуклеозидами в одном или нескольких положениях, отличных от положений, замещенных в SEQ ID NO:22.

[0164] Согласно некоторым вариантам осуществления, AON IL-34 содержит нуклеотидную последовательность из SEQ ID NO:5, в которой по меньшей мере один нуклеозид представляет собой 2'-ОМе-нуклеозид. Например, согласно некоторым

вариантам осуществления, каждый из первого, пятого, девятнадцатого и двадцатого нуклеозидов из SEQ ID NO:5 (относительно 5'-конца) независимо замещен 2'-*O*-метилтимидином; каждый из второго, третьего и шестнадцатого нуклеозидов из SEQ ID NO:5 независимо замещен 2'-*O*-метилцитидином; каждый из четвертого и семнадцатого нуклеозидов из SEQ ID NO:5 независимо замещен 2'-*O*-метиладенозином; восемнадцатый нуклеозид из SEQ ID NO:5 замещен 2'-*O*-метилгуанозином; и десятый нуклеозид из SEQ ID NO:5 замещен 5-метилцитидином, с получением в результате AON IL-34, содержащего нуклеотидную последовательность из SEQ ID NO:23.

[0165] Согласно другим вариантам осуществления, один или несколько нуклеозид(ов) в SEQ ID NO:5 могут быть замещены 2'-ОМе-нуклеозидами, отличными от замещенных в SEQ ID NO:23. Согласно другим вариантам осуществления, SEQ ID NO:5 может быть замещена 2'-ОМе-нуклеозидами в одном или нескольких положениях, отличных от положений, замещенных в SEQ ID NO:23.

[0166] AON IL-34, раскрытые в настоящем документе, могут включать фосфатный остов, в котором одна или несколько из олигонуклеозидных связей представляют собой модифицированную межнуклеозидную связь. Например, согласно некоторым вариантам осуществления, AON IL-34, раскрытые в настоящем документе, могут содержать по меньшей мере одну фосфатную связь. AON IL-34, раскрытые в настоящем документе, могут включать одну или несколько модифицированных межнуклеозидных связей, выбранных из группы, состоящей из фосфоротиоатной связи, фосфородитиоатной связи, фосфотриэфирной связи, алкилфосфонатной связи, аминоалкилфосфотриэфирной связи, алкиленфосфонатной связи, фосфинатной связи, фосфорамидатной связи, аминоалкилфосфорамидатной связи, тиофосфорамидатной связи, тионоалкилфосфонатной связи, тионоалкилфосфотриэфирной связи, тиофосфатной связи, селенофосфатной связи и боранофосфатной связи. Согласно некоторым вариантам осуществления AON IL-34, раскрытых в настоящем документе, по меньшей мере одна межнуклеозидная связь из нуклеотидной последовательности представляет собой фосфоротиоатную связь. Например, согласно некоторым вариантам осуществления AON IL-34, раскрытых в настоящем документе, одна, две, три или более межнуклеозидных связей из нуклеотидной последовательности представляют собой фосфоротиоатную связь. Согласно предпочтительным вариантам осуществления AON IL-34, раскрытых в настоящем документе, все межнуклеозидные связи из нуклеотидной последовательности представляют собой фосфоротиоатные связи. Таким образом, согласно некоторым вариантам осуществления, все нуклеотидные связи AON IL-34 из любой из SEQ ID NO:1-23 представляют собой фосфоротиоатные связи. Например, согласно некоторым

вариантам осуществления, все нуклеотидные связи AON IL-34 из SEQ ID NO:3 представляют собой фосфоротриатные связи. В другом примере, согласно некоторым вариантам осуществления, все нуклеотидные связи AON IL-34 из SEQ ID NO:7 представляют собой фосфоротриатные связи. Согласно некоторым вариантам осуществления, одна или несколько из нуклеотидных связей AON IL-34 из любой из SEQ ID NO:1-23 представляют собой фосфоротриатные связи. Например, согласно некоторым вариантам осуществления, одна или несколько из нуклеотидных связей AON IL-34 из SEQ ID NO:3 представляют собой фосфоротриатные связи. В другом примере, согласно некоторым вариантам осуществления, одна или несколько из нуклеотидных связей AON IL-34 из SEQ ID NO:7 представляют собой фосфоротриатные связи.

[0167] Предусматривают, что, согласно некоторым вариантам осуществления, раскрытый AON IL-34, или его фармацевтически приемлемая соль, может, необязательно иметь по меньшей мере одно модифицированное нуклеиновое основание, например, 5-метилцитозин, и/или по меньшей мере один метилфосфонатный нуклеотид, который помещен, например, либо только на одном из 5'- или 3'-концов, либо на обоих 5'- и 3'-концах, либо на протяжении олигонуклеотидной последовательности.

[0168] Предусмотренные AON IL-34 могут, необязательно, включать по меньшей мере один модифицированный сахар. Например, группа сахара по меньшей мере одного из нуклеотидов, составляющих олигонуклеотид, представляет собой рибозу, в которой 2'-ОН-группа может быть заменена на любую, выбранную из группы, состоящей из OR, R, R'OR, SH, SR, NH₂, NR₂, N₃, CN, F, Cl, Br и I (где R представляет собой алкил или арил, и R' представляет собой алкилен).

[0169] Согласно некоторым вариантам осуществления, раскрытым в настоящем документе, AON IL-34 представляет собой гэтамерное соединение. Гэтамерные соединения представляют собой олигонуклеотидные последовательности, включающие 5'- и 3'-фланкирующие группы модифицированных нуклеотидов. Считают, что эти фланкирующие группы модифицированных нуклеотидов защищают внутреннюю группу нуклеотидов от деградации нуклеазами. Внутренняя группа нуклеотидов обычно имеет длину от 6 до 10 нуклеотидов. Каждая 5'- или 3'-группа фланкирующих нуклеотидов может иметь длину 3, 4, 5, 6 или более нуклеотидов. 5'- и 3'-группа фланкирующих нуклеотидов в гэтамерном соединении может иметь длину одинаковое количество нуклеотидов. Фланкирующие группы модифицированных нуклеотидов включают, например, 2'-MOE, 2'-OMe и LNA-нуклеотиды. Последовательности гэтамерных соединений могут также содержать модификации, включающие модифицированные межнауклеозидные связи (например, фосфоротриатные связи), 2'-MOE-, 2'-OMe-, LNA,

PNA, 5-метилцитидин и другие химически модифицированные нуклеозиды, раскрытые в настоящем документе.

[0170] Антисмысловые олигонуклеотиды можно конструировать таким образом, что нацеливающая часть включенной нуклеотидной последовательности каждого антисмыслового олигонуклеотида является полностью или почти полностью комплементарной последовательности мРНК IL-34 или последовательности мРНК партнера по взаимодействию IL-34. Включение таких комплементарных или почти комплементарных нуклеотидных последовательностей позволяет конструировать антисмысловые олигонуклеотиды с высокой степенью специфичности для данной мишени. Специфичность можно оценивать посредством измерения таких параметров, как константа диссоциации, или других критериев, таких как изменения уровней экспрессии белка или РНК, или других анализов, измеряющих активность или экспрессию IL-34.

Аутоиммунные и воспалительные заболевания

[0171] Настоящее изобретение относится, частично, к лечению воспалительных нарушений, связанных с активностью IL-34, у нуждающегося в этом пациента, предусматривающему введение раскрытого антисмыслового соединения. Согласно некоторым вариантам осуществления, настоящее изобретение относится к способам лечения воспалительного заболевания у нуждающегося в этом пациента, предусматривающим введение раскрытого антисмыслового соединения. Согласно некоторым вариантам осуществления настоящего изобретения, эффективное количество раскрытого ингибитора IL-34, например, антисмыслового олигонуклеотида IL-34, можно вводить нуждающемуся в этом пациенту для лечения воспалительного заболевания, например, для ингибирования продукции воспалительного цитокина в клетках пациента, страдающего воспалительным заболеванием, и/или для уменьшения или ингибирования опосредованного IL-34 воспалительного ответа.

[0172] «Воспалительное заболевание», в рамках изобретения, относится к ряду острых и хронических воспалительных нарушений, включая, но без ограничения, воспалительное заболевание кишечника, ревматоидный артрит, псориаз, остеоартрит, диабет (типа I и II), отторжение ткани или органа, рассеянный склероз, воспаление пародонта (например, периодонтит), пигментный виллезнодулярный синовит, гепатит, синусит, рак толстого кишечника, болезнь коронарных артерий, синдром Шегрена (SS), ожирение, хроническое воспаление, легочный саркоидоз, кожные повреждения, воспалительное заболевание ЦНС или аутоиммунное заболевание.

[0173] Согласно некоторым вариантам осуществления, настоящее изобретение относится к способам лечения кожных повреждений, ассоциированных с волчанкой, у

нуждающегося в этом пациента, предусматривающим введение раскрытого соединения. Согласно некоторым вариантам осуществления, лечение кожных повреждений, ассоциированных с волчанкой, имеет по меньшей мере один эффект, выбранный из уменьшения количества кожных повреждений, уменьшения скорости образования кожных повреждений и уменьшения тяжести кожных повреждений. Настоящее изобретение относится к способам лечения волчанки и/или волчаночного нефрита у страдающего ими пациента, предусматривающим введение раскрытого антисмыслового соединения. Согласно некоторым вариантам осуществления, настоящее изобретение относится к способам замедления прогрессирования состояния почки, ассоциированного с волчанкой.

[0174] Настоящее изобретение относится к способам лечения, уменьшения риска развития или задержки начала воспалительного заболевания ЦНС у нуждающегося в этом субъекта, предусматривающим введение раскрытого соединения. Способы предусматривают, например, лечение субъекта, подверженного риску развития воспалительного заболевания ЦНС; например, введение субъекту эффективного количества раскрытого ингибитора IL-34, например, антисмыслового олигонуклеотида IL-34. Воспалительное заболевание ЦНС, которое можно лечить этим способом, включает рассеянный склероз, экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит, болезнь Альцгеймера, боковой амиотрофический склероз (ALS) и болезнь Паркинсона.

[0175] Настоящее изобретение относится также к способам лечения, уменьшения риска развития, или задержки начала аутоиммунного заболевания у нуждающегося в этом субъекта, предусматривающим введение раскрытого соединения, например, ингибитора IL-34, например, антисмыслового олигонуклеотида IL-34, раскрытого в настоящем документе. Способы предусматривают лечение субъекта с аутоиммунным заболеванием или подверженного риску развития аутоиммунного заболевания. Аутоиммунные заболевания которое можно лечить этим способом, включают ревматоидный артрит, диабет типа I, астму, хроническое обструктивное заболевание легких (COPD) и идиопатический легочный фиброз.

Воспалительное заболевание кишечника

[0176] Настоящее изобретение относится также к способам лечения воспалительного заболевания кишечника у нуждающегося в этом пациента, предусматривающим введение раскрытого соединения. «Воспалительное заболевание кишечника», в рамках изобретения, относится к ряду хронических воспалительных заболеваний, включая болезнь Крона, воспалительную болезнь Крона, фиброзно-стриктурирующую болезнь Крона, болезнь Крона желудка и двенадцатиперстной кишки,

(гранулематозный) колит Крона, язвенный колит, коллагенозный колит, лимфоцитарный колит, ишемический колит, диверсионный колит, болезнь Бехчета, микроскопический колит, язвенный проктит, проктосигмоидит, еюноилеит, левосторонний колит, панколит, илеоколит, илеит и неуточненный колит. Болезнь Крона и язвенный колит являются двумя наиболее распространенными формами воспалительного заболевания кишечника. Воспалительные заболевания кишечника представляют собой аутоиммунные заболевания пищеварительной системы. Болезнь Крона может быть локализована в любой части желудочно-кишечного тракта, включая терминальный отдел подвздошной кишки, и может затрагивать все типы клеток желудочно-кишечного тракта. Язвенный колит локализован в толстой кишке и прямой кишке, и поражает только клетки слизистой оболочки.

[0177] Воспалительная болезнь Крона характеризуется аномальным иммунным ответом, который вызывает избыточное желудочно-кишечное воспаление. Воспалительная болезнь Крона наиболее часто поражает стенки кишечника, включая части тонкого и/или толстого кишечника, например, подвздошной кишки и толстой кишки. Воспалительная болезнь Крона также ассоциирована с развитием толстой и опухшей ткани, так же как язв. Мутации в генах, которые играют роль в функции иммунной системы (например, NOD2, ATG16L1, IL23R и IRGM), являются ассоциированными с болезнью Крона, как и в генах, ассоциированных с надлежащей аутофагией.

[0178] Фиброзно-стриктурирующая болезнь Крона представляет собой форму болезни Крона включающую возникновение фибростенозных очагов/фиброзных стриктур желудочно-кишечного тракта. Фиброзные стриктуры являются более часто ассоциированными с болезнью Крона подвздошной кишки, в отличие от толстой кишки. Воспаление, как правило, предшествует развитию стриктур. Стриктуры могут являться ассоциированными с любым из следующих симптомов: спазмы в животе, боль в области живота, вздутие и вздутие живота, потеря аппетита, утомляемость, тошнота, рвота и констипация. Более чем 50% пациентов, страдающих болезнью Крона, испытывают фибростеноз.

[0179] Фиброзные стриктуры являются ассоциированными с экспрессией на клеточной поверхности рецептора IL-17A и увеличенной продукцией коллагена, включая подтипы I, III и V коллагена. Фиброзные стриктуры также являются ассоциированными с совместным возникновением свищей. Стриктуры гистологически характеризуются присутствием смеси воспалительных и мезенхимальных клеток с отложением избытка внеклеточного матрикса (ECM). Активированные мезенхимальные клетки кишечника

накапливают компоненты ЕСМ, включая фибронектин и коллаген (например, коллаген типов III и IV). Считают, что дезорганизованная пролиферация гладких мышц и избыточное отложение ЕСМ модифицируют механические свойства стенотической ткани кишечника, что приводит к увеличенной жесткости и сужению кишечного тракта, ассоциированным с фиброзными стриктурами. Присутствие фиброзных стриктур приводит к аномалиям ткани кишечника в слизистом, подслизистом и мышечном слоях стенки кишечника.

[0180] Как факторы внешней среды, так и генетические факторы считают играющими роль в воспалительных заболеваниях кишечника, хотя идентичность таких факторов не является хорошо определенной. Например, привычное курение удваивает риск развития болезни Крона. Компоненты внешней среды могут включать изменения в флоре кишечника, на которые влияет воздействие употребляемых внутрь пищевых продуктов и лекарственных средств.

[0181] Воспалительные заболевания кишечника ассоциированы с симптомами, включающими боль в области живота, рвоту, диарею, ректальное кровотечение, тяжелые колики, мышечные спазмы, потерю массы, недостаточность питания, лихорадку, анемию, кожные повреждения, боль в суставах, воспаление глаза, повреждения печени, артрит, гангренозную пиодермию, первичный склерозирующий холангит и синдром нетиреоидных заболеваний, и предусмотрено также лечение этих симптомов с использованием раскрытого антисмыслового соединения, согласно одному варианту осуществления, например, лечение детей, страдающих язвенным колитом, которые могут также страдать дефектами роста.

Кишечный фиброз

[0182] Кишечный фиброз обычно возникает в результате реакции ткани кишечника на воспаление, такое как хроническое воспаление, вызванное воспалительным заболеванием кишечника (IBD). При IBD, увеличенные уровни SMAD7 блокируют экспрессию противовоспалительных генов, опосредованную активацией пути TGF- β и фосфорилированием Smad2/3. Миофибробласты, подвергнутые воздействию увеличенной передачи сигналов TGF- β , продуцируют увеличенные количества коллагена. В контексте болезни Крона, персистирующее и хроническое воспаление способствует фиброзным процессам, приводящим в результате к формированию стриктур, включая стриктуры тонкого кишечника и толстого кишечника.

[0183] Кишечный фиброз можно идентифицировать посредством любого количества способов визуализации, таких как ультразвуковое исследование с контрастированием. См., например, Quaia *et al.* The value of small bowel wall contrast

enhancement after sulfur hexafluoride-filled microbubble injection to differentiate inflammatory from fibrotic strictures in patients with Crohn's disease. *Ultrasound Med. Biol.* 38, 1324–1332 (2012); Nylund *et al.* Quantitative contrast-enhanced ultrasound comparison between inflammatory and fibrotic lesions in patients with Crohn's disease. *Ultrasound Med. Biol.* 39, 1197–1206 (2013); Stidham *et al.* Ultrasound elasticity imaging for detecting intestinal fibrosis and inflammation in rats and humans with Crohn's disease. *Gastroenterology* 141, 819–826 (2011). Можно использовать также способы MRI, такие как MRI с переносом намагниченности. См., например, Maccioni *et al.* Value of T2-weighted magnetic resonance imaging in the assessment of wall inflammation and fibrosis in Crohn's disease. *Abdom. Imaging* 37, 944–957 (2012); Adler *et al.* Magnetization transfer helps detect intestinal fibrosis in an animal model of Crohn disease. *Radiology* 259, 127–135 (2011); Pazahr *et al.* Magnetization transfer for the assessment of bowel fibrosis in patients with Crohn's disease: initial experience. *Magn. Reson. Mat. Phys. Biol. Med.* 26, 291–301 (2013).

Фиброз

[0184] Способы предотвращения или лечения фиброза, такого как фиброз печени, легочный фиброз и/или кишечный фиброз, формируют часть настоящего изобретения. Такие способы могут предусматривать введение нуждающемуся в этом пациенту или подверженному риску пациенту фармацевтического препарата, содержащего ингибитор IL-34, например, антисмысловой олигонуклеотид IL-34, раскрытый в настоящем документе. Например, настоящее изобретение относится к способу предотвращения или лечения фиброза печени, предусматривающему введение нуждающемуся в этом пациенту ингибитора IL-34, например, антисмыслового олигонуклеотида IL-34, раскрытого в настоящем документе. Альтернативно, настоящее изобретение относится к способу предотвращения или лечения кишечного фиброза, предусматривающему введение нуждающемуся в этом пациенту ингибитора IL-34, например, антисмыслового олигонуклеотида IL-34, раскрытого в настоящем документе. Альтернативно, настоящее изобретение относится к способу предотвращения или лечения легочного фиброза, предусматривающему введение нуждающемуся в этом пациенту ингибитора IL-34, например, антисмыслового олигонуклеотида IL-34, раскрытого в настоящем документе.

[0185] Пациенты, подвергнутые лечению с использованием вышеуказанного способа, могут иметь или могут не иметь поддающийся детекции фиброз. Согласно некоторым вариантам осуществления, пациент имеет по меньшей мере приблизительно 5%, 10%, 20%, 30%, 40% или даже 50% или более уменьшение уровня фиброза, присутствующего у пациента, после введения антисмыслового олигонуклеотида IL-34, через, например, 1 сутки, 2 суток, 1 неделю, 1 месяц или 6 месяцев или более. Введение

такого ингибитора IL-34, например, антисмыслового олигонуклеотида IL-34, можно проводить, например, на по меньшей мере ежесуточной основе. Соединение можно вводить перорально. Задержка клинического проявления фиброза у пациента как следствие введения ингибитора IL-34, например, антисмыслового олигонуклеотида IL-34, раскрытого в настоящем документе, может составлять по меньшей мере, например, 6 месяцев, 1 год, 18 месяцев или даже 2 года или более, по сравнению с пациентом, которому не вводили ингибитор IL-34, такой как раскрытый в настоящем документе.

[0186] Нуждающийся в лечении пациент может иметь фиброз печени, развившийся в цирроз. Пациент, подверженный риску фиброза печени, может включать пациентов с гепатитом В, гепатитом С или неалкогольным стеатогепатитом (NASH). NASH включен в спектр заболеваний неалкогольной жировой инфильтрации печени, включая стеатоз и цирроз. NASH является компонентом метаболического синдрома, который характеризуется ожирением, сахарным диабетом типа 2 и дислипидемией, и может в конечном счете приводить к печеночно-клеточной карциноме.

[0187] Настоящее изобретение относится также к способам лечения нарушений, ассоциированных с фиброзом печени, таким как лечение по меньшей мере одного из: конкретных болезней накопления и врожденных нарушений метаболизма, таких как дефицит альфа-1-антитрипсина, болезни накопления меди (например, болезнь Вильсона), фруктоземия, галактоземия, болезни накопления гликогена (например, типов III, IV, VI, IX и X), синдромы перенасыщения железом (например, гемохроматоз), аномалии метаболизма липидов (например, болезнь Гоше), пероксисомные нарушения (например, синдром Целвегера) и тирозинемия; бактериальные инфекции (например, бруцеллез); паразитарные инфекции (например, эхинококкоз); NASH; вирусные инфекции (например, гепатит В или гепатит С, включая хронический гепатит В или С); синдром Бадда-Киари; сердечная недостаточность; веноокклюзионная болезнь печени; и тромбоз воротной вены. Предусмотрены также способы лечения врожденного фиброза печени. Композицию можно вводить перорально.

[0188] Злоупотребление лекарственными средствами и/или алкоголем было связано со случаями фиброза печени. Настоящее изобретение относится к способам лечения фиброза печени у пациента со злоупотреблением лекарственными средствами и/или алкоголем в анамнезе. Например, у пациента со злоупотреблением в анамнезе по меньшей мере одним из следующих: алкоголь, амиодарон, хлорпромазин, изониазид, метотрексат, метилдопа, оксифенизатин и толбутамид.

[0189] Пациент, подверженный риску кишечного фиброза, может включать пациентов с язвенным колитом, воспалительным заболеванием кишечника или болезнью

Крона. Пациент, подверженный риску, может также включать пациентов с постановкой диагноза в раннем возрасте болезни Крона или колита, с обширным и/или тяжелым заболеванием толстой кишки, пациентов с присутствием первичного склерозирующего холангита и/или пациентов с семейным анамнезом злокачественных опухолей.

[0190] Настоящее изобретение относится также к способам лечения нарушений, ассоциированных с кишечным фиброзом, таким как лечение по меньшей мере одного из: язвенного колита, воспалительного заболевания кишечника или болезни Крона.

[0191] Настоящее изобретение относится к способам предотвращения или лечения почечного фиброза, сердечного фиброза, эндомикардиального фиброза, идиопатического легочного фиброза, миелофиброза, ретроперитонеального фиброза или нефрогенного системного фиброза, предусматривающим введение нуждающемуся в этом пациенту фармацевтического препарата, содержащего ингибитор IL-34, например, антисмысловой олигонуклеотид IL-34, такой как антисмысловой олигонуклеотид IL-34, раскрытый в настоящем документе.

[0192] Ингибиторы IL-34 по изобретению, включая, например, AON IL-34, можно использовать отдельно или в комбинации друг с другом, причем по меньшей мере два ингибитора IL-34 по изобретению используют совместно в одной композиции или в качестве части режима лечения. Ингибиторы IL-34 по изобретению можно также использовать в комбинации с другими лекарственными средствами для лечения злоупотребления лекарственными средствами и/или алкоголем, почечного фиброза, сердечного фиброза, эндомикардиального фиброза, идиопатического легочного фиброза, миелофиброза, ретроперитонеального фиброза или нефрогенного системного фиброза, злоупотребления лекарственными средствами и/или алкоголем.

Лечение и оценка

[0193] «Пациент» или «субъект», в рамках изобретения, относится к любому животному, подверженному риску, страдающему от или имеющему диагноз воспалительного и/или фиброзного заболевания, включая, но без ограничения, млекопитающих, приматов и человека. Согласно конкретным вариантам осуществления, пациент может представлять собой не относящееся к человеку млекопитающее, например, такое как кошка, собака или лошадь. Пациент может представлять собой индивидуума с диагнозом высокого риска развития воспалительного и/или фиброзного заболевания, индивидуума с диагнозом воспалительного и/или фиброзного заболевания, индивидуума, ранее страдавшего воспалительным и/или фиброзным заболеванием, или индивидуума, оцениваемого по симптомам или показателям воспалительного и/или фиброзного заболевания, например, сигналу экспрессии IL-34.

[0194] «Нуждающийся в этом пациент», в рамках изобретения, относится к пациенту, страдающему любым из симптомов или проявлений воспалительного и/или фиброзного заболевания, к пациенту, который может страдать любым из симптомов или проявлений воспалительного и/или фиброзного заболевания, или к любому пациенту, который может получать преимущество от способа по настоящему изобретению для лечения воспалительного и/или фиброзного заболевания. Нуждающийся в этом пациент может включать пациента с диагнозом риска развития воспалительного и/или фиброзного заболевания, пациента, страдавшего воспалительным и/или фиброзным заболеванием в прошлом, или пациента, ранее подвергнутого лечению воспалительного и/или фиброзного заболевания. Особую значимость имеют индивидуумы, страдающие воспалительным и/или фиброзным заболеванием, ассоциированным с увеличенными уровнями экспрессии или активности IL-34.

[0195] Термины «лечить», «лечение», «осуществление лечения» и аналогичные термины применяют в настоящем документе для общего обозначения получения желательного фармакологического и/или физиологического эффекта. Эффект может являться профилактическим в отношении полного или частичного предотвращения заболевания или его симптома, и/или может являться терапевтическим в отношении частичного или полного излечения заболевания и/или неблагоприятного эффекта, приписываемого заболеванию. Термин «лечение», в рамках изобретения, охватывает любое лечение заболевания у млекопитающего, в частности, человека, и включает: (a) предотвращение возникновения заболевания у субъекта, который может являться предрасположенным к заболеванию, но у которого еще не диагностировано его наличие; (b) подавление заболевания, т.е., предотвращение увеличения тяжести или объема заболевания; (c) смягчение заболевания, т.е., вызов частичного или полного облегчения заболевания; или (d) предотвращение рецидива заболевания, т.е., предотвращение возвращения заболевания в активное состояние после предшествующего успешного лечения симптомов заболевания или лечения заболевания.

[0196] «Эффективное количество» или «фармацевтически эффективное количество», в рамках изобретения, относится к количеству средства, которое является достаточным для по меньшей мере частичного лечения состояния при введении пациенту. Терапевтически эффективное количество может меняться в зависимости от тяжести состояния, способа введения компонента, и возраста, массы и т.д. пациента, подвергаемого лечению. Соответственно, эффективное количество раскрытого антисмыслового олигонуклеотида IL-34 представляет собой количество антисмыслового олигонуклеотида IL-34, необходимое для лечения воспалительного и/или фиброзного

заболевания у пациента, такое, что введение средства предотвращает возникновение воспалительного и/или фиброзного заболевания у субъекта, предотвращает прогрессирование воспалительного и/или фиброзного заболевания (например, предотвращает начало или увеличение тяжести симптомов воспалительного заболевания кишечника, таких как ректальное кровотечение, анемия или воспаление желудочно-кишечного тракта), или смягчает или полностью облегчает некоторые или все симптомы, ассоциированные с воспалительным и/или фиброзным заболеванием, например, вызывает регрессию заболевания.

[0197] Эффективность лечения можно оценивать посредством оценки макроскопических симптомов, ассоциированных с воспалительным и/или фиброзным заболеванием, анализа гистологии ткани, биохимического анализа, способов визуализации, например, таких как магнитно-резонансная томография, или других известных способов. Например, эффективность лечения можно оценивать посредством анализа макроскопических симптомов заболевания, таких как изменения боли в области живота, рвоты, диареи, ректального кровотечения, колик, мышечных спазмов, потери массы, недостаточности питания, лихорадки, анемии или других аспектов макроскопической патологии, ассоциированных с воспалительным заболеванием, после введения раскрытого антисмыслового олигонуклеотида IL-34 пациенту, страдающему воспалительным заболеванием.

[0198] Эффективность лечения можно также оценивать на тканевом или клеточном уровне, например, посредством получения биопсии ткани (например, биопсии ткани желудочно-кишечного тракта) и оценки макроскопической морфологии ткани или клетки, или свойств окрашивания. Биохимические анализы, проверяющие экспрессию белка или РНК, также можно использовать для оценки эффективности лечения. Например, можно оценивать IL-34, IL-6, IL-8, TNF-альфа или уровни другого белка или продукта гена, показательные для воспалительного и/или фиброзного заболевания, продукцию воспалительного цитокина или опосредованный IL-34 воспалительный ответ в диссоциированных клетках или в недиссоциированной ткани посредством иммуноцитохимических, иммуногистохимических способов, способов Вестерн-блоттинга, или Нозерн-блоттинга, или способов, применимых для оценки уровней РНК, таких как количественная или полуколичественная полимеразная цепная реакция. Можно оценивать также присутствие или уровень экспрессии применимых биомаркеров, обнаруженных в каловых массах, плазме или сыворотке, для оценки состояния заболевания и эффективности лечения.

[0199] При оценке эффективности лечения, можно выбирать пригодные виды контроля для обеспечения подтвержденной оценки. Например, можно сравнивать симптомы, оцененные у пациента с воспалительным и/или фиброзным заболеванием после введения раскрытого ингибитора IL-34, например, антисмыслового олигонуклеотида IL-34, с симптомами у того же самого пациента до лечения или в более ранней точке в ходе лечения, или у другого пациента, без диагноза воспалительного и/или фиброзного заболевания. Альтернативно, можно сравнивать результаты биохимического или гистологического анализа ткани желудочно-кишечного тракта после введения раскрытого ингибитора IL-34, например, антисмыслового олигонуклеотида IL-34, с результатами для ткани желудочно-кишечного тракта от того же самого пациента или от индивидуума без диагноза воспалительного и/или фиброзного заболевания, или от того же самого пациента до введения ингибитора IL-34. Кроме того, можно сравнивать образцы крови, сыворотки, клеток или кала после введения ингибитора IL-34, например, антисмыслового олигонуклеотида IL-34, со сравнительными образцами от индивидуума без диагноза воспалительного и/или фиброзного заболевания или от того же самого пациента до введения антисмыслового ингибитора IL-34.

[0200] Подтверждение ингибирования IL-34 можно осуществлять посредством прямой или опосредованной оценки уровней экспрессии или активности IL-34. Например, биохимические анализы, измеряющие экспрессию белка или РНК IL-34, можно использовать для оценки общего ингибирования IL-34. Например, можно измерять уровни белка IL-34 в ткани желудочно-кишечного тракта посредством Вестерн-блоттинга для оценки общих уровней IL-34. Можно также измерять уровни мРНК IL-34 посредством Нозерн-блоттинга или количественной полимеразной цепной реакции для определения общего ингибирования IL-34. Можно также оценивать уровни белка IL-34 или уровни другого белка, показательные для активности передачи сигналов IL-34 в диссоциированных клетках, недиссоциированной ткани, крови, сыворотке или каловых массах, посредством иммуоцитохимических или иммуногистохимических способов.

[0201] Ингибирование IL-34 можно также оценивать опосредованно посредством измерения таких параметров, как образование или пролиферация макрофагов или моноцитов, или измерения изменений других параметров, коррелирующих с изменениями активности IL-34, включая фосфорилирование MAP-киназы и другие показатели активации передачи сигналов рецептора IL-34 – рецептора макрофагального колониестимулирующего фактора (M-CSFR-1, также известного как MCSFR-1, M-CSFR1 и CSF1R). Например, можно измерять уровни активного фосфорилирования MAPK1 или MAPK3 в клетках пациента, подвергнутого лечению раскрытым ингибитором IL-34,

например, антисмысловым олигонуклеотидом IL-34, в качестве показателя активности IL-34 в указанных клетках. Можно также оценивать присутствие или уровень экспрессии применимых биомаркеров, обнаруженных в плазме, крови, каловых массах или ткани, для оценки эффективности ингибирования IL-34.

[0202] Способы лечения, раскрытые в настоящем документе, включают способы ингибирования продукции воспалительного цитокина. «Продукция воспалительного цитокина» относится к экспрессии цитокинов, инициирующих и/или стимулирующих ответ воспалительных цитокинов. «Ответ воспалительных цитокинов» относится к иммунному ответу, который может характеризоваться привлечением гранулоцитов, привлечением лимфоцитов, системным воспалением (особенно желудочно-кишечного тракта, или его части или частей), лихорадкой, разрушением ткани, шоком и/или смертью. Ответ воспалительных цитокинов может быть охарактеризован по связыванию индивидуальных цитокинов с их родственными рецепторами клеточной поверхности (например, связыванию IL-34 с CSF1R) и последующим каскадам внутриклеточной передачи сигналов, которые изменяют функции клеток и экспрессию генов. Воспалительные цитокины включают, но без ограничения, IL-1, IL-6, IL-8, IL-34 и TNF-альфа. Экспрессия воспалительных цитокинов может происходить, например, в макрофагах, моноцитах, мононуклеарных клетках собственной пластинки или других клетках желудочно-кишечного тракта или клетках иммунной системы. Способы ингибирования продукции воспалительного цитокина включают способы, уменьшающие уровни экспрессии некоторых или всех воспалительных цитокинов у пациента, страдающего воспалительным заболеванием. Способы ингибирования продукции воспалительного цитокина также включают способы, уменьшающие уровни экспрессии некоторых или всех воспалительных цитокинов в клетках пациента, страдающего воспалительным заболеванием.

[0203] Способы по настоящему изобретению для ингибирования продукции воспалительного цитокина включают способы уменьшения или ингибирования опосредованного IL-34 воспалительного ответа. «Опосредованный IL-34 воспалительный ответ», в рамках изобретения, относится к воспалительному ответу, инициируемому, облегчаемому или стимулируемому экспрессией IL-34 или активностью передачи сигналов IL-34. Опосредованный IL-34 воспалительный ответ может приводить к экспрессии воспалительных цитокинов, включая, но без ограничения, IL-34, IL-6, IL-8 или TNF-альфа, и активации передачи сигналов воспалительных цитокинов. Кроме того, опосредованный IL-34 воспалительный ответ может характеризоваться привлечением гранулоцитов, привлечением лимфоцитов, системным воспалением (особенно желудочно-

кишечного тракта, или его части или частей), лихорадкой, разрушением ткани, шоком и/или смертью. Опосредованный IL-34 воспалительный ответ может также характеризоваться активацией передачи сигналов IL-34, например, связывания IL-34 с CSF1R и фосфорилирования нижестоящих MAP-киназ. Уменьшение или ингибирование опосредованного IL-34 воспалительного ответа относится к смягчению любого или всех из клеточных и системных изменений, ассоциированных с опосредованным IL-34 воспалительным ответом. Например, уменьшение продукции воспалительного цитокина, привлечения иммунцитов или воспаления ткани может указывать на уменьшение или ингибирование опосредованного IL-34 воспалительного ответа.

[0204] Настоящее изобретение также относится к способам ингибирования IL-34 в клетках пациента, страдающего воспалительным и/или фиброзным заболеванием. IL-34 можно ингибировать в любой клетке, в которой возникает экспрессия или активность IL-34, включая клетки желудочно-кишечного тракта, иммунной системы и крови. Клетки желудочно-кишечного тракта (включая клетки стенки кишечника, желудка, двенадцатиперстной кишки, тощей кишки, толстого кишечника, тонкого кишечника, подвздошной кишки, толстой кишки, прямой кишки и анального канала), включают столбчатые эпителиальные клетки, стромальные клетки кишечника, эпителиальные клетки слизистой оболочки, зимогенные клетки, слизистые шеечные клетки, париетальные клетки, гастриновые 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, клетки естественные киллеры, клетки врожденной иммунной системы, лимфоциты, В-клетки и Т-клетки. Клетки крови включают красные клетки крови (эритроциты) и белые клетки крови (лейкоциты, моноциты и тромбоциты).

Фармацевтические композиции и способы введения

[0205] Настоящее изобретение относится также к способам лечения воспалительного и/или фиброзного заболевания посредством введения фармацевтической композиции, содержащей раскрытый ингибитор IL-34, например, антисмысловой олигонуклеотид IL-34. В другом аспекте, настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции для применения в лечении воспалительного и/или фиброзного заболевания. Фармацевтическая композиция может состоять из раскрытого ингибитора IL-34, например, антисмыслового олигонуклеотида IL-34, нацеленного на IL-34, и фармацевтически приемлемого наполнителя. В рамках изобретения, термин «фармацевтическая композиция» означает, например, смесь, содержащую указанное

количество терапевтического соединения, например, терапевтически эффективное количество терапевтического соединения в фармацевтически приемлемом наполнителе для введения млекопитающему, например, человеку, для лечения воспалительного и/или фиброзного заболевания. Согласно некоторым вариантам осуществления, настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей раскрытый ингибитор IL-34, например, антисмысловой олигонуклеотид IL-34, и фармацевтически приемлемый наполнитель. В другом аспекте настоящее изобретение относится к применению раскрытого ингибитора IL-34, например, антисмыслового олигонуклеотида IL-34, в изготовлении лекарственного средства для лечения воспалительного и/или фиброзного заболевания. «Лекарственное средство», в рамках изобретения, имеет по существу такое же значение, как термин «фармацевтическая композиция».

[0206] В рамках изобретения, «фармацевтически приемлемый наполнитель» относится к веществу, которое способствует введению действующего вещества субъекту и/или абсорбции действующего вещества у субъекта и может быть включено в композиции по настоящему изобретению без вызова значительного неблагоприятного токсикологического эффекта у пациента. К неограничивающим примерам фармацевтически приемлемых наполнителей относятся вода, NaCl, нормальные солевые растворы, такие как фосфатно-солевой буферный раствор, эмульсии (например, такие как эмульсии масло/вода или вода/масло), лактированный раствор Рингера, нормальная сахароза, нормальная глюкоза, связующие средства, наполнители, дезинтегрирующие средства, смазывающие средства, покрытия, подсластители, вкусоароматические средства, солевые растворы (такие как раствор Рингера), спирты, масла, желатины, углеводы, такие как лактоза, амилоза или крахмал, сложные эфиры жирных кислот, гидроксиметилцеллюлоза, поливинилпирролидин и окрашивающие средства, и аналогичные средства. Такие препараты можно стерилизовать и, если желательно, смешивать с вспомогательными средствами, такими как смазывающие средства, консерванты, стабилизаторы, увлажняющие средства, эмульгаторы, соли для влияния на осмотическое давление, буферы, окрашивающие средства и/или ароматические средства и аналогичные средства, которые не вступают в неблагоприятные реакции с ингибиторами IL-34 по изобретению. Примеры наполнителей см. в Martin, Remington's Pharmaceutical Sciences, 15th Ed., Mack Publ. Co., Easton, PA (1975).

[0207] Согласно одному варианту осуществления, раскрытый ингибитор IL-34, например, антисмысловой олигонуклеотид IL-34, и любую его фармацевтическую композицию можно вводить посредством одного или нескольких способов, включая местный, парентеральный, пероральный, внутривенный, интратрахеальный,

интраназальный, чрескожный или интрадуоденальный. Термин парентеральный, в рамках изобретения, включает способы подкожных инъекций, интрапанкреатического введения, внутривенной, внутримышечной, внутривентрикулярной, интратеральной инъекции или инфузии. Например, раскрытый ингибитор ПЛ-34, например, антисмысловой олигонуклеотид ПЛ-34, можно вводить подкожно субъекту. В другом примере, раскрытый ингибитор ПЛ-34, например, антисмысловой олигонуклеотид ПЛ-34, можно вводить перорально субъекту. В другом примере, раскрытый ингибитор ПЛ-34, например, антисмысловой олигонуклеотид ПЛ-34, можно вводить напрямую в желудочно-кишечную систему, или специфические области желудочно-кишечной системы (например, подвздошную кишку, толстую кишку или прямую кишку) посредством парентерального введения.

[0208] Фармацевтические композиции, содержащие ингибитор ПЛ-34, например, антисмысловой олигонуклеотид ПЛ-34, такой как раскрытые в настоящем документе, можно представлять в единичной дозированной форме и можно получать посредством любого пригодного способа. Фармацевтическую композицию следует формулировать, чтобы она являлась совместимой с намеченным способом введения. Применимые составы можно получать посредством способов, хорошо известных в области фармацевтики. Например, см. *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18th ed. (Mack Publishing Company, 1990).

[0209] Фармацевтические составы, например, являются стерильными. Стерилизацию можно осуществлять, например, посредством фильтрации через стерильные мембраны для фильтрации. Когда композиция является лиофилизированной, стерилизацию посредством фильтрации можно проводить до или после лиофилизации и разведения.

Парентеральное введение

[0210] Фармацевтические композиции по настоящему изобретению можно формулировать для парентерального введения, например, формулировать для инъекции посредством внутривенного, внутримышечного, подкожного, внутриочагового или внутривентрикулярного способов. Получение водной композиции, такой как водная фармацевтическая композиция, содержащая раскрытый ингибитор ПЛ-34, например, антисмысловой олигонуклеотид ПЛ-34, станет известным специалисту в данной области в свете настоящего раскрытия. Как правило, такие композиции можно получать в форме препаратов для инъекции, в форме либо жидких растворов, либо суспензий; можно получать также твердые формы, пригодные для применения для получения растворов или

суспензий при добавлении жидкости до инъекции; и препараты могут также являться эмульгированными.

[0211] Фармацевтические формы, пригодные для применения для инъекции, включают стерильные водные растворы или дисперсии; составы, включающие кунжутное масло, арахисовое масло или водный пропиленгликоль; и стерильные порошки для получения непосредственно перед применением стерильных пригодных для инъекции растворов или дисперсий. Во всех случаях, форма должна быть стерильной и должна быть жидкой до такой степени, чтобы существовала возможность простого введения через шприц. Она должна быть стабильной в условиях изготовления и хранения, и должна быть защищена против контаминирующего действия микроорганизмов, таких как бактерии и грибы.

[0212] Растворы активных соединений в форме свободного основания или фармакологически приемлемых солей можно получать в воде, подходящим образом смешанной с поверхностно-активным веществом, таким как гидроксипропилцеллюлоза. Дисперсии можно также получать в глицерине, жидких полиэтиленгликолях и их смесях, и в маслах. Кроме того, стерильные, нелетучие масла можно использовать в качестве растворителя или суспендирующей среды. Для этой цели можно использовать любое легкое нелетучее масло, включая синтетические моно- или диглицериды. Кроме того, жирные кислоты, такие как олеиновая кислота, можно использовать в получении препаратов для инъекции. Стерильный препарат для инъекции может также представлять собой стерильный пригодный для инъекции раствор, суспензию или эмульсию в нетоксичном приемлемом для парентерального введения разбавителе или растворителе, например, в форме раствора в 1,3-бутандиоле. Среди приемлемых применимых носителей и растворителей присутствуют вода, раствор Рингера, U.S.P., и изотонический раствор хлорида натрия. Согласно одному варианту осуществления, раскрытый ингибитор IL-34 можно суспендировать в жидком носителе или наполнителе, содержащем 1% (масс./об.) карбоксиметилцеллюлозы натрия и 0,1% (об./об.) TWEEN™ 80. В обычных условиях хранения и применения, эти препараты содержат консервант для предотвращения роста микроорганизмов.

[0213] Пригодные для инъекции препараты, например, стерильные пригодные для инъекции водные или масляные суспензии, можно формулировать в соответствии с известным уровнем техники с использованием пригодных диспергирующих или увлажняющих средств и суспендирующих средств. Как правило, дисперсии получают посредством включения различных стерилизованных активных ингредиентов в стерильный носитель, который содержит базовую диспергирующую среду и другие

необходимые ингредиенты из перечисленных выше. Стерильные пригодные для инъекции растворы по настоящему изобретению можно получать посредством включения раскрытого ингибитора IL-34, например, антисмыслового олигонуклеотида IL-34, в необходимое количество подходящего растворителя с различными другими ингредиентами, перечисленными выше, по необходимости, последующей стерилизацией посредством фильтрации. В случае стерильных порошков для получения стерильных пригодных для инъекции растворов, предпочтительные способы получения представляют собой способы сушки в вакууме и лиофилизации, приводящие к получению порошка активного ингредиента плюс любого дополнительного желательного ингредиента из его предварительно стерилизованного посредством фильтрации раствора. Пригодные для инъекции составы можно стерилизовать, например, посредством фильтрации через задерживающий бактерии фильтр.

[0214] Предусматривают также получение более или высоко концентрированных растворов для внутримышечной инъекции. В этом отношении, применение DMSO в качестве растворителя является предпочтительным, поскольку это может приводить к необычайно быстрому проникновению, доставке высоких концентраций раскрытого антисмыслового олигонуклеотида IL-34 в небольшую область.

[0215] Пригодные консерванты для применения в таком растворе включают хлорид бензалкония, хлорид бензэтония, хлорбутанол, тимеросал и аналогичные консерванты. Пригодные буферы включают борную кислоту, бикарбонат натрия и калия, бораты натрия и калия, карбонат натрия и калия 10, ацетат натрия, бифосфат натрия и аналогичные консерванты, в количествах, достаточных для поддержания pH между приблизительно pH 6 и pH 8, и например, между приблизительно pH 7 и pH 7,5. Пригодные средства для поддержания тоничности представляют собой декстран 40, декстран 70, декстрозу, глицерин, хлорид калия, пропиленгликоль, хлорид натрия и аналогичные средства, так что эквивалент хлорида натрия раствора лежит в диапазоне 0,9 плюс или минус 0,2%. Пригодные антиоксиданты и стабилизаторы включают бисульфит натрия, метабисульфит натрия, тиосульфит натрия, тиомочевину и аналогичные средства. Пригодные увлажняющие и осветляющие средства включают полисорбат 80, полисорбат 20, полоксамер 282 и тилоксапол. Пригодные увеличивающие вязкость средства включают декстран 40, декстран 70, желатин, глицерин, гидроксиэтилцеллюлозу, гидроксиметилпропилцеллюлозу, ланолин, метилцеллюлозу, вазелин, полиэтиленгликоль, поливиниловый спирт, поливинилпирролидон, карбоксиметилцеллюлозу и аналогичные средства.

Пероральное введение

[0216] Согласно некоторым вариантам осуществления, настоящее изобретение относится к композициям, пригодным для пероральной доставки раскрытого ингибитора IL-34, например, антисмыслового олигонуклеотида IL-34, например, к таблеткам, включающим кишечнорастворимое покрытие, например, устойчивое к действию желудочного сока покрытие, так что композиции могут доставлять ингибитор IL-34, например, в желудочно-кишечный тракт пациента. Например, такое введение может приводить к местному эффекту, по существу местному введению ингибитора IL-34 непосредственно в пораженную часть желудочно-кишечного тракта пациента. Такое введение может, согласно некоторым вариантам осуществления, по существу исключать нежелательную системную абсорбцию ингибитора IL-34.

[0217] Например, настоящее изобретение относится к таблетке для перорального введения, которая содержит гранулы (например, по меньшей мере частично сформирована из гранул), включающие раскрытый ингибитор IL-34, например, антисмысловой олигонуклеотид IL-34, например, антисмысловой олигонуклеотид, включающий нуклеотидную последовательность из любой из SEQ ID NO:1-23, и фармацевтически приемлемые наполнители. Такая таблетка может быть покрыта кишечнорастворимым покрытием. Предусмотренные таблетки могут включать фармацевтически приемлемые наполнители, такие как наполнители, связующие средства, дезинтегрирующие средства и/или смазывающие средства, так же как окрашивающие средства, высвобождающие средства, покрывающие средства, подсластители, вкусоароматические средства, такие как винтергрин, апельсин, ксилит, сорбит, фруктоза и мальтодекстрин, и ароматизирующие средства, консерванты и/или антиоксиданты.

[0218] Согласно некоторым вариантам осуществления, предусмотренные фармацевтические составы включают внутригранулярную фазу, включающую раскрытый ингибитор IL-34, например, антисмысловой олигонуклеотид IL-34, например, антисмысловой олигонуклеотид, включающий нуклеотидную последовательность из любой из SEQ ID NO:1-23, и фармацевтически приемлемую соль, и фармацевтически приемлемый наполнитель. Например, раскрытый ингибитор IL-34, например, антисмысловой олигонуклеотид IL-34, и наполнитель можно перемешивать вместе, необязательно, с другими наполнителями, и формировать в гранулы. Согласно некоторым вариантам осуществления, внутригранулярную фазу можно формировать с использованием влажной грануляции, например, жидкость (например, воду) добавляют к перемешиваемым ингибитору IL-34 и наполнителю, и затем комбинацию сушат, размалывают и/или просеивают для получения гранул. Специалисту в данной области

понятно, что другие способы можно использовать для получения внутригранулярной фазы.

[0219] Согласно некоторым вариантам осуществления, предусмотренные составы включают внегранулярную фазу, которая может включать один или несколько фармацевтически приемлемых наполнителей, и которую можно смешивать с внутригранулярной фазой для получения раскрытого состава.

[0220] Раскрытый состав может включать внутригранулярную фазу, включающую наполнитель. Иллюстративные наполнители включают, но без ограничения, целлюлозу, желатин, фосфат кальция, лактозу, сахарозу, глюкозу, маннит, сорбит, микрокристаллическую целлюлозу, пектин, полиакрилаты, декстрозу, ацетат целлюлозы, гидроксипропилметилцеллюлозу, частично прежелатинизированный крахмал, карбонат кальция и другие, включая их комбинации.

[0221] Согласно некоторым вариантам осуществления, раскрытый состав может включать внутригранулярную фазу и/или внегранулярную фазу, включающую связующее средство, которое может в общем функционировать для удержания вместе ингредиентов фармацевтического состава. Иллюстративные связующие средства по настоящему изобретению могут включать, но без ограничения, следующие: крахмалы, сахара, целлюлоза или модифицированная целлюлоза, такая как гидроксипропилцеллюлоза, лактоза, прежелатинизированный кукурузный крахмал, поливинилпирролидон, гидроксипропилцеллюлоза, гидроксипропилметилцеллюлоза, гидроксипропилцеллюлоза с низкой степенью замещения, карбоксиметилцеллюлоза натрия, метилцеллюлоза, этилцеллюлоза, сахарные спирты и другие, включая их комбинации.

[0222] Предусмотренные составы, например, включающие внутригранулярную фазу и/или внегранулярную фазу, могут включать дезинтегрирующее средство, такое как, но без ограничения, крахмал, целлюлоза, перекрестно сшитый поливинилпирролидон, натриевая соль гликолята крахмала, карбоксиметилцеллюлоза натрия, альгинаты, кукурузный крахмал, кроскармеллоза натрия, перекрестно сшитая карбоксиметилцеллюлоза, гидроксипропилцеллюлоза с низкой степенью замещения, камедь и другие, включая их комбинации. Например, внутригранулярная фаза и/или внегранулярная фаза могут включать дезинтегрирующее средство.

[0223] Согласно некоторым вариантам осуществления, предусмотренный состав включает внутригранулярную фазу, содержащую раскрытый ингибитор IL-34, например, антисмысловой олигонуклеотид IL-34, и наполнители, выбранные из: маннита, микрокристаллической целлюлозы, гидроксипропилметилцеллюлозы и натриевой соли гликолята крахмала или их комбинаций, и внегранулярную фазу, содержащую одно или

несколько из: микрокристаллической целлюлозы, натриевой соли гликолята крахмала и стеарата магния, или их смеси.

[0224] Согласно некоторым вариантам осуществления, предусмотренный состав может включать смазывающее средство, например, внегранулярная фаза может содержать смазывающее средство. Смазывающие средства включают, но без ограничения, тальк, силикагель, 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.

[0225] Согласно некоторым вариантам осуществления, фармацевтический состав содержит кишечнорастворимое покрытие. Как правило, кишечнорастворимые покрытия создают барьер для перорального лекарственного средства, который контролирует локализацию, в которой лекарственное средство абсорбируется на протяжении пищеварительного тракта. Кишечнорастворимые покрытия могут включать полимер, дезинтегрирующийся с различными скоростями, в соответствии с pH. Кишечнорастворимые покрытия могут включать например, ацетат-фталат целлюлозы, сополимеры метилакрилата-метакриловой кислоты, ацетат-сукцинат целлюлозы, гидроксилпропилметил целлюлоза фталат, сополимеры метилметакрилата-метакриловой кислоты, сополимеры этилакрилата-метакриловой кислоты, сополимер метакриловой кислоты типа C, поливинилацетат-фталат и ацетат-фталат целлюлозы.

[0226] Иллюстративные кишечнорастворимые покрытия включают покрытия квалификации Opadry[®] AMB, Acryl-EZE[®], Eudragit[®]. Согласно некоторым вариантам осуществления, кишечнорастворимое покрытие может содержать 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% предусмотренной таблетки по массе. Например, кишечнорастворимые покрытия могут включать сополимер этилакрилата-метакриловой кислоты.

[0227] Например, согласно предусмотренному варианту осуществления, настоящее изобретение относится к таблетке, которая содержит или в основном состоит 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 ингибитора IL-34, например, антисмыслового олигонуклеотида IL-34 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, включающую от приблизительно 30% до приблизительно 60%, например, от приблизительно 45% до приблизительно 65% по массе, или альтернативно, от приблизительно 5 до приблизительно 10% по массе раскрытого ингибитора IL-34, например, антисмыслового олигонуклеотида IL-34, от приблизительно 30% до приблизительно 50%, или альтернативно, 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% натриевой соли гликолята крахмала по массе.

[0228] Согласно другому предусмотренному варианту осуществления, фармацевтический состав таблетки для перорального введения раскрытого ингибитора IL-34, например, антисмыслового олигонуклеотида IL-34, содержит внутригранулярную фазу, в котором внутригранулярная фаза включает раскрытый ингибитор IL-34 или его фармацевтически приемлемую соль (такую как натриевая соль) и фармацевтически приемлемый наполнитель, и который может также включать внегранулярную фазу, которая может включать фармацевтически приемлемый наполнитель, такой как дезинтегрирующее средство. Внегранулярная фаза может включать компоненты, выбранные из микрокристаллической целлюлозы, стеарата магния, и их смеси. Фармацевтическая композиция может также включать кишечнорастворимое покрытие, приблизительно 12% - 20% по массе таблетки. Например, фармацевтически приемлемая таблетка для перорального применения может содержать приблизительно от 0,5% до 10% по массе раскрытого ингибитора IL-34, например, антисмыслового олигонуклеотида IL-34 или его фармацевтически приемлемой соли, приблизительно от 30% до 50% по массе маннита, приблизительно от 10% до 30% по массе микрокристаллической целлюлозы и кишечнорастворимое покрытие, содержащее сополимер этилакрилата-метакриловой кислоты.

[0229] В другом примере, фармацевтически приемлемая таблетка для перорального применения может содержать внутригранулярную фазу, содержащую от приблизительно

5 до приблизительно 10% по массе раскрытого ингибитора IL-34, например, антисмыслового олигонуклеотида IL-34 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 натриевой соли гликолята крахмала; внегранулярную фазу, содержащую приблизительно 17% по массе микрокристаллической целлюлозы, приблизительно 2% по массе натриевой соли гликолята крахмала, приблизительно 0,4% по массе стеарата магния; и кишечнорастворимое покрытие поверх таблетки, содержащее сополимер этилакрилата-метакриловой кислоты.

[0230] Согласно некоторым вариантам осуществления, фармацевтическая композиция может содержать кишечнорастворимое покрытие, содержащее приблизительно 13% или приблизительно 15%, 16%, 17% или 18% по массе, например, AсугlEZE® (см., например, публикацию РСТ №. WO2010/054826, полное содержание которой, таким образом, включено в настоящий документ посредством ссылки).

[0231] Скорость, в точке которой покрытие растворяется, и активный ингредиент высвобождается, представляет собой его скорость растворения. Согласно одному варианту осуществления, предусмотренная таблетка может иметь профиль растворения, например, при котором при тестировании в устройстве USP/EP типа 2 (лопастном) при 100 об./мин и 37°C в фосфатном буфере с pH 7,2, от приблизительно 50% до приблизительно 100% ингибитора IL-34 высвобождается через от приблизительно 120 минут до приблизительно 240 минут, например, через 180 минут. Согласно другому варианту осуществления, предусмотренная таблетка может иметь профиль растворения, например, при котором при тестировании в устройстве USP/EP типа 2 (лопастном) при 100 об./мин и 37°C в разведенной HCl с pH 1,0, по существу никакое количество ингибитора IL-34 не высвобождается через 120 минут. Предусмотренная таблетка, согласно другому варианту осуществления, может иметь профиль растворения, например, при котором при тестировании в устройстве USP/EP типа 2 (лопастном) при 100 об./мин и 37°C в фосфатном буфере с pH 6,6, от приблизительно 10% до приблизительно 30%, или не более чем приблизительно 50%, ингибитора IL-34 высвобождается через 30 минут.

[0232] Предусмотренные составы, например, таблетки, согласно некоторым вариантам осуществления, при пероральном введении пациенту, могут приводить к минимальной концентрации в плазме ингибитора IL-34, например, антисмыслового олигонуклеотида IL-34, у пациента. Согласно другому варианту осуществления, раскрытые составы, при пероральном введении пациенту, местно доставляются в толстую

кишку или прямую кишку пациента, например, в затронутый или пораженный заболеванием участок организма пациента.

[0233] Согласно некоторым вариантам осуществления, способы, представленные в настоящем документе, могут дополнительно предусматривать введение по меньшей мере одного другого средства, направленного на лечение заболеваний и нарушений, раскрытых в настоящем документе. Согласно одному варианту осуществления, предусмотренные другие средства можно вводить совместно (например, последовательно или одновременно).

[0234] Предусмотренные средства включают иммуносупрессивные средства, включая глюкокортикоиды, цитостатики, антитела, средства, действующие на иммунофилины, интерфероны, опиоиды, связывающие TNF белки, микофенолят и малые биологические средства. Например, предусмотренные иммуносупрессивные средства включают, но без ограничения, такролимус, циклоспорин, пимекролимус, сиролимус, эверолимус, микофеноловую кислоту, финголимод, дексаметазон, флударабин, циклофосфамид, метотрексат, азатиоприн, лефлуномид, терифлуномид, анакинра, антитимоцитарный глобулин, антилимфоцитарный глобулин, муромонаб-CD3, афутузумаб, ритуксимаб, теплизумаб, эфализумаб, даклизумаб, базиликсимаб, адалимумаб, инфликсимаб, цертолизумаб пэгол, натализумаб и этанерцепт. Другие предусмотренные средства включают антибиотики, противодиарейные средства, слабительные средства, обезболивающие средства, содержащие железо добавки и содержащие кальций или витамин D или B-12 добавки.

Доза и частота введения

[0235] Иллюстративные составы включают лекарственные формы, включающие или в основном состоящие из от приблизительно 35 мг до приблизительно 500 мг раскрытого ингибитора IL-34, например, антисмыслового олигонуклеотида IL-34. Например, составы, включающие 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 ингибитора IL-34, например, антисмыслового олигонуклеотида IL-34, предусмотрены в настоящем документе. Согласно одному варианту осуществления, состав может включать приблизительно 40 мг, 80 мг или 160 мг раскрытого ингибитора IL-34, например, антисмыслового олигонуклеотида IL-34. Согласно некоторым вариантам осуществления, состав может включать по меньшей мере 100 мкг раскрытого ингибитора IL-34, например, антисмыслового олигонуклеотида IL-34. 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 ингибитора IL-34, например, антисмыслового олигонуклеотида

IL-34. Вводимое количество может зависеть от таких переменных, как тип и степень заболевания или показания, подлежащего лечению, общее состояние здоровья и рост пациента, активность *in vivo* ингибитора IL-34, фармацевтический состав и способ введения. Исходную дозу можно увеличивать больше верхнего уровня, для быстрого достижения желательного уровня в крови или уровня в ткани. Альтернативно, исходная доза может быть меньше оптимальной, и дозу можно последовательно увеличивать в ходе лечения. Дозу для человека можно оптимизировать, например, в общепринятом исследовании фазы I с повышением дозы, разработанном для исследования от 40 мг до 160 мг. Частоту дозирования можно менять, в зависимости от таких факторов, как способ введения, уровень дозирования и заболевание, подлежащее лечению. Приведенные в качестве примера частоты дозирования представляют собой один раз в сутки, один раз в неделю и один раз в каждые две недели. Согласно некоторым вариантам осуществления, дозирование проводят один раз в сутки в течение 7 суток.

Диагностические способы

[0236] Настоящее изобретение также относится к способу диагностики у пациента воспалительного и/или фиброзного заболевания, основанному на детекции уровней сигнала экспрессии IL-34 в одном или нескольких биологических образцах от пациента. В рамках изобретения, термин «сигнал экспрессии IL-34» может относиться к любому показателю экспрессии гена IL-34, или активности гена или продукта гена. Продукты гена IL-34 включают РНК (например, мРНК), пептиды и белки. Показатели экспрессии гена IL-34, которые можно оценивать, включают, но без ограничения, состояние гена IL-34 или хроматина, взаимодействие гена IL-34 с клеточными компонентами, которые регулируют экспрессию гена, уровни экспрессии продукта гена IL-34 (например, уровни экспрессии РНК IL-34, уровни экспрессии белка IL-34), или взаимодействие РНК или белка IL-34 с аппаратом транскрипции, трансляции или посттрансляционного процессинга. Показатели активности продукта гена IL-34 включают, но без ограничения, оценку активности передачи сигналов IL-34 (например, оценку активации CSF1R или фосфорилирования MAPK1/MAPK3) и оценку связывания рецептора IL-34 (например, связывания CSF1R).

[0237] Детекцию сигнала экспрессии IL-34 можно осуществлять посредством способов *in vivo*, *in vitro* или *ex vivo*. Согласно предпочтительному варианту осуществления, способы по настоящему изобретению можно осуществлять *in vitro*. Способы детекции могут предусматривать детекцию в крови, сыворотке, каловых массах, ткани или клетках пациента. Детекцию можно осуществлять посредством измерения сигнала экспрессии IL-34 в цельной ткани, эксплантатах ткани, культурах клеток, диссоциированных клетках, экстракте клеток или жидкостях организма, включая кровь

или сыворотку. Предусмотренные способы детекции включают анализы, измеряющие уровни экспрессии продукта гена IL-34, такие как Вестерн-блоттинг, FACS, ELISA, другие количественные анализы связывания, анализы роста клеток или ткани, Нозерн-блоттинг, количественная или полуколичественная полимеразная цепная реакция, способы медицинской визуализации (например, MRI) или способы иммуноокрашивания (например, иммуногистохимии или иммуноцитохимии).

Примеры

[0238] Настоящее изобретение далее проиллюстрировано посредством следующих примеров. Примеры представлены только для иллюстративных целей, и их не следует рассматривать как ограничивающие объем или содержание изобретения каким-либо образом.

Пример 1: Линии клеток CRC HT-29 экспрессируют IL-34 на высоких уровнях

[0239] Для оценки экспрессии IL-34 в линиях клеток CRC человека, экспрессию мРНК IL-34 анализировали посредством RT-ПЦР в линиях клеток CRC человека DLD-1, HT-29 и HCT-116, и в линии клеток нормального эпителия кишечника NCM-460. Уровни экспрессии мРНК IL-34 нормализовали с использованием уровней мРНК β-актина в качестве эталона. Как показано на фиг. 1, экспрессия мРНК IL-34 являлась обильной в клетках HT-29.

Пример 2: Конструирование и оценка антисмысловых олигонуклеотидов IL-34

[0240] Антисмысловые олигонуклеотиды IL-34 из SEQ ID NO:1-4, комплементарные последовательностям мРНК IL-34 мыши и человека, конструировали и получали с фосфоротиоатными остовами. Нокдаун экспрессии IL-34 оценивали в линиях клеток человека HT-29 и мыши RAW 264.7. Клетки HT-29 (ATCC Manassas, Virginia, USA) культивировали в среде Мак-Коя 5A (Lonza, Verviers, Belgium), дополненной 10% FBS, 1% P/S (все от Lonza) и поддерживали при 37°C с 5% CO₂ в увлажненном инкубаторе. Мышиные макрофаги RAW264.7 (ATCC Manassas, Virginia, USA) культивировали в среде Игла в модификации Дульбекко (1 г/л глюкозы) с 10% FBS, 1% P/S и 1% заменимых аминокислот (NEA) (все от Lonza) и поддерживали при 37°C с 5% CO₂ в увлажненном инкубаторе. Клетки либо оставляли необработанными, либо трансфицировали специфическим AON IL-34 или рандомизированным AON с использованием среды Opti-MEM и реагента липофектамина 3000 (Life Technologies, Milan, Italy), в соответствии с инструкциями производителя. Выделяли тотальные РНК и белок.

[0241] Нокдаун оценивали посредством полимеразной цепной реакции с детекцией в реальном времени (RT-ПЦР) в клетках HT-29. RT-ПЦР проводили следующим образом: постоянное количество РНК (0,5 мкг/образец) подвергали обратной транскрипции в комплементарную ДНК (кДНК). Затем 1 мкл кДНК/образец амплифицировали с использованием следующего способа: денатурация в течение 1 минуты при 95°C; гибридизация в течение 30 секунд при 60°C, с последующими 30 секундами удлинения при 72°C. Использовали следующие последовательности праймеров: IL-34 прямой, 5'-ACAGGAGCCGACTTCAGTAC-3' (SEQ ID NO:29); IL-34 обратный, 5'-ACCAAGACCCACAGATACCG-3' (SEQ ID NO:30); β -актин прямой, 5'-AAGATGACCCAGATCATGTTTGAGACC-3' (SEQ ID NO:31); и β -актин обратный, 5'-AGCCAGTCCAGACGCAGGAT-3' (SEQ ID NO:32). Экспрессию мРНК рассчитывали относительно экспрессии мРНК β -актина.

[0242] Клетки HT-29 трансфицировали AON IL-34 человека из SEQ ID NO:1, 2, 3 или 4, или рандомизированным отрицательным контрольным олигонуклеотидом (Src AS; 5'-AACACGTCTATACGC-3' (SEQ ID NO:33)) в течение 24 часов (фиг. 2A, AS34New1-4, эквиваленты SEQ ID NO:1-4, соответственно). Транскрипты IL-34 оценивали посредством RT-ПЦР, и значения нормализовали по β -актину. Трансфекция клеток HT-29 AON IL-34 из SEQ ID NO:1 и 3 значительно уменьшала экспрессию мРНК IL-34, как оценено посредством RT-ПЦР (фиг. 2A; Src AS против AS34New1, $p=0,03$; Src AS против AS34New3, $p=0,03$; данные выражены как среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего (SEM)).

[0243] Нокдаун оценивали также посредством Вестерн-блоттинга в клетках HT-29 и клетках RAW 264.7. Вестерн-блоттинг проводили следующим образом: после трансфекции, клетки лизировали на льду в буфере, содержащем 10 mM HEPES (pH 7,9), 10 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 0,2 mM EGTA и 0,5% Nonidet P40, дополненным 1 mM дитиотреитолом, 10 мг/мл аprotинина, 10 мг/мл лейпептина, 1 mM фенилметилсульфонилфторидом, 1 mM Na_3VO_4 и 1 mM NaF. Лизаты осветляли посредством центрифугирования при 4°C, 12000xg в течение 30 минут и разделяли электрофорезом в 10% геле из додецилсульфата натрия-полиакриламида. IL-34 детектировали с использованием антитела мыши против IL-34 человека (конечное разведение 1:1000; Abcam Cambridge, UK), в комбинации с конъюгированным с пероксидазой хрена (HRP) вторичным моноклональным антителом IgG (конечное разведение 1:20000; Dako, Milan, Italy). Реакцию HRP детектировали с использованием хемилюминесцентного набора с увеличенной чувствительностью (Pierce, Rockford, IL). После анализа, блоты отмывали и анализировали с использованием в качестве зонда

антитела мыши против β -актина человека (конечное разведение 1:5000; Sigma-Aldrich), с последующим конъюгированным с HRP вторичным моноклональным антителом IgG (конечное разведение 1:20000; Dako).

[0244] На фиг. 2B показано, что трансфекция клеток HT-29 рандомизированным контрольным олигонуклеотидом для IL-34 или AON IL-34 AS34New1 или 3 приводила к уменьшению экспрессии белка IL-34. На фиг. 2C показано, что трансфекция клеток RAW 264.7 рандомизированным контрольным олигонуклеотидом для IL-34 или AON IL-34 AS34New1 или 3 приводила к уменьшению экспрессии белка IL-34.

[0245] Нокдаун IL-34 посредством AON IL-34 AS34New1 и 3 дополнительно оценивали в ассоциированных с фиброзно-стриктурирующей болезнью Крона и раком фибробластах. Фибробласты кишечника выделяли из эксплантатов кишечника для рака толстого кишечника или фиброзно-стриктурирующей CD (FS CD). Фибробласты использовали свежими или между пассажами 3 и 8. Фибробласты культивировали в DMEM с высоким содержанием глюкозы с глутамином Ultra, дополненной 10% FBS, 1% P/S (Lonza) и поддерживали при 37°C с 5% CO₂ в увлажненном инкубаторе. Фибробласты открепляли с использованием раствора трипсина/EDTA. Трансфекция эксплантатов FS CD с использованием AS34New1 или 3 приводила к видимо увеличенному нокдауну IL-34, по сравнению с эксплантатами FS CD, трансфицированными с использованием Src AS (фиг. 3A). Трансфекция ассоциированных с раком фибробластов с использованием AS34New3 приводила к видимо увеличенному нокдауну IL-34, по сравнению с фибробластами, трансфицированными Src AS (фиг. 3B).

[0246] Эффективность нокдауна для AON IL-34, включающего модификацию 5-метилцитозина (AON IL-34 из SEQ ID NO:7), тестировали в линиях клеток HT-29, RAW 264.7 и MC-38. MC38 представляет собой мышиную линию клеток. Клетки MC-38 (ATCC Manassas, Virginia, USA) культивировали в среде Мак-Коя 5A, дополненной 10% FBS и 1% P/S (Lonza), и поддерживали при 37°C с 5% CO₂ в увлажненном инкубаторе. Все линии клеток трансфицировали с использованием AON IL-34 в течение 24 часов, после чего уровни IL-34 и β -актина анализировали посредством Вестерн-блоттинга. Клетки трансфицировали с использованием AON IL-34 с фосфоротиоатным остовом из SEQ ID NO:1, 3 или 7 (New1-PS, New-3-PS, New-3-PS-MEC, соответственно; фиг. 4A, 4B, 4C) или рандомизированных контрольных олигонуклеотидов (Контроль ASNew-1-PS, Контроль ASNew-3-PS). Трансфекция с использованием AON IL-34 из SEQ ID NO:7, включающим 5-метилцитозин, приводила к увеличенному нокдауну IL-34, относительно трансфекции всеми другими тестируемыми AON (фиг. 4A, 4B и 4C). Эти результаты показывают, что

AON IL-34, включая AON IL-34 из SEQ ID NO:7, являлись способными к нокдауну экспрессии мРНК и белка IL-34 в линиях клеток мыши и человека.

Пример 3: M-CSFR-1 является сверхэкспрессированным в фиброзных стриктурах при болезни Крона

[0247] Экспрессию M-CSFR-1 оценивали в образцах для подвздошнокишечной воспалительной CD (I CD) и FS-CD от пациентов с CD посредством RT-ПЦР. Хирургические образцы получали от 10 пациентов с I CD, подвергаемых хирургической операции из-за хронического активного заболевания с плохой способностью отвечать на медикаментозное лечение, и от 27 пациентов с FS CD, подвергаемых хирургической операции. Подвздошнокишечные контрольные (КОНТР.) образцы представляли собой образцы слизистой оболочки, полученные из макроскопически и микроскопически не пораженных областей от 27 пациентов, подвергаемых хирургической операции из-за рака толстого кишечника. Каждый пациент, принимавший участие в исследовании, предоставлял письменное информированное согласие, и протокол исследования был одобрен местными этическими комитетами.

[0248] RT-ПЦР проводили следующим образом: РНК (0,5 мкг/образец) подвергали обратной транскрипции в кДНК. 1 мкл кДНК/образец амплифицировали с использованием следующих условий: денатурация в течение 1 минуты при 95°C; гибридизация в течение 30 секунд при 58°C для M-CSFR-1 или 60°C для β -актина, с последующими 30 секундами удлинения при 72°C. Использовали следующие последовательности праймеров: M-CSFR-1 прямой, 5'-CTGCTCAACTTTCTGCGAAG-3' (SEQ ID NO:34); M-CSFR-1 обратный, 5'-CTCATCTCCACATAGGTGTC-3' (SEQ ID NO:35); β -актин прямой, 5'-AAGATGACCCAGATCATGTTTGAGACC-3' (SEQ ID NO:31); и β -актин обратный, 5'-AGCCAGTCCAGACGCAGGAT-3' (SEQ ID NO:32). Экспрессию мРНК рассчитывали относительно экспрессии мРНК β -актина.

[0249] RT-ПЦР для оценки экспрессии M-CSFR-1 проводили, как раскрыто выше, в образцах для контроля, I CD и FS CD. Уровни транскриптов мРНК M-CSFR-1 были увеличены у пациентов с I CD по сравнению с CTR (фиг. 5A). Кроме того, уровни транскриптов мРНК M-CSFR-1 были увеличены в образцах FS CD, по сравнению с образцами для I CD и подвздошнокишечного КОНТР. (фиг. 5A; Подвздошн. КОНТР. против I CD, $p=0,003$; I CD против FS CD, $p=0,01$; среднее $\pm$ SEM).

[0250] Вестерн-блоттинг образцов для I CD и FS CD проводили для оценки экспрессии M-CSFR-1. Клетки лизировали на льду в буфере, содержащем 10 mM HEPES (pH 7,9), 10 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 0,2 mM EGTA и 0,5% Nonidet P40, дополненном 1 mM дитиотреитолом, 10 мг/мл аprotинина, 10 мг/мл лейпептина, 1 mM

фенилметилсульфонилфторидом, 1 mM Na_3VO_4 , и 1 mM NaF. Лизаты осветляли посредством центрифугирования при 4°C в течение 30 минут и разделяли электрофорезом в 10% геле из додецилсульфата натрия-полиакриламида. После переноса белка на мембрану, мембраны инкубировали с антителом кролика против M-CSFR-1 человека (1:500, Novus Biological Southpark Way, USA), с последующим конъюгированным с HRP вторичным моноклональным антителом IgG (конечное разведение 1:20000, Dako, Milan, Italy). Реакцию HRP детектировали с использованием хемилюминесцентного набора с увеличенной чувствительностью (Pierce, Rockford, IL). После анализа, блоты отмывали и инкубировали с антителом мыши против β -актина человека (конечное разведение 1:5000, Sigma-Aldrich). Компьютеризированную сканирующую денситометрию (Image-Lab 5.2.1, Bio-Rad Laboratories, Milan, Italy) использовали для анализа интенсивности иммунореактивных полос.

[0251] Экстракция белка и детекция посредством Вестерн-блоттинга M-CSFR-1 в образцах I CD, FS CD и КОНТР. подтвердили, что экспрессия M-CSFR-1 при I CD больше, чем экспрессия в КОНТР., и экспрессия при FS CD увеличена, относительно образцов как КОНТР., так и I CD (фиг. 5B и 5C; Подвздошн. КОНТР. против I CD, $p=0,03$; I CD против FS CD, $p=0,01$; среднее $\pm$ SEM).

[0252] Экспрессию M-CSFR-1 дополнительно оценивали посредством иммуногистохимии. Иммуногистохимию проводили на фиксированных формалином, погруженных в парафин срезах подвздошной кишки для подвздошнокишечного КОНТР., пациентов с I CD, и пациентов с FS CD. Срезы депарафинизировали и дегидратировали с использованием ксилола и этанола, и демаскировку антигена проводили в Tris-EDTA-цитратном буфере (pH 7,8) в термостатической бане при 98°C (Dako) в течение 30 минут. Иммуногистохимическое окрашивание проводили с использованием моноклонального антитела кролика, нацеленного против M-CSFR-1 человека (конечная концентрация 1:200, Novus Biological), инкубированного при комнатной температуре (RT) в течение 1 час, с последующей детекцией с использованием способа детекции HRP-полимера без биотина, с 3,3'-диаминобензидином (DAB) в качестве хромогена (набор MACH 4 Universal HRP-Polymer Kit, Biocare Medical). Срезы подвергали контрастному окрашиванию гематоксилином, дегидратировали и фиксировали. Окрашенные используемым в качестве контроля изотипа IgG срезы получали в идентичных иммуногистохимических условиях, как раскрыто выше, заменяя первичное антитело очищенным нормальным контрольным антителом IgG мыши (R&D Systems).

[0253] Иммуногистохимический анализ образцов для подвздошнокишечного контроля и FS CD показал усиленную экспрессию M-CSFR-1 в срезах для FS CD (фиг.

5E), по сравнению с контрольными срезами (фиг. 5D). Экспрессию M-CSFR-1 не наблюдали для контроля изотипа (фиг. 5F). Иммуногистохимический анализ также показал, что стромальные клетки являлись положительными по M-CSFR-1 (фиг. 5E). Эти результаты дополнительно подтверждали посредством RT-ПЦР, которая показала увеличенную экспрессию мРНК M-CSFR-1 в фибробластах, выделенных из образцов подвздошной кишки от пациентов с FS CD, по сравнению с контрольными фибробластами (фиг. 5G; Подвздошн. КОНТР. против FS CD, $p=0,04$; среднее $\pm$ SEM)). Эти результаты показывают, что экспрессия M-CSFR-1 – рецептора для IL-34 – являлась увеличенной в ткани пациентов с CD, относительно подвздошнокишечной ткани пациентов без CD. Кроме того, эти результаты показали, что экспрессия M-CSFR-1 выше в ткани при FS CD, в отличие от ткани от пациентов с I CD.

Пример 4: IL-34 индуцировал продукцию коллагена в пораженных болезнью Крона фибробластах

[0254] Регуляцию продукции коллагена в фибробластах кишечника посредством экспрессии IL-34 оценивали посредством стимуляции контрольных фибробластов кишечника с использованием IL-34. Фибробласты использовали между пассажами 3 и 8. Фибробласты поддерживали в 75 см² пластиковых флаконах и инкубировали при 37°C в увлажненной атмосфере с 5% CO₂ в D-MEM с высоким содержанием глюкозы, с глутамином Ultra и дополненной 10% эмбриональной бычьей сывороткой (FBS), 1% пенициллина (100 ед./мл), стрептомицином (100 мкг/мл) и 1% заменимых аминокислот (Lonza; Verviers, Belgium). 5x10⁴ нормальных фибробластов рассеивали в каждую лунку 12-луночного планшета, оставляли для адгезии на 24 часа, подвергали недостаточности питательных веществ в течение 6 часов, и наконец, либо оставляли нестимулированными, либо стимулировали рекомбинантным IL-34 человека (50 нг/мл, R&D Systems, Minneapolis, MN). Через 6-48 часов, клетки и бесклеточные супернатанты собирали. Клетки использовали для анализа белка и экспрессии гена, и бесклеточные супернатанты анализировали по содержанию коллагена. Следующие праймеры использовали для RT-ПЦР COL1A1 и COL3A1: COL1A1 прямой, 5'-GGACACAGAGGTTTCAGTGG-3' (SEQ ID NO:36); COL1A1 обратный, 3'-GGTGACTTTGGAGACACAGG-5' (SEQ ID NO:37); COL3A1 прямой 5'-GGAGAATGTTGTGCAGTTTGC-3' (SEQ ID NO:38); и COL3A1 обратный, 3'-CGTTTGACGTGTTGTAAGAGG-5' (SEQ ID NO:39). Следующие антитела использовали для Вестерн-блоттинга: антитело кролика против COL1A1 человека (конечное разведение 1:1000; Novus Biological, Italy) и антитело кролика против COL3A1 человека (конечное разведение 1:1000; Novus Biological)

[0255] Анализ RT-ПЦР показал, что стимуляция рекомбинантным IL-34 человека значительно усиливала продукцию транскриптов мРНК COL1A1 и COL3A1 в фибробластах, по сравнению с нестимулированными фибробластами (Нестим.; фиг. 6А, Нестим. против IL-34, $p=0,04$; фиг. 6В, Нестим. против IL-34, $p=0,03$; среднее $\pm$ SEM). Фиг. 6С представляет собой Вестерн-блот, показывающий, что стимуляция рекомбинантным IL-34 человека также значительно усиливала экспрессию белка COL1A1 и COL3A1 в фибробластах, по сравнению с нестимулированными фибробластами. Фиг. 6D и 6Е, соответственно, представляют собой столбчатые диаграммы, показывающие количественную оценку сигнала COL1A1 и COL3A1 для Вестерн-блота, показанного на фиг. 6С, нормализованного по контролю β -актину (COL1A1, Нестим. против IL-34, $p=0,03$; COL3A1, Нестим. против IL-34, $p=0,01$; среднее $\pm$ SEM).

[0256] Общее содержание коллагена также измеряли в супернатантах фибробластов с использованием набора для анализа коллагена Sircol Collagen Assay Kit, в соответствии с инструкциями производителя (Biocolor Ltd, Belfast, UK). Количественная оценка растворимых форм коллагена в супернатантах фибробластов показала, что стимуляция IL-34 приводила к увеличенному синтезу коллагена, относительно нестимулированного контроля (фиг. 6F; Нестим. против IL-34, $p=0,01$; среднее $\pm$ SEM). Эти результаты показывают, что IL-34 стимулировал продукцию коллагена в клетках фибробластов.

Пример 5: IL-34 стимулирует продукцию коллагена посредством зависимого от MAP-киназы p38 пути

[0257] Исследовали зависимость влияния IL-34 на синтез коллагена от MAP-киназы p38. IL-34 активирует MAP-киназу p38 в эпителиальных клетках, по пути передачи сигнала, который контролирует функцию фибробластов кишечника. Контрольные культивированные в среде с недостаточностью сыворотки фибробласты кишечника либо оставляли нестимулированными, либо стимулировали рекомбинантным IL-34 человека (50 нг/мл), TNF- α (25 нг/мл, R&D Systems) или IL-6 (50 нг/мл, R&D Systems) в течение 30 минут, и затем лизировали. TNF- α и IL-6 служили в качестве положительного контроля. Тотальные экстракты анализировали по содержанию как фосфорилированной (p-p38), так и общей p38 активируемой митогенами протеинкиназы (MAP), посредством Вестерн-блоттинга. Вестерн-блоттинг проводили с использованием следующих антител: антитело кролика против p-p38 человека (1:1000, EMD Millipore Corporation) и антитело мыши против общей p38 человека (конечное разведение 1:500, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Texas, USA). Стимуляция IL-34 усиливала

фосфорилирование MAP-киназы p38 в фибробластах, по сравнению с нестимулированными клетками (фиг. 7А).

[0258] Для оценки эффекта MAP-киназы p38 на индуцированную IL-34 продукцию коллагена, нормальные фибробласты предварительно инкубировали с SB202190, ингибитором p38 (10 моль/л; EMD Millipore Corporation, MA, USA) или диметилсульфоксидом (DMSO; носитель) в течение 1 час и затем стимулировали или оставляли нестимулированными с использованием IL-34 (50 нг/мл) в течение 24-48 часов. Экспрессию белка в клетках анализировали посредством Вестерн-блоттинга, и бесклеточные супернатанты анализировали по содержанию коллагена. Фиг. 7В представляет собой Вестерн-блот, показывающий, что предварительная инкубация клеток с SB202190 прекращала индуцированную IL-34 продукцию COL1A1 и COL3A1. Фиг. 7С и 7D, соответственно, представляют собой столбчатые диаграммы, показывающие количественную оценку сигнала COL1A1 и COL3A1 на Вестерн-блоте, показанном на фиг. 7В, нормализованного по контролю β -актину (COL1A1 (DMSO против DMSO+IL-34, $p=0,0009$; DMSO+IL-34 против SB202190, $p=0,0003$; DMSO+IL-34 против SB202190+IL-34, $p=0,0001$; DMSO против SB202190+IL-34, $p=0,05$); COL3A1 (DMSO против DMSO+IL-34, $p=0,01$; DMSO+IL-34 против SB202190, $p=0,002$; DMSO+IL-34 против SB202190+IL-34, $p=0,002$; DMSO против SB202190+IL-34, $p=0,03$); среднее $\pm$ SEM), как оценено посредством Вестерн-блоттинга, и общую продукцию коллагена в фибробластах, как оценено посредством анализа Sircol (фиг. 7Е; DMSO против DMSO+IL-34, $p=0,001$; DMSO+IL-34 против SB202190+IL-34, $p=0,01$; среднее $\pm$ SEM). Эти результаты показывают, что индуцированная IL-34 продукция коллагена зависит от пути MAP-киназы p38.

Пример 6: Продукция IL-34 в фиброзных стриктурах при болезни Крона

[0259] Экспрессию IL-34 оценивали в фиброзных стриктурах для определения того, какие клетки фиброзных стриктур продуцируют IL-34. Транскрипты РНК для IL-34 оценивали в образцах кишечника, взятых из образцов кишечника для I CD, FS CD и контроля. Уровни транскриптов РНК IL-34 были значимо увеличены у пациентов с I CD, по сравнению с контролем (фиг. 8А). Экспрессия РНК IL-34 была увеличена в образцах для FS CD, по сравнению с контролем и образцами для I CD (фиг. 8А; Подвздошн. КОНТР. против I CD, $p=0,002$; I CD против FS CD, $p=0,03$; Подвздошн. КОНТР. против FS CD, $p=0,002$; среднее $\pm$ SEM). Фиг. 8В представляет собой анализ Вестерн-блоттинга тотальных белков, экстрагированных из парных образцов слизистой оболочки, показывающий, что экспрессия IL-34 значимо увеличена у пациентов с I CD, по сравнению с контролем, и у пациентов с FS CD, по сравнению с клетками как для

контроля, так и для I CD. Фиг. 8С представляет собой столбчатую диаграмму, показывающую количественную оценку сигнала IL-34 для Вестерн-блота, показанного на фиг. 8В, нормализованного по контролю β -актину (Подвздошн. КОНТР. против I CD, $p=0,004$; I CD против FS CD, $p=0,04$; Подвздошн. КОНТР. против FS CD, $p=0,004$; среднее $\pm$ SEM). Иммуногистохимический анализ также показал, что IL-34 экспрессирован на высоком уровне в клетках при FS CD (фиг. 8Е), по сравнению с подвздошнокишечным контролем (фиг. 8D) и контролем изотипа (фиг. 8F). Иммуногистохимия также показала, что в фиброзных стриктурах при FS CD, стромальные клетки экспрессировали IL-34 (фиг. 8Е). Усиленную экспрессию РНК (фиг. 8G; среднее $\pm$ SEM) и белка (фиг. 8H) IL-34 наблюдали в фибробластах, выделенных из образцов подвздошной кишки, от пациентов с FS CD, по сравнению с контрольными фибробластами.

Пример 7: Нокдаун IL-34 в пораженных болезнью Крона фибробластах приводит к уменьшенной продукции коллагена

[0260] Эффект ингибирования IL-34 на синтез коллагена в пораженных CD фибробластах, выделенных из образцов для FS, оценивали с использованием антисмыслового олигонуклеотида IL-34. Кратко, 5×10^4 пораженных FS CD фибробластов рассеивали в каждую лунку 12-луночного планшета, оставляли для адгезии на 24 часа, и затем либо оставляли необработанными, либо трансфицировали антисмысловым олигонуклеотидом IL-34 из SEQ ID NO:3 (IL-34 AS) или комплементарным смысловым олигонуклеотидом (NCAS; оба использовали при 200 нМ; Integrated DNA Technologies, Inc. Leuven, Belgium) в течение 24-48 часов с использованием среды Opti-MEM и реагента липофектамина 3000, в соответствии с инструкциями производителя (Life Technologies, Milan, Italy). Эффективность трансфекции определяли посредством Вестерн-блоттинга. Бесклеточные супернатанты анализировали по содержанию коллагена через 48 часов.

[0261] Трансфекция пораженных FS CD фибробластов антисмысловым олигонуклеотидом IL-34 значительно уменьшала синтез белка как COL1A1, так и COL3A1, по сравнению с трансфекцией контрольной антисмысловой последовательностью, как оценено посредством Вестерн-блоттинга (фиг. 9А).

[0262] Фиг. 9В, 9С, и 9D, соответственно, представляют собой столбчатые диаграммы, показывающие количественную оценку сигнала IL-34, COL1A1 и COL3A1 для Вестерн-блота, показанного на фиг. 9А, нормализованного по контролю β -актину; IL-34, NCAS против IL-34AS, $p=0,01$; COL1A1, NCAS против IL-34AS, $p=0,0004$; COL3A1, NCAS против IL-34AS, $p=0,004$; среднее $\pm$ SEM). Трансфекция пораженных FS CD фибробластов антисмысловым олигонуклеотидом IL-34 также значительно уменьшала

секрецию коллагена в супернатантах культур фибробластов (фиг. 9Е; NCAS против IL-34AS, $p=0,006$, среднее $\pm$ SEM).

[0263] Оценивали также эффект нокдауна IL-34 на клеточную смерть. Для оценки клеточной смерти, пораженные FS фибробласты промывали в PBS, окрашивали с использованием FITC-аннексина V (AV, 1:100 конечное разведение; Immunotools, Friesoyte, Germany), в соответствии с инструкциями производителя, и инкубировали с 5 мг/мл PI (Life Technologies) в течение 20 мин при 4°C. Флуоресценцию измеряли посредством проточной цитометрии с использованием каналов FL-1 и FL-2 проточного цитометра FACSVerse (BD Biosciences). AV-/PI- клетки считали жизнеспособными клетками, AV+/PI- клетки считали подвергающимися апоптозу, и подвергающиеся вторичному некрозу клетки характеризовались окрашиванием AV+/PI+. Фиг. 9G и 9H представляют собой точечные графики проточной цитометрии пораженных FS CD фибробластов, трансфицированных антисмысловым олигонуклеотидом IL-34 или NCAS. Фиг. 9F представляет собой столбчатую диаграмму, соответствующую данным проточной цитометрии из фиг. 9G и 9H (среднее $\pm$ SEM), показывающую, что для пораженных FS CD фибробластов, трансфицированных антисмысловым олигонуклеотидом IL-34, не получали в результате увеличения клеточной смерти. Эти результаты показывают, что нокдаун IL-34 в пораженных FS CD фибробластах посредством антисмыслового олигонуклеотида приводит к значимо уменьшенной продукции коллагена без значимого эффекта на клеточную смерть.

Включение посредством ссылки

[0264] Полное содержание каждого из патентных документов и научных статей, процитированных в настоящем документе, включено посредством ссылки для всех целей.

Эквиваленты

[0265] Изобретение можно осуществлять в других конкретных формах без отклонения от его существенных характеристик. Приведенные выше варианты осуществления, таким образом, следует считать иллюстрирующими, а не ограничивающими изобретение, раскрытое в настоящем документе. Объем изобретения указан в прилагаемой формуле изобретения, а не в приведенном выше описании, и все изменения, возникающие в рамках значения и диапазона эквивалентности пунктов формулы изобретения, предназначены для включения в него.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антисмысловой олигонуклеотид ПЛ-34, содержащий нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из:

5'-CTCACCAAGACCCACAG-3' (SEQ ID NO:1), в которой по меньшей мере один нуклеозид представляет собой химически модифицированный нуклеозид, и/или по меньшей мере одна связь представляет собой модифицированную межнуклеозидную связь;

5'-GGCTTTGGGCCCGCACCCAGCT-3' (SEQ ID NO:2), в которой по меньшей мере один нуклеозид представляет собой химически модифицированный нуклеозид, и/или по меньшей мере одна связь представляет собой модифицированную межнуклеозидную связь;

5'-CTTTGGGCCCGCACCCAGCTTC-3' (SEQ ID NO:3), в которой по меньшей мере один нуклеозид представляет собой химически модифицированный нуклеозид, и/или по меньшей мере одна связь представляет собой модифицированную межнуклеозидную связь;

5'-TGGGCCCGCACCCAGCTTCAGG-3' (SEQ ID NO:4), в которой по меньшей мере один нуклеозид представляет собой химически модифицированный нуклеозид, и/или по меньшей мере одна связь представляет собой модифицированную межнуклеозидную связь;

5'-TCCATGACCCGGAAGCAGTT-3' (SEQ ID NO:5), в которой по меньшей мере один нуклеозид представляет собой химически модифицированный нуклеозид, и/или по меньшей мере одна связь представляет собой модифицированную межнуклеозидную связь; и

5'-TGTTTCATGTACTGAAG-3' (SEQ ID NO:6), в которой по меньшей мере один нуклеозид представляет собой химически модифицированный нуклеозид, и/или по меньшей мере одна связь представляет собой модифицированную межнуклеозидную связь,

или

его фармацевтически приемлемая соль.

2. Антисмысловой олигонуклеотид по п.1, в котором нуклеотидная последовательность представляет собой SEQ ID NO:3, и в котором по меньшей мере один цитидин является химически модифицированным.

3. Антисмысловой олигонуклеотид по п.2, в котором нуклеотидная последовательность представляет собой 5'-CTTTGGGCXGCACCAGCTTC-3' (SEQ ID NO:7), и в котором X представляет собой 5-метилцитидин.

4. Антисмысловой олигонуклеотид по п.1, в котором нуклеотидная последовательность представляет собой SEQ ID NO:5, и в котором по меньшей мере один цитидин является химически модифицированным; необязательно, в котором цитидин в положении 10 из SEQ ID NO:5 является химически модифицированным, и нуклеотидная последовательность представляет собой 5'-TCCATGACCXGGAAGCAGTT-3' (SEQ ID NO:8), и в котором X представляет собой 5-метилцитидин.

5. Антисмысловой олигонуклеотид по любому из пп. 1-4, в котором антисмысловой олигонуклеотид содержит одну или несколько запертых нуклеиновых кислот (LNA).

6. Антисмысловой олигонуклеотид по любому из пп. 1-5, в котором каждый из нуклеотидов антисмыслового олигонуклеотида содержит запертую нуклеиновую кислоту (LNA).

7. Антисмысловой олигонуклеотид IL-34, содержащий нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из:

5'-cttTGGGCXGCACCAGCttc-3' (SEQ ID NO:9), в которой с представляет собой LNA-цитидин, t представляет собой LNA-тимидин, и X представляет собой 5-метилцитидин;

5'-ctttGGGCXGCACCAGcttc-3' (SEQ ID NO:10), в которой с представляет собой LNA-цитидин, t представляет собой LNA-тимидин, и X представляет собой 5-метилцитидин;

5'-cttTGGGCcgCACCAGCttc-3' (SEQ ID NO:11), в которой с представляет собой LNA-цитидин, t представляет собой LNA-тимидин, и g представляет собой LNA-гуанозин;

5'-cttTGGGCcGCACCAGCttc-3' (SEQ ID NO:12), в которой с представляет собой LNA-цитидин и t представляет собой LNA-тимидин;

5'-ggcXGCACCAGCttc-3' (SEQ ID NO:13), в которой с представляет собой LNA-цитидин, t представляет собой LNA-тимидин, g представляет собой LNA-гуанозин, и X представляет собой 5-метилцитидин;

5'-cttTGGGCXGCACcag-3' (SEQ ID NO:14), в которой с представляет собой LNA-цитидин, t представляет собой LNA-тимидин, g представляет собой LNA-гуанозин, а представляет собой LNA-аденозин, и X представляет собой 5-метилцитидин; и

5'-tgaCCXGGAAGCAgtt-3' (SEQ ID NO:15), в которой а представляет собой LNA-аденозин, t представляет собой LNA-тимидин, g представляет собой LNA-гуанозин, и X представляет собой 5-метилцитидин, или

его фармацевтически приемлемая соль.

8. Антисмысловой олигонуклеотид II-34, содержащий нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из:

5'-C_xT_xT_xT_xG_xGGCXGCACCAG_xC_xT_xT_xC_x-3' (SEQ ID NO:16), в которой C_x представляет собой 2'-O-(2-метоксиэтил)цитидин, T_x представляет собой 2'-O-(2-метоксиэтил)тимидин, G_x представляет собой 2'-O-(2-метоксиэтил)гуанозин, и X представляет собой 5-метилцитидин;

5'-T_xC_xC_xA_xT_xGACCXGGAAGC_xA_xG_xT_xT_x-3' (SEQ ID NO:17), в которой C_x представляет собой 2'-O-(2-метоксиэтил)цитидин, T_x представляет собой 2'-O-(2-метоксиэтил)тимидин, G_x представляет собой 2'-O-(2-метоксиэтил)гуанозин, A_x представляет собой 2'-O-(2-метоксиэтил)аденозин, и X представляет собой 5-метилцитидин;

5'-C_xT_xT_xT_xG_xG_xGCXGCACCA_xG_xC_xT_xT_xC_x-3' (SEQ ID NO:18), в которой C_x представляет собой 2'-O-(2-метоксиэтил)цитидин, T_x представляет собой 2'-O-(2-метоксиэтил)тимидин, G_x представляет собой 2'-O-(2-метоксиэтил)гуанозин, A_x представляет собой 2'-O-(2-метоксиэтил)аденозин, и X представляет собой 5-метилцитидин;

5'-T_xC_xC_xA_xT_xG_xACCXGGAAG_xC_xA_xG_xT_xT_x-3' (SEQ ID NO:19), в которой C_x представляет собой 2'-O-(2-метоксиэтил)цитидин, T_x представляет собой 2'-O-(2-метоксиэтил)тимидин, G_x представляет собой 2'-O-(2-метоксиэтил)гуанозин, A_x представляет собой 2'-O-(2-метоксиэтил)аденозин, и X представляет собой 5-метилцитидин;

5'-C_xT_xT_xT_xG_xG_xG_xC_xXG_xC_xA_xC_xC_xA_xG_xC_xT_xT_xC_x-3' (SEQ ID NO:20), в которой C_x представляет собой 2'-O-(2-метоксиэтил)цитидин, T_x представляет собой 2'-O-(2-метоксиэтил)тимидин, G_x представляет собой 2'-O-(2-метоксиэтил)гуанозин, A_x представляет собой 2'-O-(2-метоксиэтил)аденозин, и X представляет собой 5-метилцитидин; и

5'-T_xC_xC_xA_xT_xG_xA_xC_xC_xXG_xG_xA_xA_xG_xC_xA_xG_xT_xT_x-3' (SEQ ID NO:21), в которой C_x представляет собой 2'-O-(2-метоксиэтил)цитидин, T_x представляет собой 2'-O-(2-метоксиэтил)тимидин, G_x представляет собой 2'-O-(2-метоксиэтил)гуанозин, A_x представляет собой 2'-O-(2-метоксиэтил)аденозин, и X представляет собой 5-метилцитидин, или

его фармацевтически приемлемая соль.

9. Антисмысловой олигонуклеотид по любому из пп. 1-8, в котором антисмысловой олигонуклеотид содержит один или несколько рибонуклеотидов.

10. Антисмысловой олигонуклеотид по любому из пп. 1-8, в котором антисмысловой олигонуклеотид содержит один или несколько дезоксирибонуклеотидов.

11. Антисмысловой олигонуклеотид по любому из пп. 1-8, в котором антисмысловой олигонуклеотид содержит смесь рибонуклеотидов и дезоксирибонуклеотидов.

12. Антисмысловой олигонуклеотид по любому из пп. 1-11, в котором по меньшей мере одна межнуклеозидная связь из последовательности выбрана из группы, состоящей из фосфоротиаотной связи, фосфородитиаотной связи, фосфотриэфирной связи, алкилфосфонатной связи, аминоалкилфосфотриэфирной связи, алкиленфосфонатной связи, фосфинатной связи, фосфорамидатной связи и аминоалкилфосфорамидатной связи, тиофосфорамидатной связи, тионоалкилфосфонатной связи, тионоалкилфосфотриэфирной связи, тиофосфатной связи, селенофосфатной связи и боронофосфатной связи.

13. Антисмысловой олигонуклеотид по любому из пп. 1-12, в котором по меньшей мере одна межнуклеозидная связь из последовательности представляет собой фосфоротиаотную связь.

14. Антисмысловой олигонуклеотид по любому из пп. 1-13, в котором все межнуклеозидные связи из последовательности представляют собой фосфоротиаотные связи.

15. Антисмысловой олигонуклеотид по любому из пп. 1-14, в котором один или несколько остатков цитидина заменены на 5-метилцитидин.

16. Антисмысловой олигонуклеотид по любому из пп. 1-15, в котором антисмысловой олигонуклеотид имеет длину 20 нуклеотидов или длину 20-25, 20-30, 20-35, 25-30, 25-35 или 30-35 нуклеотидов.

17. Антисмысловой олигонуклеотид по п.16, в котором антисмысловой олигонуклеотид имеет длину от 20 до 25 нуклеотидов.

18. Антисмысловой олигонуклеотид по любому из пп. 1-15, в котором антисмысловой олигонуклеотид имеет длину не более, чем 20, 25, 30 или 35 нуклеотидов.

19. Соединение, содержащее антисмысловой олигонуклеотид по любому из пп. 1-18 или его фармацевтически приемлемую соль.

20. Соединение, содержащее антисмысловой олигонуклеотид по любому из пп. 1-3 и 5-18, в котором антисмысловой олигонуклеотид содержит нуклеотидную

последовательность из SEQ ID NO:3, и в котором по меньшей мере один цитидин является химически модифицированным, или его фармацевтически приемлемую соль.

21. Соединение по п.20, в котором антисмысловой олигонуклеотид содержит нуклеотидную последовательность 5'-CTTTGGGCXGCACCAGCTTC-3' (SEQ ID NO:7), и в котором X представляет собой 5-метилцитидин.

22. Способ лечения воспалительного заболевания, предусматривающий введение нуждающемуся в этом пациенту эффективного количества антисмыслового олигонуклеотида IL-34 или его фармацевтически приемлемой соли по любому из пп. 1-18, или соединения по любому из пп. 19-21.

23. Способ ингибирования продукции воспалительного цитокина в клетках пациента, страдающего воспалительным заболеванием, предусматривающий введение эффективного количества антисмыслового олигонуклеотида IL-34 или его фармацевтически приемлемой соли по любому из пп. 1-18, или соединения по любому из пп. 19-21.

24. Способ уменьшения или ингибирования опосредованного IL-34 воспалительного ответа в клетках пациента, страдающего воспалительным заболеванием, предусматривающий введение эффективного количества антисмыслового олигонуклеотида IL-34 или его фармацевтически приемлемой соли по любому из пп. 1-18, или соединения по любому из пп. 19-21.

25. Способ лечения воспалительного заболевания, ассоциированного с измененной экспрессией IL-34, у нуждающегося в этом пациента, предусматривающий введение эффективного количества антисмыслового олигонуклеотида IL-34 или его фармацевтически приемлемой соли по любому из пп. 1-18, или соединения по любому из пп. 19-21.

26. Способ ингибирования опосредованной IL-34 передачи сигналов рецептора макрофагального колониестимулирующего фактора (M-CSFR-1) в клетках пациента, страдающего воспалительным заболеванием, предусматривающий введение эффективного количества антисмыслового олигонуклеотида IL-34 или его фармацевтически приемлемой соли по любому из пп. 1-18, или соединения по любому из пп. 19-21.

27. Способ уменьшения или уничтожения фиброзной стриктуры у пациента, страдающего воспалительным заболеванием, предусматривающий введение эффективного количества антисмыслового олигонуклеотида IL-34 или его фармацевтически приемлемой соли по любому из пп. 1-18, или соединения по любому из пп. 19-21.

28. Способ по п.27, в котором фиброзная стриктура локализована в кишечнике.

29. Способ по любому из пп. 22-28, в котором указанное воспалительное заболевание выбрано из группы, состоящей из воспалительного заболевания кишечника, ревматоидного артрита, псориаза, остеоартрита, диабета (типа I и II), отторжения ткани или органа, рассеянного склероза, воспаления пародонта, периодонтита, пигментного виллезонодулярного синовита, гепатита, синусита, рака толстого кишечника, колоректального рака, ассоциированного с колитом рака толстого кишечника, sporadического колоректального рака, болезни коронарных артерий, синдрома Шегрена (SS), ожирения, хронического воспаления, легочного саркоидоза, кожных повреждений, воспалительного заболевания ЦНС или аутоиммунного заболевания.

30. Способ по п.29, в котором указанное воспалительное заболевание представляет собой воспалительное заболевание кишечника.

31. Способ по п.30, в котором указанное воспалительное заболевание кишечника выбрано из группы, состоящей из болезни Крона, болезни Крона желудка и двенадцатиперстной кишки, (гранулематозного) колита Крона, воспалительной болезни Крона, фиброзно-стриктурирующей болезни Крона, язвенного колита, коллагенозного колита, лимфоцитарного колита, ишемического колита, диверсионного колита, болезни Бехчета, микроскопического колита, язвенного проктита, проктосигмоидита, еюноилеита, левостороннего колита, панколита, илеоколита, илеита и неуточненного колита.

32. Способ по п.31, в котором указанное воспалительное заболевание кишечника представляет собой воспалительную болезнь Крона.

33. Способ по п.31, в котором указанное воспалительное заболевание кишечника представляет собой фиброзно-стриктурирующую болезнь Крона.

34. Способ по любому из пп. 22-33, в котором антисмысловой олигонуклеотид IL-34 вводят местно, парентерально, перорально, внутривенно, интратрахеально, интраназально, чрескожно или интрадуоденально.

35. Способ по п.34, в котором антисмысловой олигонуклеотид IL-34 вводят перорально.

36. Способ по любому из пп. 22-35, в котором пациент представляет собой человека.

37. Фармацевтически приемлемая композиция, содержащая антисмысловой олигонуклеотид IL-34 по любому из пп. 1-18 или его фармацевтически приемлемую соль, или соединение по любому из пп. 19-21 и фармацевтически приемлемый наполнитель.

38. Фармацевтическая композиция по п.37, в которой фармацевтическая композиция является пригодной для местного, парентерального, перорального,

внутрилегочного, интратрахеального, интраназального, чрескожного или интрадуоденального введения.

39. Применение антисмыслового олигонуклеотида IL-34 по любому из пп. 1-18 или его фармацевтически приемлемой соли, или соединения по любому из пп. 19-21 в изготовлении лекарственного средства для лечения воспалительного заболевания.

40. Применение по п.39, в котором указанное воспалительное заболевание выбрано из группы, состоящей из воспалительного заболевания кишечника, ревматоидного артрита, псориаза, остеоартрита, диабета (типа I и II), отторжения ткани или органа, рассеянного склероза, воспаления пародонта, периодонтита, пигментного виллезонодулярного синовита, гепатита, синусита, рака толстого кишечника, колоректального рака, ассоциированного с колитом рака толстого кишечника, sporadического колоректального рака, болезни коронарных артерий или синдрома Шегрена (SS), ожирения, хронического воспаления, легочного саркоидоза, кожных повреждений, воспалительного заболевания ЦНС или аутоиммунного заболевания.

41. Применение по п.40, в котором указанное воспалительное заболевание представляет собой воспалительное заболевание кишечника.

42. Применение по п.41, в котором воспалительное заболевание кишечника выбрано из группы, состоящей из болезни Крона, воспалительной болезни Крона, фиброзно-стриктурирующей болезни Крона, болезни Крона желудка и двенадцатиперстной кишки, (гранулематозного) колита Крона, язвенного колита, коллагенозного колита, лимфоцитарного колита, ишемического колита, диверсионного колита, болезни Бехчета, микроскопического колита, язвенного проктита, проктосигмоидита, еюноилеита, левостороннего колита, панколита, илеоколита, илеита и неуточненного колита.

43. Применение по п.42, в котором указанное воспалительное заболевание кишечника представляет собой воспалительную болезнь Крона.

44. Применение по п.42, в котором указанное воспалительное заболевание кишечника представляет собой фиброзно-стриктурирующую болезнь Крона.

45. Способ ингибирования экспрессии IL-34 в клетке субъекта, предусматривающий введение субъекту фармацевтически эффективного количества фармацевтического препарата, содержащего антисмысловой олигонуклеотид IL-34 или его фармацевтически приемлемую соль, по любому из пп. 1-18, или соединения по любому из пп. 19-21.

46. Способ ингибирования экспрессии одного или нескольких коллагенов в клетке субъекта, предусматривающий введение субъекту фармацевтически эффективного

количества фармацевтического препарата, содержащего антисмысловой олигонуклеотид IL-34 или его фармацевтически приемлемую соль, по любому из пп. 1-18, или соединение по любому из пп. 19-21.

47. Способ по п.45 или 46, в котором клетка представляет собой клетку кишечника.

48. Способ по п.47, в котором клетка представляет собой стромальную клетку кишечника.

49. Способ по п.45 или 46, в котором клетка формирует часть кишечной фиброзной стриктуры.

50. Способ по п.45 или 46, в котором субъект нуждается в лечении заболевания, выбранного из воспалительной болезни Крона или фиброзно-стриктурирующей болезни Крона.

51. Способ по п.46, в котором один или несколько коллагенов выбраны из группы, состоящей из коллагена 1А, коллагена 3А и их смеси.

52. Способ по п.45 или 46, в котором фармацевтический препарат вводят перорально.

53. Способ по п.45 или 46, в котором субъект представляет собой человека.

54. Способ предотвращения или лечения фиброза, предусматривающий введение нуждающемуся в этом пациенту терапевтически эффективного количества антисмыслового олигонуклеотида IL-34 или его фармацевтически приемлемой соли по любому из пп. 1-18, или соединения по любому из пп. 19-21.

55. Способ по п.54, в котором фиброз представляет собой кишечный фиброз.

56. Способ по п.54, в котором фиброз представляет собой легочный фиброз.

57. Способ по п.54, в котором фиброз выбран из группы, состоящей из почечного фиброза, сердечного фиброза, эндомикардиального фиброза, миелофиброза, ретроперитонеального фиброза и нефрогенного системного фиброза.

58. Способ предотвращения или лечения кишечного фиброза, предусматривающий введение нуждающемуся в этом пациенту фармацевтически эффективного количества фармацевтического препарата, содержащего антисмысловой олигонуклеотид IL-34 по любому из пп. 1-18, или его фармацевтически приемлемую соль, или соединение по любому из пп. 19-21.

59. Способ по п.58, в котором фармацевтический препарат вводят перорально.

60. Способ по п.58 или 59, в котором пациент представляет собой человека.

61. Способ по любому из пп. 58-60, в котором пациент страдает также болезнью Крона.

62. Способ предотвращения или лечения легочного фиброза, предусматривающий введение нуждающемуся в этом пациенту фармацевтически эффективного количества фармацевтического препарата, содержащего антисмысловой олигонуклеотид IL-34 по любому из пп. 1-18 или его фармацевтически приемлемую соль, или соединение по любому из пп. 19-21.

63. Способ по п.62, в котором фармацевтический препарат вводят перорально.

64. Способ по п.62 или 63, в котором пациент представляет собой человека.

65. Антисмысловой олигонуклеотид IL-34 по любому из пп. 1-18 или его фармацевтически приемлемая соль, или соединение по любому из пп. 19-21 для применения в качестве лекарственного средства.

66. Антисмысловой олигонуклеотид IL-34 по любому из пп. 1-18 или его фармацевтически приемлемая соль, или соединение по любому из пп. 19-21 для применения в лечении воспалительного заболевания.

67. Антисмысловой олигонуклеотид IL-34 для применения по п.66, в котором указанное воспалительное заболевание выбрано из группы, состоящей из воспалительного заболевания кишечника, ревматоидного артрита, псориаза, остеоартрита, диабета (типа I и II), отторжения ткани или органа, рассеянного склероза, воспаления пародонта, периодонтита, пигментного виллезнодулярного синовита, гепатита, синусита, рака толстого кишечника, колоректального рака, ассоциированного с колитом рака толстого кишечника, спорадического колоректального рака, болезни коронарных артерий или синдрома Шегрена (SS), ожирения, хронического воспаления, легочного саркоидоза, кожных повреждений, воспалительного заболевания ЦНС или аутоиммунного заболевания.

68. Антисмысловой олигонуклеотид IL-34 для применения по п.67, в котором указанное воспалительное заболевание представляет собой воспалительное заболевание кишечника.

69. Антисмысловой олигонуклеотид IL-34 для применения по п.68, в котором воспалительное заболевание кишечника выбрано из группы, состоящей из болезни Крона, воспалительной болезни Крона, фиброзно-стриктурирующей болезни Крона, болезни Крона желудка и двенадцатиперстной кишки, (гранулематозного) колита Крона, язвенного колита, коллагенозного колита, лимфоцитарного колита, ишемического колита, диверсионного колита, болезни Бехчета, микроскопического колита, язвенного проктита, проктосигмоидита, еюноилеита, левостороннего колита, панколита, илеоколита, илеита и неуточненного колита.

70. Антисмысловой олигонуклеотид IL-34 для применения по п.69, в котором воспалительное заболевание кишечника представляет собой воспалительную болезнь Крона.

71. Антисмысловой олигонуклеотид IL-34 для применения по п.69, в котором воспалительное заболевание кишечника представляет собой фиброзно-стриктурирующую болезнь Крона.

72. Антисмысловой олигонуклеотид IL-34 по любому из пп. 1-18 или его фармацевтически приемлемая соль для применения в лечении фиброза.

73. Антисмысловой олигонуклеотид IL-34 для применения по п.72, в котором фиброз представляет собой кишечный фиброз.

74. Антисмысловой олигонуклеотид IL-34 для применения по п.72, в котором фиброз представляет собой легочный фиброз.

75. Антисмысловой олигонуклеотид IL-34 для применения по п.72, в котором фиброз выбран из группы, состоящей из почечного фиброза, сердечного фиброза, эндомикардиального фиброза, миелофиброза, ретроперитонеального фиброза и нефрогенного системного фиброза.

76. Ингибитор IL-34, содержащий нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из:

5'-CTCACCAAGACCCACAG-3' (SEQ ID NO:1), в которой по меньшей мере один нуклеозид представляет собой химически модифицированный нуклеозид, и/или по меньшей мере одна связь представляет собой модифицированную межнуклеозидную связь;

5'-GGCTTTGGGCCGCACCAGCT-3' (SEQ ID NO:2), в которой по меньшей мере один нуклеозид представляет собой химически модифицированный нуклеозид, и/или по меньшей мере одна связь представляет собой модифицированную межнуклеозидную связь;

5'-CTTTGGGCCGCACCAGCTTC-3' (SEQ ID NO:3), в которой по меньшей мере один нуклеозид представляет собой химически модифицированный нуклеозид, и/или по меньшей мере одна связь представляет собой модифицированную межнуклеозидную связь;

5'-TGGGCCGCACCAGCTTCAGG-3' (SEQ ID NO:4), в которой по меньшей мере один нуклеозид представляет собой химически модифицированный нуклеозид, и/или по меньшей мере одна связь представляет собой модифицированную межнуклеозидную связь;

5'-TCCATGACCCGGAAGCAGTT-3' (SEQ ID NO:5), в которой по меньшей мере один нуклеозид представляет собой химически модифицированный нуклеозид, и/или по меньшей мере одна связь представляет собой модифицированную межнуклеозидную связь; и 5'-TGTTTCATGTAAG-3' (SEQ ID NO:6), в которой по меньшей мере один нуклеозид представляет собой химически модифицированный нуклеозид, и/или по меньшей мере одна связь представляет собой модифицированную межнуклеозидную связь,

или

его фармацевтически приемлемая соль.

77. Ингибитор IL-34 по п.76, в котором нуклеотидная последовательность представляет собой SEQ ID NO:3, и в котором по меньшей мере один цитидин является химически модифицированным.

78. Ингибитор IL-34 по п.77, в котором нуклеотидная последовательность представляет собой 5'-CTTTGGGCXGCACCAGCTTC-3' (SEQ ID NO:7), и в котором X представляет собой 5-метилцитидин.

79. Ингибитор IL-34 по п.76, в котором нуклеотидная последовательность представляет собой SEQ ID NO:5, и в котором по меньшей мере один цитидин является химически модифицированным; необязательно, в котором цитидин в положении 10 из SEQ ID NO:5 является химически модифицированным, и нуклеотидная последовательность представляет собой 5'-TCCATGACCXGGAAGCAGTT-3' (SEQ ID NO:8), и в котором X представляет собой 5-метилцитидин.

80. Ингибитор IL-34 по любому из пп. 76-79, в котором антисмысловой олигонуклеотид содержит одну или несколько запертых нуклеиновых кислот (LNA).

81. Ингибитор IL-34 по п.76-80, в котором каждый из нуклеотидов антисмыслового олигонуклеотида содержит запертую нуклеиновую кислоту (LNA).

82. Ингибитор IL-34 по любому из пп. 76-81, в котором ингибитор IL-34 представляет собой миРНК IL-34 или ее фармацевтически приемлемую соль.

83. Ингибитор IL-34 по п.82, в котором по меньшей мере одна межнуклеозидная связь из последовательности выбрана из группы, состоящей из фосфотриэфирной связи, фосфоритиоатной связи, фосфоротиоатной связи, фосфотриэфирной связи, алкилфосфонатной связи, аминоалкилфосфотриэфирной связи, алкиленфосфонатной связи, фосфинатной связи, фосфорамидатной связи и аминоалкилфосфорамидатной связи, тиофосфорамидатной связи, тионоалкилфосфонатной связи, тионоалкилфосфотриэфирной связи, тиофосфатной связи, селенофосфатной связи и боронофосфатной связи.

84. Ингибитор IL-34 по п.82 или 83, в котором по меньшей мере одна межнуклеозидная связь из последовательности представляет собой фосфоротиоатную связь.

85. Ингибитор IL-34 по любому из пп. 82-84, в котором все межнуклеозидные связи из последовательности представляют собой фосфоротиоатные связи.

86. Ингибитор IL-34 по любому из пп. 82-85, в котором один или несколько остатков цитидина заменены на 5-метилцитидин.

87. Ингибитор IL-34 по любому из пп. 82-86, в котором миРНК IL-34 имеет длину 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 20-25, 20-30 или 25-30 нуклеотидов.

88. Ингибитор IL-34 по п.87, в котором миРНК IL-34 имеет длину от 20 до 25 нуклеотидов.

89. Ингибитор IL-34 по любому из пп. 82-86, в котором миРНК IL-34 имеет длину не более, чем 20, 25 или 30 нуклеотидов.

90. Способ лечения воспалительного заболевания, предусматривающий введение нуждающемуся в этом пациенту эффективного количества ингибитора IL-34 или его фармацевтически приемлемой соли по любому из пп. 76-89.

91. Способ ингибирования продукции воспалительного цитокина в клетках пациента, страдающего воспалительным заболеванием, предусматривающий введение эффективного количества ингибитора IL-34 или его фармацевтически приемлемой соли по любому из пп. 76-89.

92. Способ уменьшения или ингибирования опосредованного IL-34 воспалительного ответа в клетках пациента, страдающего воспалительным заболеванием, предусматривающий введение эффективного количества ингибитора IL-34 или его фармацевтически приемлемой соли по любому из пп. 76-89.

93. Способ лечения воспалительного заболевания, ассоциированного с измененной экспрессией IL-34, у нуждающегося в этом пациента, предусматривающий введение эффективного количества ингибитора IL-34 или его фармацевтически приемлемой соли по любому из пп. 76-89.

94. Способ ингибирования опосредованной IL-34 передачи сигналов рецептора макрофагального колониестимулирующего фактора (M-CSFR-1) в клетках пациента, страдающего воспалительным заболеванием, предусматривающий введение эффективного количества ингибитора IL-34 или его фармацевтически приемлемой соли по любому из пп. 76-89.

95. Способ уменьшения или уничтожения фиброзной стриктуры у пациента, страдающего воспалительным заболеванием, предусматривающий введение

эффективного количества ингибитора IL-34 или его фармацевтически приемлемой соли по любому из пп. 76-89.

96. Способ по п.95, в котором фиброзная стриктура локализована в кишечнике.

97. Способ по любому из пп. 90-96, в котором указанное воспалительное заболевание выбрано из группы, состоящей из воспалительного заболевания кишечника, ревматоидного артрита, псориаза, остеоартрита, диабета (типа I и II), отторжения ткани или органа, рассеянного склероза, воспаления пародонта, периодонтита, пигментного виллезонодулярного синовита, гепатита, синусита, рака толстого кишечника, колоректального рака, ассоциированного с колитом рака толстого кишечника, sporadического колоректального рака, болезни коронарных артерий, синдрома Шегрена (SS), ожирения, хронического воспаления, легочного саркоидоза, кожных повреждений, воспалительного заболевания ЦНС или аутоиммунного заболевания.

98. Способ по п.97, в котором указанное воспалительное заболевание представляет собой воспалительное заболевание кишечника.

99. Способ по п.98, в котором указанное воспалительное заболевание кишечника выбрано из группы, состоящей из болезни Крона, болезни Крона желудка и двенадцатиперстной кишки, (гранулематозного) колита Крона, воспалительной болезни Крона, фиброзно-стриктурирующей болезни Крона, язвенного колита, коллагенозного колита, лимфоцитарного колита, ишемического колита, диверсионного колита, болезни Бехчета, микроскопического колита, язвенного проктита, проктосигмоидита, еюноилеита, левостороннего колита, панколита, илеоколита, илеита и неуточненного колита.

100. Способ по п.99, в котором указанное воспалительное заболевание кишечника представляет собой воспалительную болезнь Крона.

101. Способ по п.99, в котором указанное воспалительное заболевание кишечника представляет собой фиброзно-стриктурирующую болезнь Крона.

102. Способ по любому из пп. 90-101, в котором ингибитор IL-34 вводят местно, парентерально, перорально, внутрилегочно, интратрахеально, интраназально, чрескожно или интрадуоденально.

103. Способ по п.102, в котором ингибитор IL-34 вводят перорально.

104. Способ по любому из пп. 90-103, в котором пациент представляет собой человека.

105. Фармацевтически приемлемая композиция, содержащая ингибитор IL-34 по любому из пп. 76-89 или его фармацевтически приемлемую соль и фармацевтически приемлемый наполнитель.

106. Способ по п.105, в котором фармацевтическая композиция является пригодной для местного, парентерального, перорального, внутрилегочного, интратрахеального, интраназального, чрескожного или интрадуоденального введения.

107. Применение ингибитора IL-34 по любому из пп. 76-89 или его фармацевтически приемлемой соли в изготовлении лекарственного средства для лечения воспалительного заболевания.

108. Применение по п.107, в котором указанное воспалительное заболевание выбрано из группы, состоящей из воспалительного заболевания кишечника, ревматоидного артрита, псориаза, остеоартрита, диабета (типа I и II), отторжения ткани или органа, рассеянного склероза, воспаления пародонта, периодонтита, пигментного виллезнодулярного синовита, гепатита, синусита, рака толстого кишечника, колоректального рака, ассоциированного с колитом рака толстого кишечника, спорадического колоректального рака, болезни коронарных артерий или синдрома Шегрена (SS), ожирения, хронического воспаления, легочного саркоидоза, кожных повреждений, воспалительного заболевания ЦНС или аутоиммунного заболевания.

109. Применение по п.108, в котором указанное воспалительное заболевание представляет собой воспалительное заболевание кишечника.

110. Применение по п.109, в котором воспалительное заболевание кишечника выбрано из группы, состоящей из болезни Крона, воспалительной болезни Крона, фиброзно-стриктурирующей болезни Крона, болезни Крона желудка и двенадцатиперстной кишки, (гранулематозного) колита Крона, язвенного колита, коллагенозного колита, лимфоцитарного колита, ишемического колита, диверсионного колита, болезни Бехчета, микроскопического колита, язвенного проктита, проктосигмоидита, еюноилеита, левостороннего колита, панколита, илеоколита, илеита и неуточненного колита.

111. Применение по п.110, в котором указанное воспалительное заболевание кишечника представляет собой воспалительную болезнь Крона.

112. Применение по п.110, в котором указанное воспалительное заболевание кишечника представляет собой фиброзно-стриктурирующую болезнь Крона.

113. Способ ингибирования экспрессии IL-34 в клетке субъекта, предусматривающий введение субъекту фармацевтически эффективного количества фармацевтического препарата, содержащего ингибитор IL-34 или его фармацевтически приемлемую соль, по любому из пп. 76-89.

114. Способ ингибирования экспрессии одного или нескольких коллагенов в клетке субъекта, предусматривающий введение субъекту фармацевтически эффективного

количества фармацевтического препарата, содержащего ингибитор IL-34 или его фармацевтически приемлемую соль, по любому из пп. 76-89.

115. Способ по п.113 или 114, в котором клетка представляет собой клетку кишечника.

116. Способ по п.115, в котором клетка представляет собой стромальную клетку кишечника.

117. Способ по п.113 или 114, в котором клетка формирует часть кишечной фиброзной стриктуры.

118. Способ по п.113 или 114, в котором субъект нуждается в лечении заболевания, выбранного из воспалительной болезни Крона или фиброзно-стриктурирующей болезни Крона.

119. Способ по п.114, в котором один или несколько коллагенов выбраны из группы, состоящей из коллагена 1А, коллагена 3А и их смеси.

120. Способ по п.113 или 114, в котором фармацевтический препарат вводят перорально.

121. Способ по п.113 или 114, в котором субъект представляет собой человека.

122. Способ предотвращения или лечения фиброза, предусматривающий введение нуждающемуся в этом пациенту терапевтически эффективного количества ингибитора IL-34 или его фармацевтически приемлемой соли по любому из пп. 76-89.

123. Способ по п.122, в котором фиброз представляет собой кишечный фиброз.

124. Способ предотвращения или лечения кишечного фиброза, предусматривающий введение нуждающемуся в этом пациенту фармацевтически эффективного количества фармацевтического препарата, содержащего ингибитор IL-34 по любому из пп. 76-89 или его фармацевтически приемлемую соль.

125. Способ по п.124, в котором фармацевтический препарат вводят перорально.

126. Способ по п.124 или 125, в котором пациент представляет собой человека.

127. Способ по любому из пп. 124-126, в котором пациент страдает также болезнью Крона.

128. Ингибитор IL-34 по любому из пп. 76-89 или его фармацевтически приемлемая соль для применения в качестве лекарственного средства.

129. Ингибитор IL-34 по любому из пп. 76-89 или его фармацевтически приемлемая соль для применения в лечении воспалительного заболевания.

130. Ингибитор IL-34 для применения по п.129, в котором указанное воспалительное заболевание выбрано из группы, состоящей из воспалительного заболевания кишечника, ревматоидного артрита, псориаза, остеоартрита, диабета (типа I и

II), отторжения ткани или органа, рассеянного склероза, воспаления пародонта, периодонтита, пигментного виллезонодулярного синовита, гепатита, синусита, рака толстого кишечника, колоректального рака, ассоциированного с колитом рака толстого кишечника, sporadического колоректального рака, болезни коронарных артерий или синдрома Шегрена (SS), ожирения, хронического воспаления, легочного саркоидоза, кожных повреждений, воспалительного заболевания ЦНС или аутоиммунного заболевания.

131. Ингибитор IL-34 для применения по п.130, в котором указанное воспалительное заболевание представляет собой воспалительное заболевание кишечника.

132. Ингибитор IL-34 для применения по п.131, в котором воспалительное заболевание кишечника выбрано из группы, состоящей из болезни Крона, воспалительной болезни Крона, фиброзно-стриктурирующей болезни Крона, болезни Крона желудка и двенадцатиперстной кишки, (гранулематозного) колита Крона, язвенного колита, коллагенозного колита, лимфоцитарного колита, ишемического колита, диверсионного колита, болезни Бехчета, микроскопического колита, язвенного проктита, проктосигмоидита, еюноилеита, левостороннего колита, панколита, илеоколита, илеита и неуточненного колита.

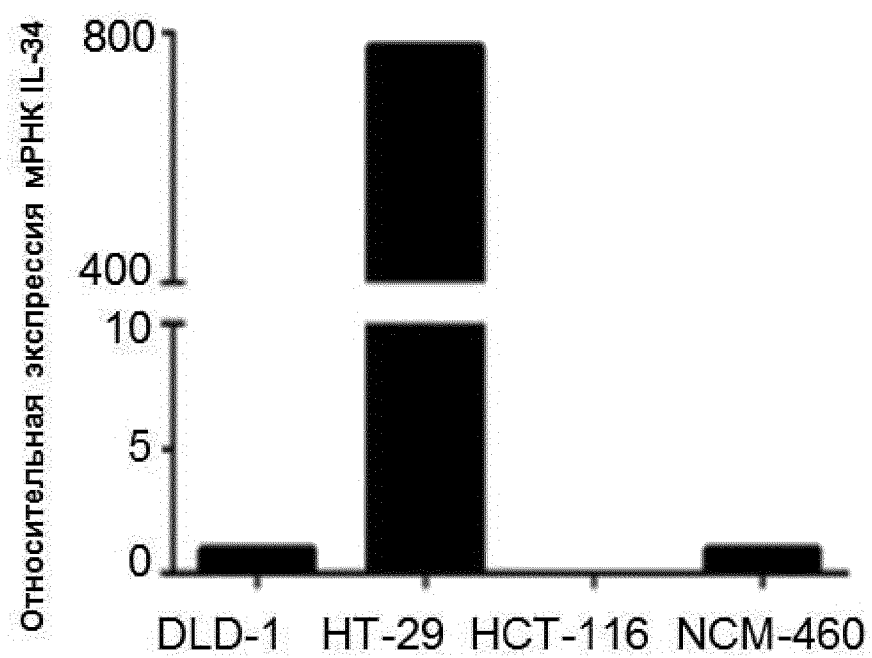
133. Ингибитор IL-34 для применения по п.132, в котором воспалительное заболевание кишечника представляет собой воспалительную болезнь Крона.

134. Ингибитор IL-34 для применения по п.132, в котором воспалительное заболевание кишечника представляет собой фиброзно-стриктурирующую болезнь Крона.

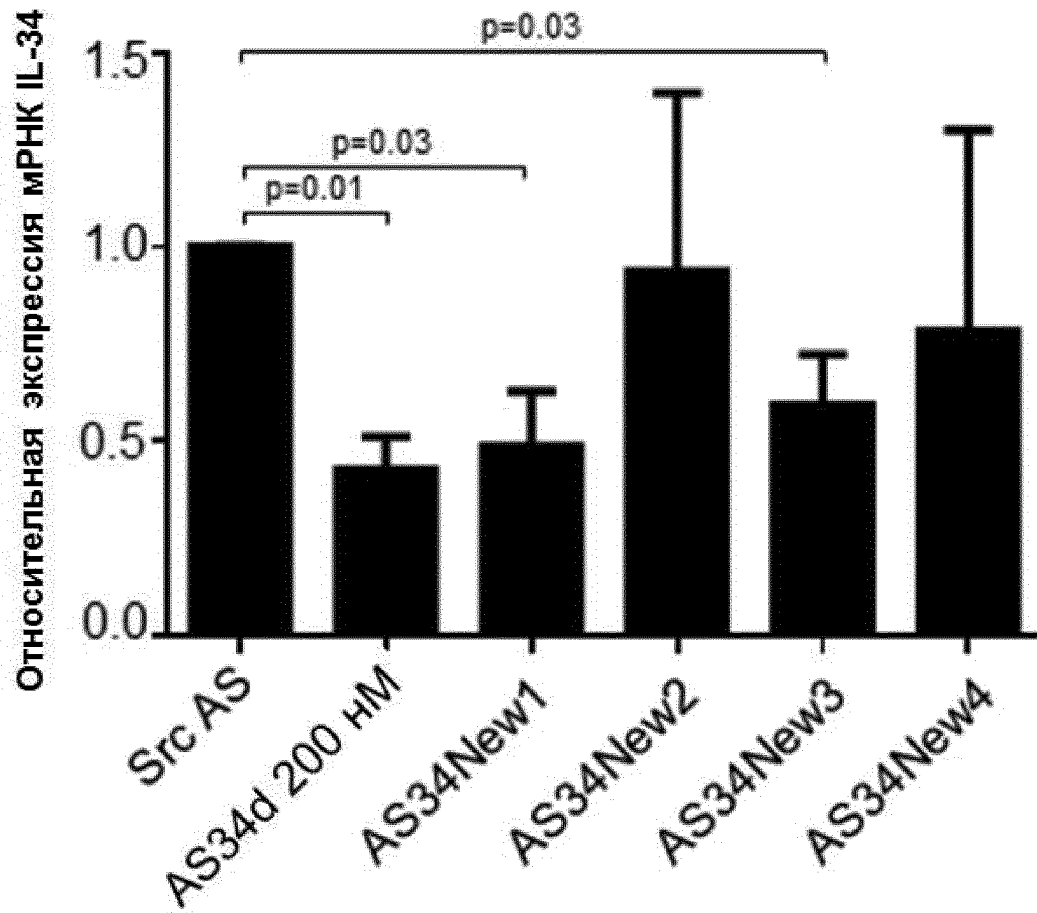
135. Ингибитор IL-34 по любому из пп. 76-89 или его фармацевтически приемлемая соль для применения в лечении фиброза.

136. Ингибитор IL-34 для применения по п.135, в котором фиброз представляет собой кишечный фиброз.

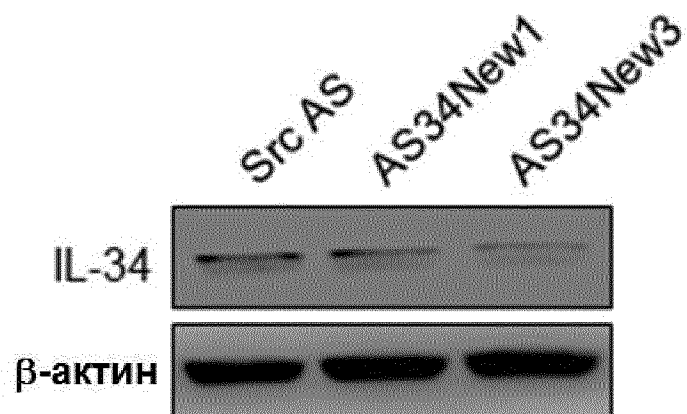
Фиг. 1



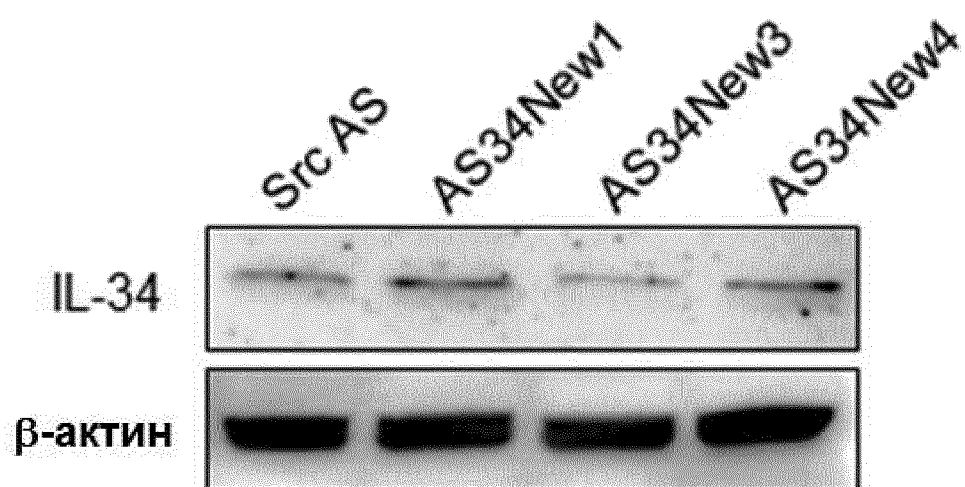
Фиг. 2А



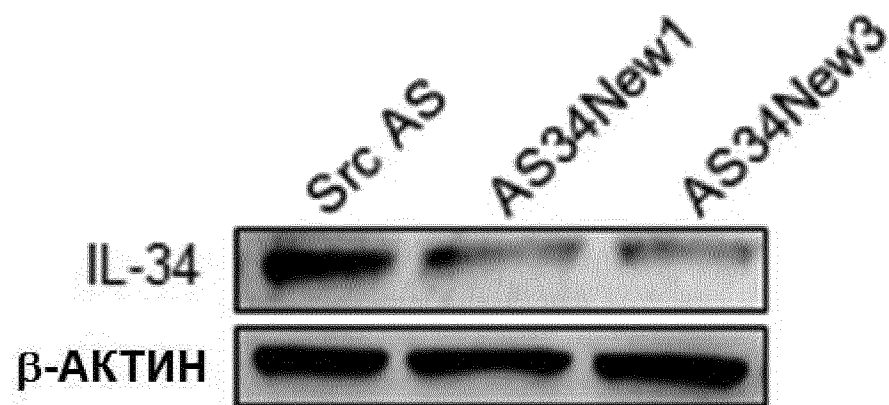
Фиг. 2В



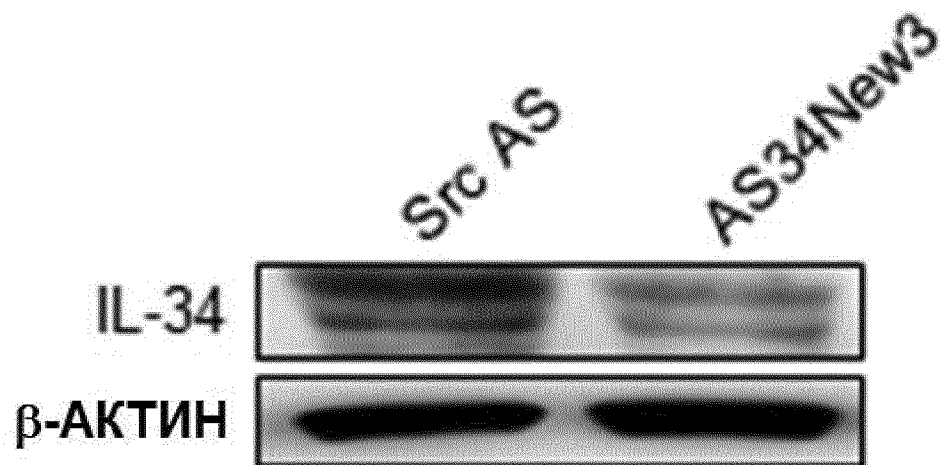
Фиг. 2С



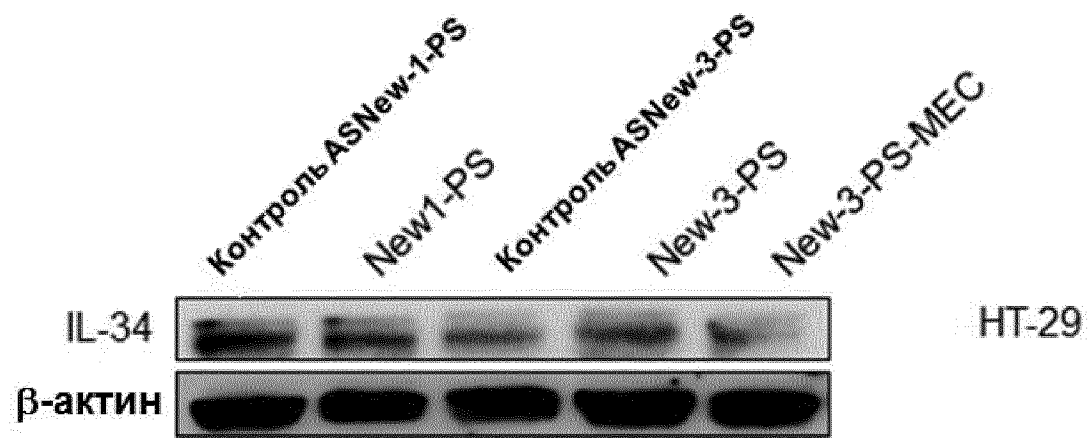
Фиг. 3А



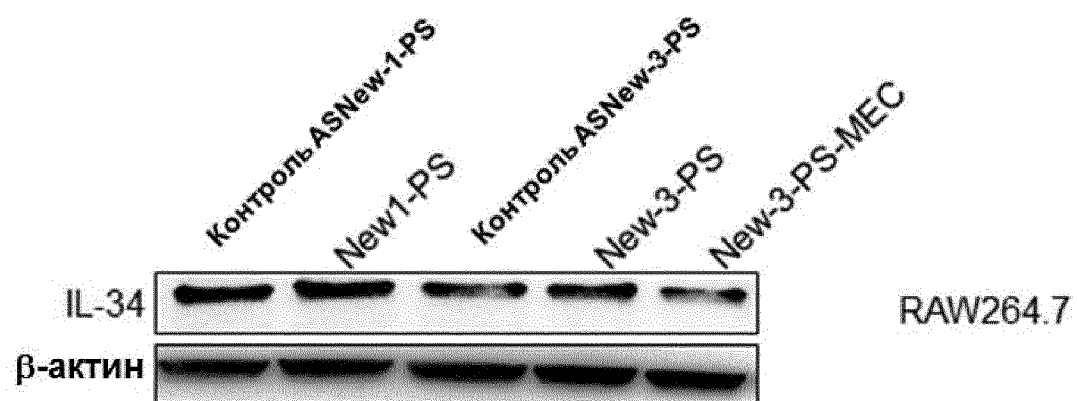
Фиг. 3В



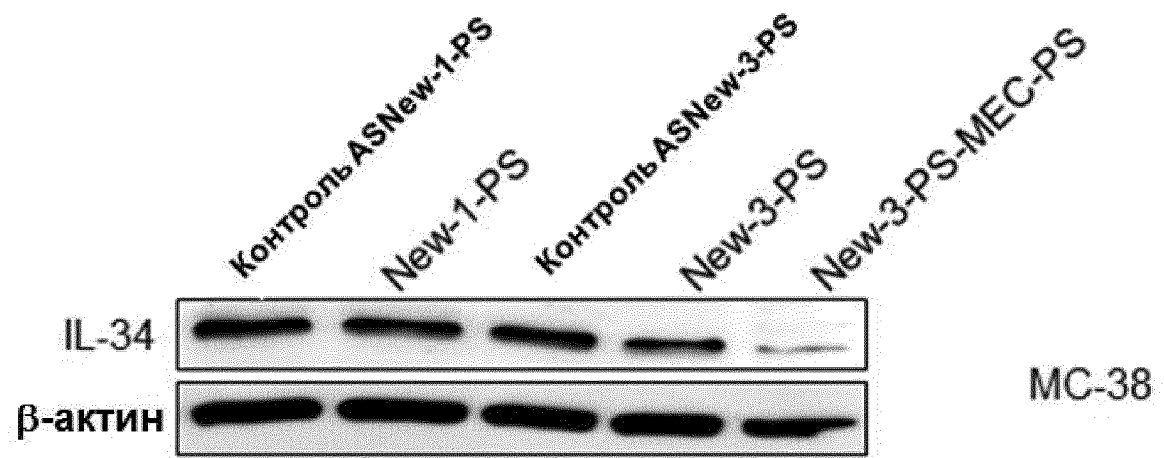
Фиг. 4А



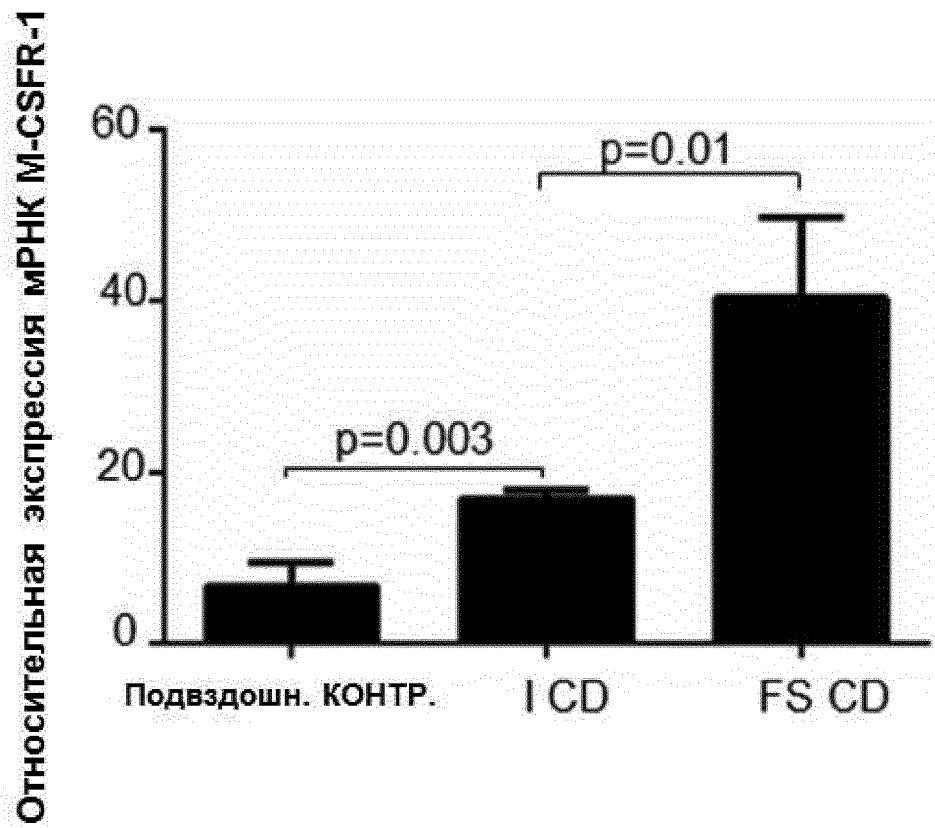
Фиг. 4В



Фиг. 4С



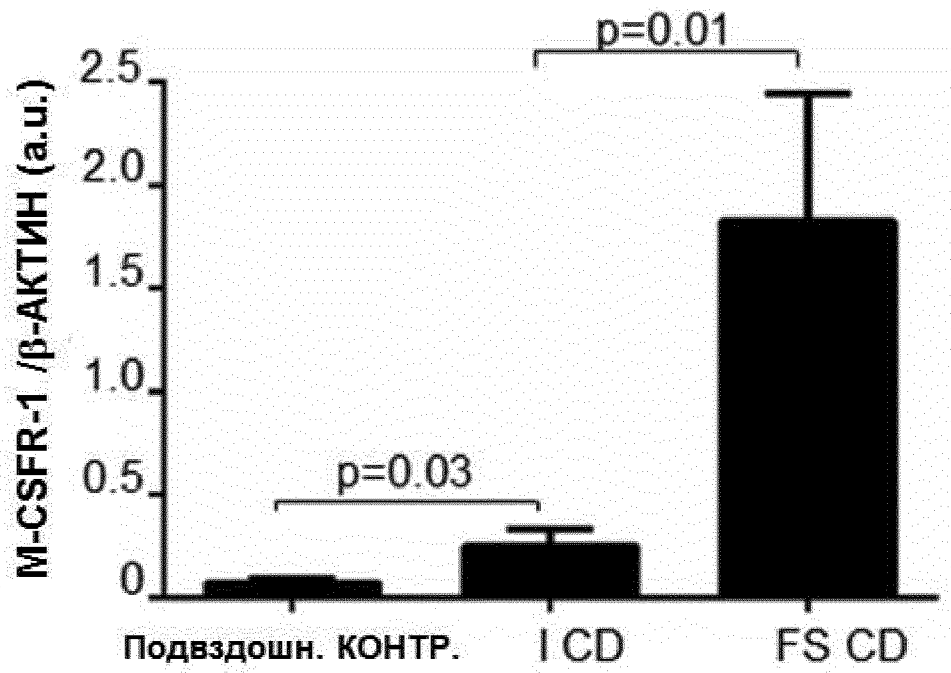
Фиг. 5А



Фиг. 5В



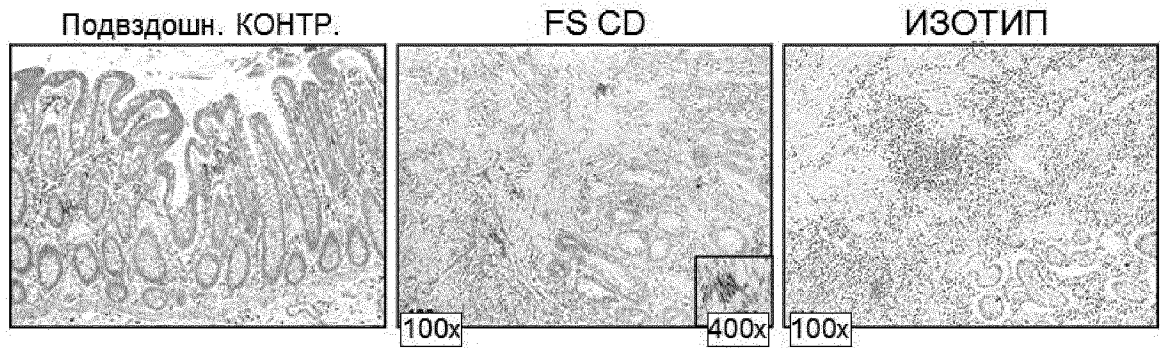
Фиг. 5С



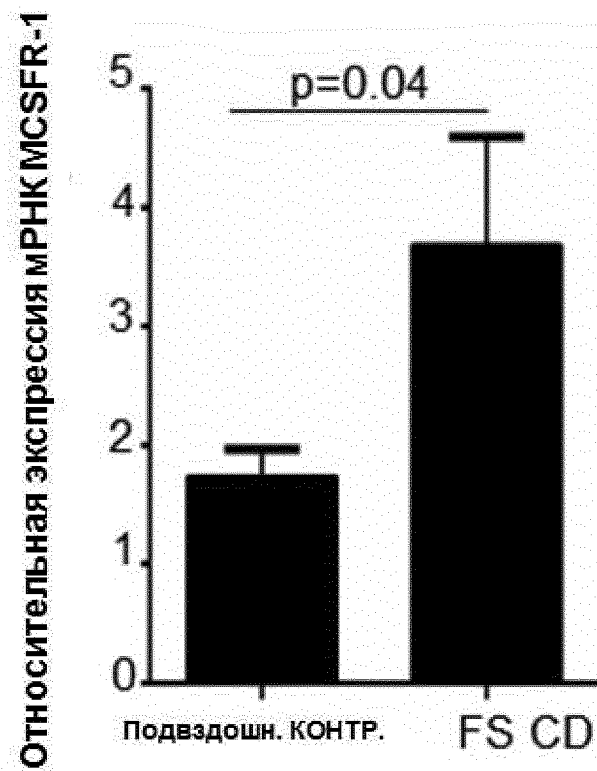
Фиг. 5D

Фиг. 5E

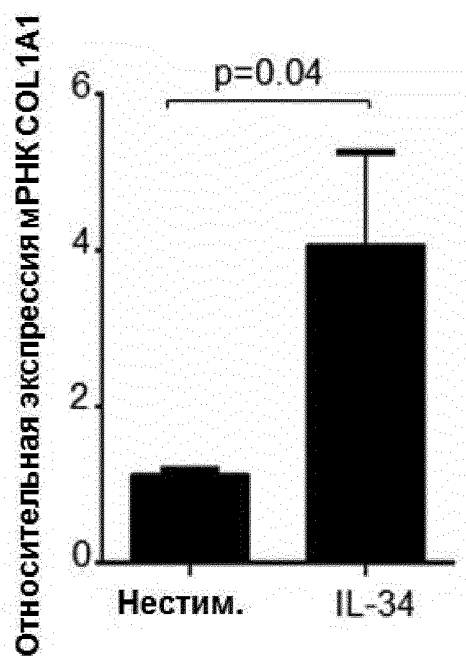
Фиг. 5F



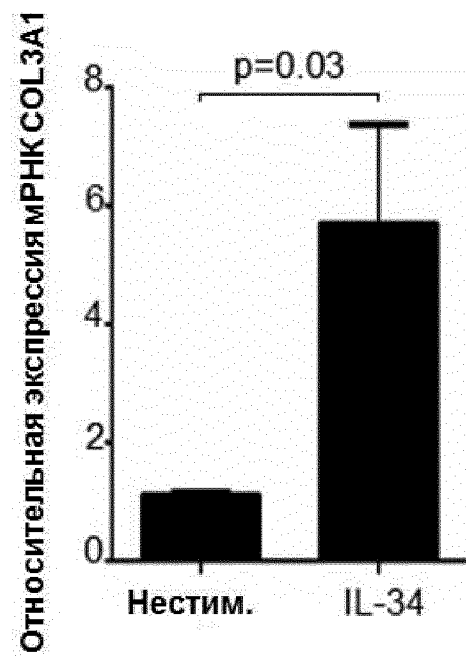
Фиг. 5G



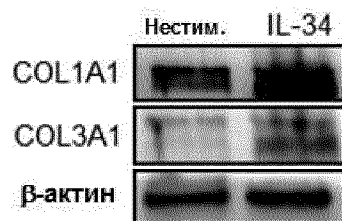
Фиг. 6А



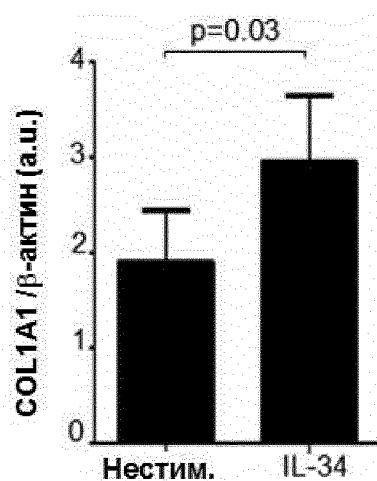
Фиг. 6В



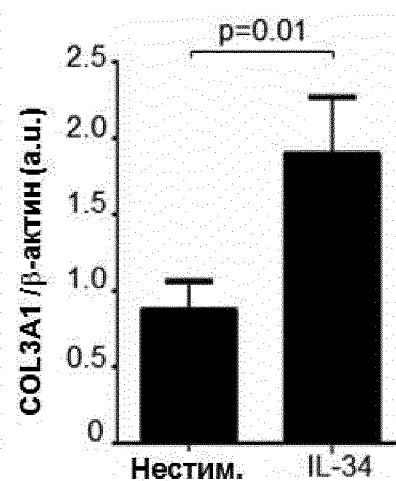
Фиг. 6С



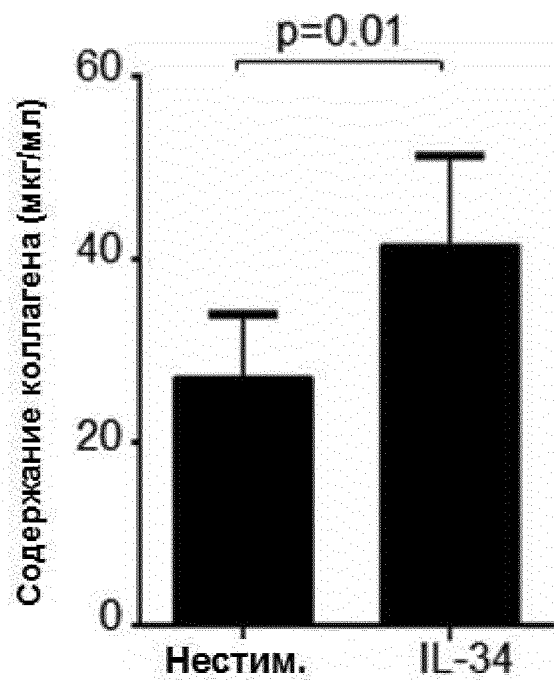
Фиг. 6D



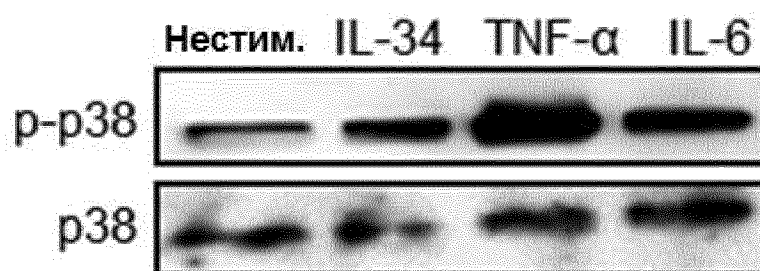
Фиг. 6Е



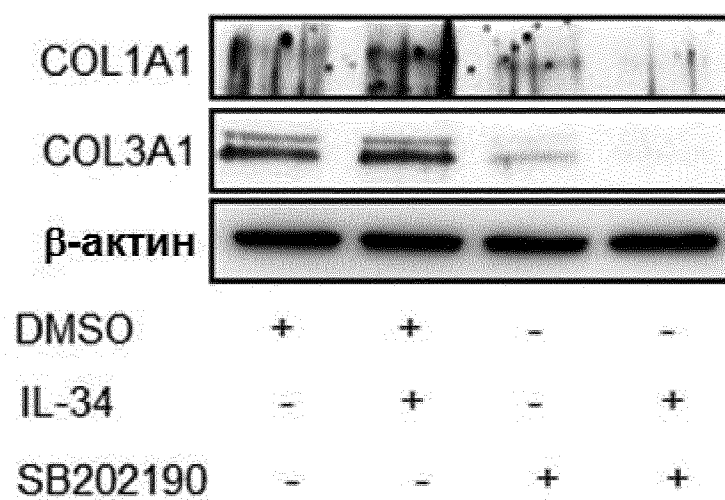
Фиг. 6F



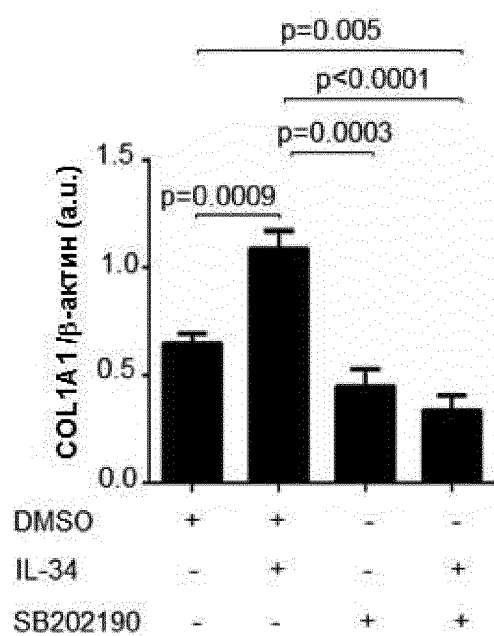
Фиг. 7А



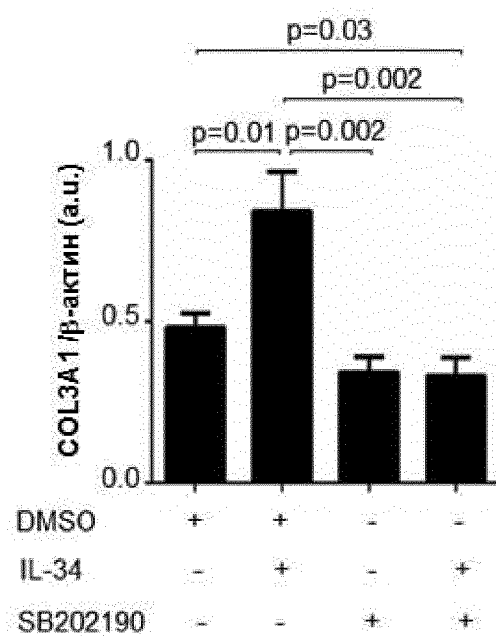
Фиг. 7В



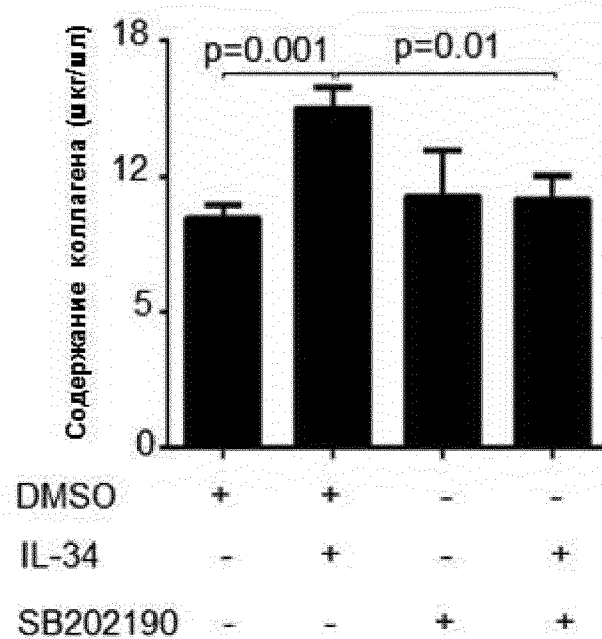
Фиг. 7С



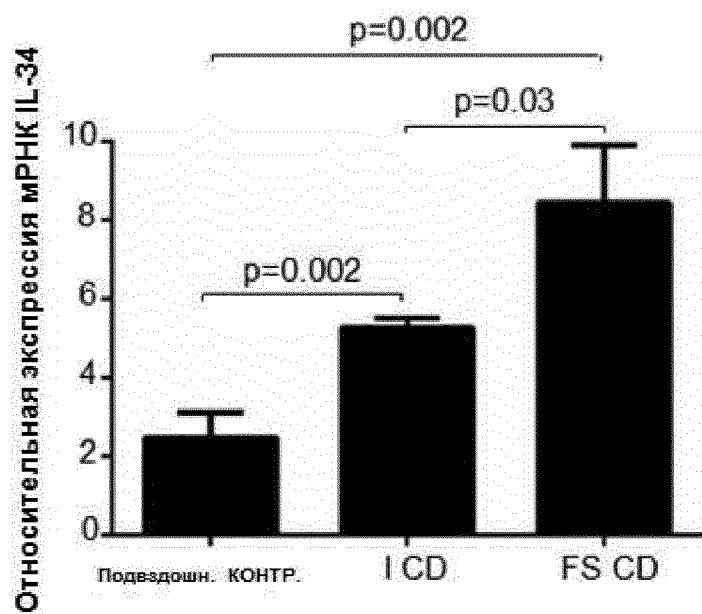
Фиг. 7D



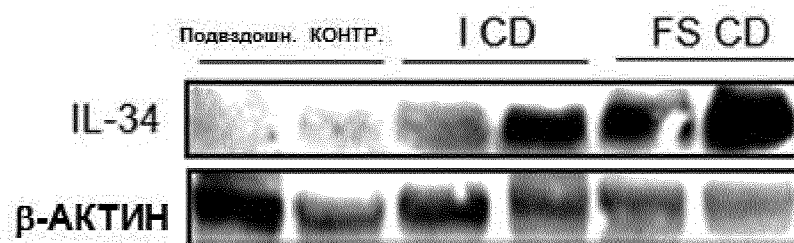
Фиг. 7Е



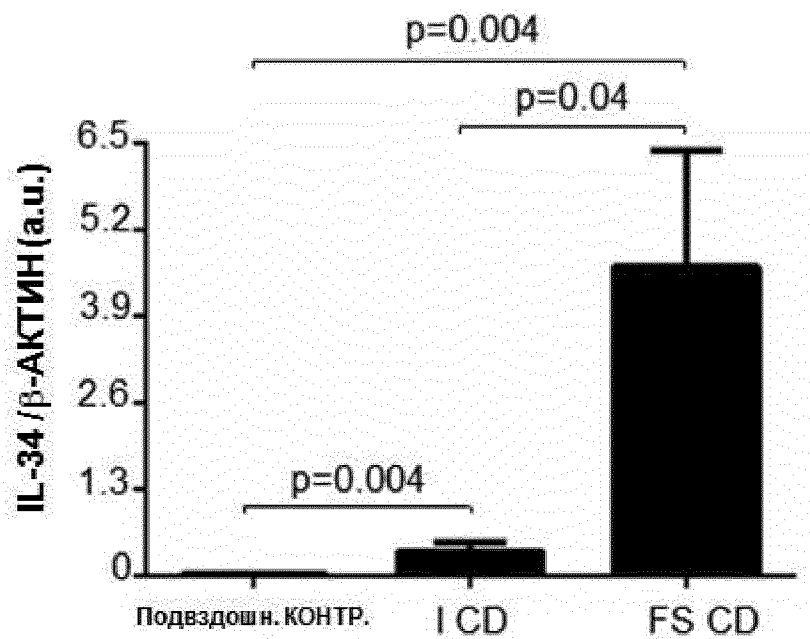
Фиг. 8А



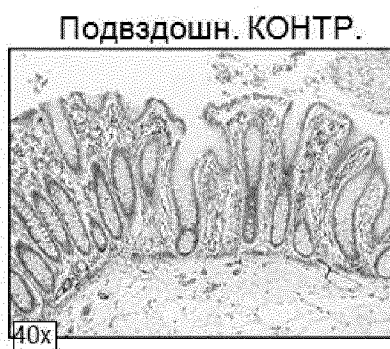
Фиг. 8В



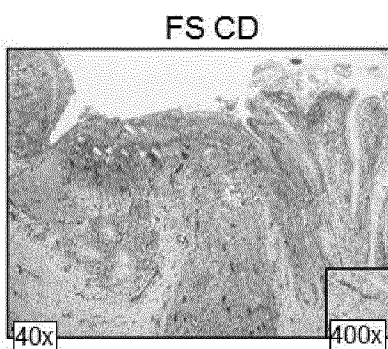
Фиг. 8С



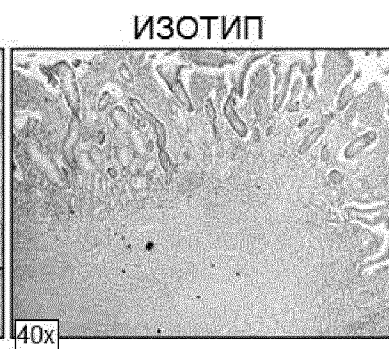
Фиг. 8D



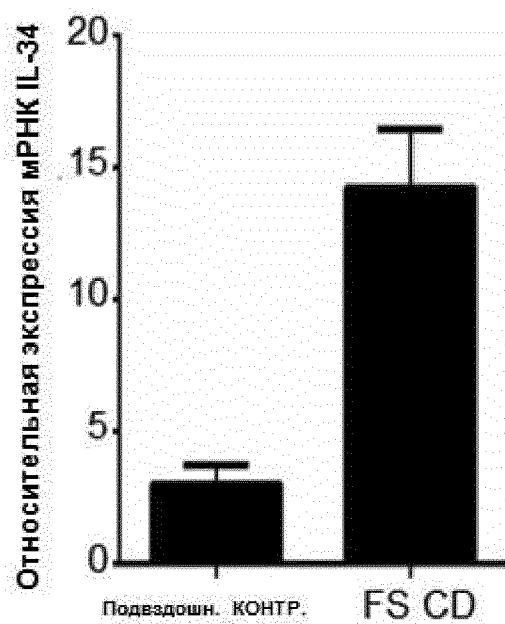
Фиг. 8E



Фиг. 8F

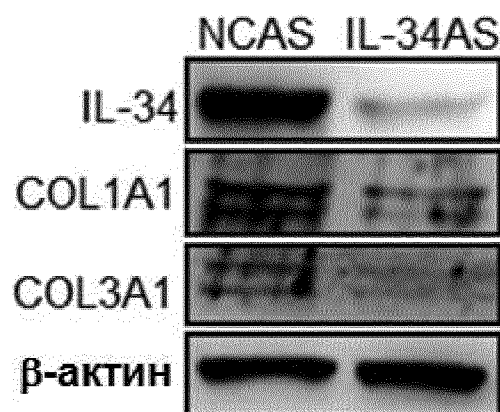


Фиг. 8G



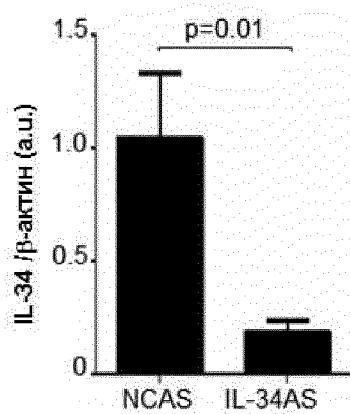
Фиг. 8H



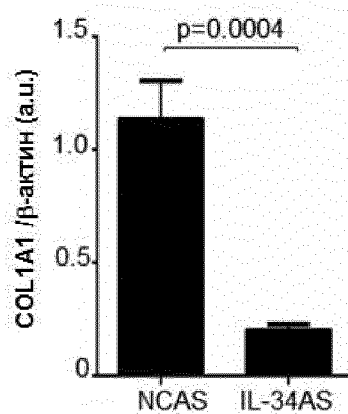


Фиг. 9А

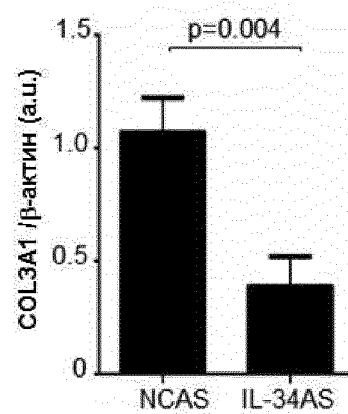
Фиг. 9В



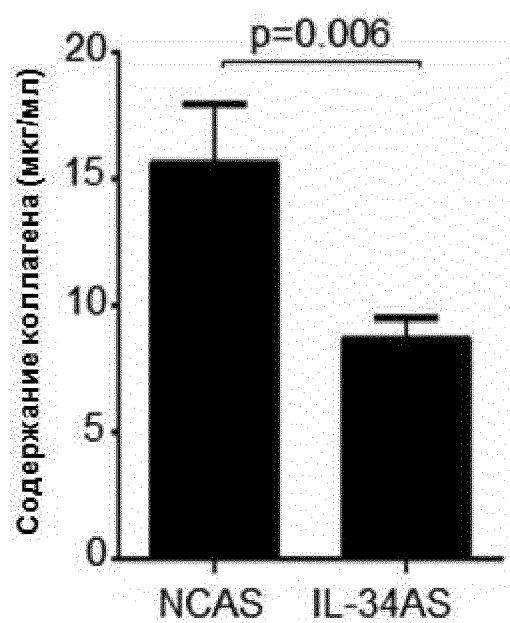
Фиг. 9С



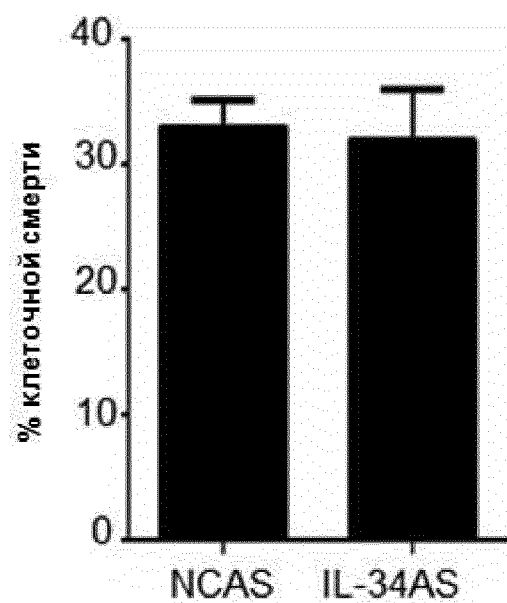
Фиг. 9D



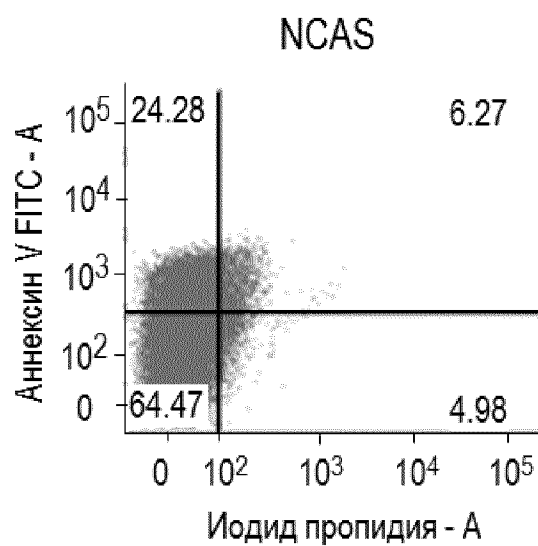
Фиг. 9Е



Фиг. 9F



Фиг. 9G



Фиг.9H

