

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202293058** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2023.03.01

(51) Int. Cl. **C12N 15/113** (2010.01)

(22) Дата подачи заявки
2021.04.23

(54) **КОМПОЗИЦИИ АНТИСМЫСЛОВЫХ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ (ASO) ПРОТИВ SMAD7 И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ**

(31) **63/015,120; 63/030,818; 63/135,283**

(72) Изобретатель:

(32) **2020.04.24; 2020.05.27; 2021.01.08**

Вити Франческа (СН), Монтелеоне

(33) **US**

Джованни (ИТ), Беллинвиа

(86) **PCT/IB2021/000272**

Сальваторе (СН), Демартис

(87) **WO 2021/214548 2021.10.28**

Сальваторе (ИТ), Макналти Мэри (IE)

(88) **2021.12.09**

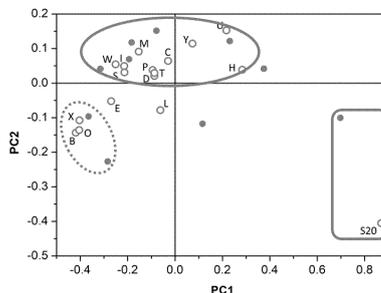
(74) Представитель:

(71) Заявитель:

Медведев В.Н. (RU)

НОГРА ФАРМА ЛИМИТЕД (IE)

(57) Изобретение относится к композициям олигонуклеотида (например, диастереомеров антисмыслового олигонуклеотида против SMAD7) и способам производства, оценки эффективности и применения композиций.



202293058

A1

A1

202293058

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-575772EA/032

КОМПОЗИЦИИ АНТИСМЫСЛОВЫХ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ (ASO) ПРОТИВ SMAD7 И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] Настоящей заявке испрашивается приоритет по предварительной патентной заявке США № 63/015120, поданной 24 апреля 2020 года; предварительной патентной заявке США № 63/030818, поданной 27 мая 2020 года; и предварительной патентной заявке США № 63/135283, поданной 8 января 2021 года, полное содержание каждой из которых включено в настоящее описание в качестве ссылки для любых целей.

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[0002] В настоящей заявке приводится отсылка к списку последовательностей, предоставленному в электронной форме в качестве файла.txt под названием "GIU_061_Sequence_Listing.txt" от 23 апреля 2021 года. Файл.txt был создан 24 марта 2021 года и имеет размер 3711 байт. Полное содержание списка последовательностей включено в настоящее описание в качестве ссылки.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0003] Неспособность к наложению объекта на его зеркальное отображение называют хиральностью. Молекула является хиральной, если она не может быть наложена на ее зеркальное отображение. Хиральным центром молекулы является атом, который имеет четыре разных атома или группы, связанных с ним таким образом, что она имеет не способное к наложению зеркальное отображение.

[0004] Стереоизомеры представляют собой молекулы, которые различаются пространственным расположением атомов. Энантиомеры представляют собой пары стереоизомеров, которые являются зеркальными отображениями друг друга, которые не способны к наложению друг на друга. Диастереомеры неидентичные стереоизомеры, не являющиеся зеркальными отображениями.

[0005] Энантиомеры часто имеют идентичные химические и физические свойства за исключением направления, в котором они вращают поляризованный свет и того, как они взаимодействуют с разными хиральными структурами, такими как хиральные рецепторы, хиральные растворители, хиральные хроматографические стационарные фазы и электромагнитное излучение. С другой стороны, диастереомеры проявляют разные химические и физические свойства и, как правило, считаются разными химическими и фармакологическими структурами.

[0006] Многие биологические молекулы и компоненты биологических систем (например, рецепторы, ферменты и кофакторы) являются хиральными, и разные стереоизомеры могут иметь разные эффекты на биологические организмы. Хиральность лекарственного средства может влиять на все аспекты фармакологической и фармакокинетической активности, например, биодоступность, распределение, метаболизм и способность к проникновению. Например, в то время как один из энантиомеров

лекарственного средства может иметь благоприятные физиологические и/или клинические эффекты, другой энантиомер может быть менее активным или неактивным, может иметь отличающуюся физиологическую и/или клиническую активность, или вызывать неблагоприятные эффекты.

[0007] Олигонуклеотиды представляют собой короткие молекулы ДНК или РНК, которые имеют широкий диапазон применений в терапии (например, антисмысловая терапия), генетическом тестировании и криминалистике. Олигонуклеотиды химически синтезируют с использованием нуклеотидных строительных блоков. Для повышения стабильности олигонуклеотидов используют химические модификации, такие как модификации фосфодиэфирного остова и модификации сахарного кольца. Фосфоротиоатная (PS) модификация остова является обычной практикой для защиты синтетических олигонуклеотидов от деградации, улучшая стабильность и фармакологический профиль олигонуклеотидов. Модификация PS конвертирует локально ахиральный атом фосфора фосфодиэфирной (PO) связи в хиральный центр PS, что приводит к диастереомерам синтетических олигонуклеотидов. Однако обычные способы синтеза PS-модифицированных олигонуклеотидов не позволяют контролировать хиральность атома фтора. Между тем, уровни индивидуальных диастереомеров в данной синтетической партии PS-олигонуклеотидов не могут быть аналитически определены без контроля хиральности фосфора.

[0008] В то время как то, как контроль хиральности PS-связи модулирует терапевтический профиль олигонуклеотидов все еще обсуждается, последние исследования указывают на то, что стереомерно-определенные системы могут иметь увеличенную терапевтическую эффективность. В данной области описаны способы оценки стереоизомерной чистоты, например, вращение плоскости поляризации света, или поляриметрия, и спектроскопия с использованием ядерного магнитного резонанса (ЯМР).

[0009] Остается необходимость в усовершенствованных стратегиях оценки профиля диастереомеров PS-олигонуклеотидов и прогнозирования их соответствующей фармакологической и/или клинической эффективности. Кроме того, остается потребность в предоставлении олигонуклеотидов с определенными диастереомерными профилями, имеющих известную фармакологическую и/или клиническую эффективность. Настоящее изобретение относится к олигонуклеотидам, имеющим охарактеризованные профили диастереомеров, и к усовершенствованным стратегиям оценки и прогнозирования их фармакологической и/или клинической эффективности с использованием профилей диастереомеров.

[0010] Болезнь Крона (CD) представляет собой хроническое воспалительное нарушение, характеризующееся трансмуральными и сегментарными очагами повреждения. CD может возникать в любой части пищеварительного тракта, хотя наиболее часто вовлеченными областями являются нижняя часть подвздошной кишки и восходящая ободочная кишка. Практически половине пациентов с CD требуется хирургическая операция в пределах 10 лет после постановки диагноза. Резекция кишки

(например, илеоцекальная резекция) является наиболее распространенной хирургической процедурой при CD. Однако хирургическая операция не излечивает от CD. Хотя хирургическая операция часто приводит к клинической ремиссии, у большинства пациентов в конечном итоге происходит рецидив и требуется следующая хирургическая операция. Послеоперационный рецидив CD может быть диагностирован на основе гистологических или эндоскопических данных или по наличию клинических симптомов.

[0011] Остается потребность в стратегиях прогнозирования, лечения и предупреждения послеоперационного рецидива CD. Настоящее изобретение относится к способам прогнозирования, лечения и/или предупреждения послеоперационного рецидива CD и идентификации пациентов, имеющих риск послеоперационного рецидива CD.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0012] Настоящая заявка относится к фармацевтическим композициям диастереомеров антисмысловых олигонуклеотидов против SMAD7 и к способам производства, оценки эффективности и применения композиций.

[0013] Таким образом, один из аспектов настоящей заявки относится к фармацевтической композиции, содержащей множество диастереомеров антисмыслового олигонуклеотида (ASO) против SMAD7, имеющего последовательность согласно SEQ ID NO: 1 (5'-GTXGCCCTTCTCCCXGCAGC-3'), в котором все межнуклеозидные связи представляют собой O, O-связанные фосфоротиоатные связи и X представляет собой 5-метил 2'-дезокситидин, где множество диастереомеров имеют спектр ядерного магнитного резонанса фосфора-31 (³¹P-ЯМР), включающий: а) один или несколько резонансов между 54,8 и 55,5 м.д.; и б) показатель первого главного компонента (PC1) и показатель второго главного компонента (PC2), где: (i) показатель PC1 ниже приблизительно -0,20 или выше приблизительно 0,25 и показатель PC2 ниже приблизительно 0,00; или (ii) показатель PC1 находится за пределами диапазона от -0,32 до 0,30 и/или показатель PC2 находится за пределами диапазона от 0,00 до 0,20.

[0014] В некоторых вариантах осуществления спектр ³¹P-ЯМР включает показатель PC1 ниже приблизительно -0,20 и показатель PC2 ниже приблизительно 0,00. В некоторых вариантах осуществления спектр ³¹P-ЯМР включает показатель PC1, который составляет от приблизительно -0,47 до приблизительно -0,20, и показатель PC2, который составляет от приблизительно -0,27 до приблизительно 0,00. В некоторых вариантах осуществления спектр ³¹P-ЯМР включает показатель PC1 выше приблизительно 0,25 и показатель PC2 ниже приблизительно 0,00. В некоторых вариантах осуществления спектр ³¹P-ЯМР включает показатель PC1 от приблизительно 0,65 до приблизительно 0,9 и показатель PC2 от приблизительно -0,47 до приблизительно 0,00. В некоторых вариантах осуществления спектр ³¹P-ЯМР включает показатель PC1, который находится за пределами диапазона от -0,32 до 0,30, когда показатель PC2 выше 0,00 и ниже 0,20. В некоторых вариантах осуществления спектр ³¹P-ЯМР включает показатель PC2, который находится за пределами диапазона от 0,00 до 0,20, когда показатель PC1 выше -0,32 и ниже 0,30.

[0015] В некоторых вариантах осуществления спектр ³¹P-ЯМР включает два или

более резонансов между 54,8 и 55,5 м.д. В некоторых вариантах осуществления два или более резонансов между 54,8 и 55,5 м.д. имеют разную интенсивность. В некоторых вариантах осуществления спектр ^{31}P -ЯМР независимо включает один или несколько резонансов на уровне приблизительно 54,8 м.д., на уровне приблизительно 54,9 м.д., на уровне приблизительно 55,0 м.д., на уровне приблизительно 55,1 м.д., на уровне приблизительно 55,2 м.д., на уровне приблизительно 55,3 м.д., на уровне приблизительно 55,4 м.д. и/или на уровне приблизительно 55,5 м.д. В некоторых вариантах осуществления спектр ^{31}P -ЯМР независимо включает два или более резонансов на уровне приблизительно 54,8 м.д., на уровне приблизительно 54,9 м.д., на уровне приблизительно 55,0 м.д., на уровне приблизительно 55,1 м.д., на уровне приблизительно 55,2 м.д., на уровне приблизительно 55,3 м.д., на уровне приблизительно 55,4 м.д. и/или на уровне приблизительно 55,5 м.д.

[0016] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит от 100 миллимоль до 5 моль ASO против SMAD7. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит от 100 миллимоль до 2 моль, от 100 миллимоль до 900 миллимоль, от 300 миллимоль до 5 моль, от 300 миллимоль до 2 моль, от 300 миллимоль до 900 миллимоль, от 900 миллимоль до 5 моль, или от 900 миллимоль до 2 моль ASO против SMAD7. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит приблизительно 300 миллимоль ASO против SMAD7. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит приблизительно 900 миллимоль ASO против SMAD7. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит приблизительно 2 моль ASO против SMAD7. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит более 300 миллимоль, более 900 миллимоль или более 2 моль ASO против SMAD7.

[0017] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит: а) от приблизительно 0,5% до приблизительно 30% по массе ASO против SMAD7; б) от приблизительно 20% до приблизительно 50% по массе маннита; в) от приблизительно 10% до приблизительно 30% по массе микрокристаллической целлюлозы; и д) кишечнорастворимое покрытие, содержащее сополимер этилакрилат-метакриловая кислота. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит: а) внутригранулярную фазу, содержащую: i) от приблизительно 5% до приблизительно 10% по массе ASO против SMAD7; ii) приблизительно 40% по массе маннита; iii) приблизительно 8% по массе микрокристаллической целлюлозы; iv) приблизительно 5% по массе гидроксипропилметилцеллюлозы; и v) приблизительно 2% по массе натрия крахмала гликолята; б) внегранулярную фазу, содержащую: i) приблизительно 17% по массе микрокристаллической целлюлозы; ii) приблизительно 2% по массе натрия крахмала гликолята; iii) приблизительно 0,4% по массе стеарата магния; и в) кишечнорастворимое покрытие, содержащее сополимер этилакрилат-метакриловая кислота, где проценты по массе представляют собой массу ингредиентов по сравнению с общей

массой фармацевтической композиции.

[0018] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит: а) от приблизительно 5% до приблизительно 30% по массе ASO против SMAD7; б) от приблизительно 20% до приблизительно 50% по массе маннита; в) от приблизительно 10% до приблизительно 30% по массе микрокристаллической целлюлозы; д) от приблизительно 0,5% до приблизительно 10% по массе гидроксипропилметилцеллюлозы; е) от приблизительно 0,5% до приблизительно 10% по массе натрия крахмала гликолята; ф) приблизительно 0,05% до приблизительно 1% по массе стеарата магния; г) от приблизительно 0,5% до приблизительно 10% по массе Opadry® AMB; и h) от приблизительно 5% до приблизительно 20% по массе Acryl-EZE®. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит: а) приблизительно 8,5% по массе ASO против SMAD7; б) приблизительно 40% по массе маннита; в) приблизительно 25% по массе микрокристаллической целлюлозы; д) приблизительно 5% по массе гидроксипропилметилцеллюлозы; е) приблизительно 4% по массе натрия крахмала гликолята; ф) приблизительно 0,4% по массе стеарата магния; г) приблизительно 4% по массе Opadry® AMB; и h) от приблизительно 10% до приблизительно 15% по массе Acryl-EZE®. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит: а) приблизительно 23% по массе ASO против SMAD7; б) приблизительно 28% по массе маннита; в) приблизительно 25% по массе микрокристаллической целлюлозы; д) приблизительно 5% по массе гидроксипропилметилцеллюлозы; е) приблизительно 4% по массе натрия крахмала гликолята; ф) приблизительно 0,4% по массе стеарата магния; г) приблизительно 4% по массе Opadry® AMB; и h) от приблизительно 7% до приблизительно 12% по массе Acryl-EZE®.

[0019] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию составляют в качестве таблетки. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция предназначена для перорального введения. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция предназначена для перорального введения, где ASO против SMAD7 вводят индивидууму, нуждающемуся в этом, в дозе приблизительно 40 мг, приблизительно 50 мг, приблизительно 60 мг, приблизительно 70 мг, приблизительно 80 мг, приблизительно 90 мг, приблизительно 100 мг, приблизительно 110 мг, приблизительно 120 мг, приблизительно 130 мг, приблизительно 140 мг, приблизительно 150 мг, приблизительно 160 мг, приблизительно 170 мг, приблизительно 180 мг, приблизительно 190 мг или приблизительно 200 мг. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция предназначена для перорального введения приблизительно каждые 6 часов, приблизительно каждые 12 часов, приблизительно каждые 24 часа, приблизительно каждые 48 часов, приблизительно каждые 72 часа, каждые сутки, два раза в неделю, один раз в 2 недели или один раз в месяц. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция предназначена для перорального введения в дозе приблизительно 160 мг в сутки.

[0020] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция подавляет мРНК и/или белок SMAD7 в клетке. В некоторых вариантах осуществления подавление экспрессии белка SMAD7 составляет более 40% по сравнению с клеткой в отсутствие введения. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция является клинически эффективной для лечения или предупреждения воспалительного заболевания кишечника. В некоторых вариантах осуществления воспалительное заболевание кишечника представляет собой болезнь Крона. В некоторых вариантах осуществления болезнь Крона представляет собой послеоперационный рецидив болезни Крона.

[0021] В одном аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения или предупреждения воспалительного заболевания кишечника у индивидуума, нуждающегося в этом, включающему введение индивидууму фармацевтической композиции, описанной в настоящем описании. В одном аспекте настоящее изобретение относится к применению фармацевтической композиции, описанной в настоящем описании, для производства лекарственного средства для лечения воспалительного заболевания кишечника. В одном аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, описанной в настоящем описании, для применения для лечения воспалительного заболевания кишечника. В некоторых вариантах осуществления воспалительное заболевание кишечника представляет собой болезнь Крона. В соответствии с фармацевтической композицией, болезнь Крона представляет собой послеоперационный рецидив болезни Крона.

[0022] В другом аспекте настоящее относится к способу предупреждения или лечения послеоперационного рецидива болезни Крона (CD) у индивидуума, нуждающегося в этом, включающему ингибирование SMAD7 у индивидуума. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один образец индивидуума имеет повышенный уровень SMAD7 относительно известного контрольного уровня, где известный контрольный уровень представляет собой уровень SMAD7 в образце, полученном от индивидуума до или в ходе хирургического лечения CD, или уровень SMAD7 в образце, полученном от здорового индивидуума без CD.

[0023] В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу предупреждения или лечения послеоперационного рецидива болезни Крона (CD) у индивидуума, нуждающегося в этом, включающему предупреждение показателя индекса активности болезни Крона (CDAI) более 200 у индивидуума или снижение показателя CDAI по меньшей мере на 50 баллов. В некоторых вариантах осуществления способ включает предупреждение показателя CDAI более 150. В некоторых вариантах осуществления способ включает снижение показателя CDAI по меньшей мере на 100 баллов.

[0024] В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу прогнозирования послеоперационного рецидива болезни Крона (CD) у индивидуума, нуждающегося в этом, включающему определение уровня SMAD7 в первом образце

индивидуума, где повышенный уровень SMAD7 относительно известного контрольного уровня прогнозирует рецидив CD, где известный контрольный уровень представляет собой уровень SMAD7 в образце, полученном от индивидуума до или в ходе хирургического лечения CD, или уровень SMAD7 в образце, полученном от здорового индивидуума без CD.

[0025] В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу идентификации индивидуума, имеющего риск послеоперационного рецидива болезни Крона (CD), включающему: определение уровня SMAD7 в первом образце индивидуума, где повышенный уровень SMAD7 относительно известного контрольного уровня идентифицирует индивидуума как имеющего риск рецидива CD, где известный контрольный уровень представляет собой уровень SMAD7 в образце, полученном от индивидуума до или в ходе хирургического лечения CD, или уровень SMAD7 в образце, полученном от здорового индивидуума без CD.

[0026] В некоторых вариантах осуществления, если уровень SMAD7 повышен относительно известного контрольного уровня, тогда проводят введение индивидууму фармацевтической композиции, содержащей ASO против SMAD7; или, если уровень SMAD7 не повышен относительно известного уровня, тогда проводят определение уровня SMAD7 во втором образце индивидуума.

[0027] В некоторых вариантах осуществления второй образец получают непосредственно после, приблизительно через 1 час, приблизительно через 3 часа, приблизительно через 6 часов, приблизительно через 12 часов, приблизительно через 1 сутки, приблизительно через 3 суток, приблизительно через 1 одну неделю, приблизительно через 2 недели, приблизительно через 1 месяц, приблизительно через 2 месяца, приблизительно через 3 месяца, приблизительно через 4 месяца, приблизительно через 5 месяцев, приблизительно через 6 месяцев, приблизительно через 7 месяцев, приблизительно через 8 месяцев, приблизительно через 9 месяцев, приблизительно через 10 месяцев, приблизительно через 11 месяцев или приблизительно через 12 месяцев после первого образца.

[0028] В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу предупреждения или лечения послеоперационного рецидива болезни Крона (CD) у индивидуума, нуждающегося в этом, включающему введение индивидууму фармацевтической композиции, содержащей ASO против SMAD7.

[0029] В некоторых вариантах осуществления ингибирование SMAD7 у индивидуума включает введение индивидууму фармацевтической композиции, содержащей ASO против SMAD7. В некоторых вариантах осуществления ASO против SMAD7 вводят в дозе приблизительно 40 мг, приблизительно 50 мг, приблизительно 60 мг, приблизительно 70 мг, приблизительно 80 мг, приблизительно 90 мг, приблизительно 100 мг, приблизительно 110 мг, приблизительно 120 мг, приблизительно 130 мг, приблизительно 140 мг, приблизительно 150 мг, приблизительно 160 мг, приблизительно 170 мг, приблизительно 180 мг, приблизительно 190 мг или приблизительно 200 мг. В

некоторых вариантах осуществления ASO против SMAD7 вводят приблизительно каждые 6 часов, приблизительно каждые 12 часов, приблизительно каждые 24 часа, приблизительно каждые 48 часов, приблизительно каждые 72 часа, каждые сутки, два раза в неделю, один раз в 2 недели или один раз в месяц. В некоторых вариантах осуществления ASO против SMAD7 вводят в дозе приблизительно 160 мг в сутки.

[0030] В некоторых вариантах осуществления ASO против SMAD7 содержит последовательность, выбранную из любой из SEQ ID NO: 1-6 или их фармацевтически приемлемой соли. В некоторых вариантах осуществления ASO против SMAD7 имеет последовательность согласно SEQ ID NO: 1 (5'-GTXGCCCTTCTCCCXGCAGC-3'), в которой все межнуклеозидные связи представляют собой O, O-связанные фосфоротиоатные связи и X представляет собой 5-метил 2'-дезокситидин. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит множество диастереомеров ASO против SMAD7, имеющих последовательность согласно SEQ ID NO: 1 (5'-GTXGCCCTTCTCCCXGCAGC-3'), в которых все межнуклеозидные связи представляют собой O, O-связанные фосфоротиоатные связи и X представляет собой 5-метил 2'-дезокситидин, где множество диастереомеров имеют спектр ^{31}P -ЯМР, включающий: а) один или несколько резонансов между 54,8 и 55,5 м.д.; и б) показатель первого главного компонента (PC1) и показатель второго главного компонента (PC2), где: (i) показатель PC1 ниже приблизительно -0,20 или выше приблизительно 0,25 и показатель PC2 ниже приблизительно 0,00; или (ii) показатель PC1 находится за пределами диапазона от -0,32 до 0,30 и/или показатель PC2 находится за пределами диапазона от 0,00 до 0,20. В некоторых вариантах осуществления спектр ^{31}P -ЯМР включает: а) показатель PC1 ниже приблизительно -0,20 и показатель PC2 ниже приблизительно 0,00; б) показатель PC1 выше приблизительно 0,25 и показатель PC2 ниже приблизительно 0,00; в) показатель PC1 от приблизительно -0,47 до приблизительно -0,20 и показатель PC2 от приблизительно -0,27 до приблизительно 0,00; д) показатель PC1 от приблизительно 0,65 до приблизительно 0,9 и показатель PC2 от приблизительно -0,47 до приблизительно 0,00; е) показатель PC1 за пределами диапазона от -0,32 до 0,30, когда показатель PC2 выше 0,00 и ниже 0,20; и/или; и/или ф) показатель PC2 за пределами диапазона от 0,00 до 0,20, когда показатель PC1 выше -0,32 и ниже 0,30.

[0031] В некоторых вариантах осуществления послеоперационный рецидив выбран из группы, состоящей из: эндоскопического рецидива, гистологического рецидива, радиологического рецидива, клинического рецидива и их комбинаций.

[0032] В некоторых вариантах осуществления индивидууму проводят по меньшей мере одно хирургическое лечение CD. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно хирургическое лечение выбрано из группы, состоящей из: резекции кишки, тонкотолстокишечной резекции, колэктомии, проктоколэктомии, пластики стриктуры, илеостомии, анальной фистулотомии и их комбинации. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно хирургическое лечение представляет собой тонкотолстокишечную резекцию.

[0033] В некоторых вариантах осуществления индивидуум не имеет признаков послеоперационного рецидива. В некоторых вариантах осуществления индивидуум имеет по меньшей мере один признак послеоперационного рецидива. В некоторых вариантах осуществления индивидуум имеет по меньшей мере один признак эндоскопического рецидива. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один признак представляет собой очаг повреждения слизистой оболочки.

[0034] В некоторых вариантах осуществления образец представляет собой образец слизистой оболочки. В некоторых вариантах осуществления образец получен непосредственно после, приблизительно через 1 час, приблизительно через 3 часа, приблизительно через 6 часов, приблизительно через 12 часов, приблизительно через 1 сутки, приблизительно через 3 суток, приблизительно через 1 неделю, приблизительно через 2 недели, приблизительно через 1 месяц, приблизительно через 2 месяца, приблизительно через 3 месяца, приблизительно через 4 месяца, приблизительно через 5 месяцев, приблизительно через 6 месяцев, приблизительно через 7 месяцев, приблизительно через 8 месяцев, приблизительно через 9 месяцев, приблизительно через 10 месяцев, приблизительно через 11 месяцев или приблизительно через 12 месяцев после хирургического лечения CD.

[0035] В некоторых вариантах осуществления уровень SMAD7 представляет собой уровень мРНК SMAD7 или уровень белка SMAD7. В некоторых вариантах осуществления повышение уровня SMAD7 составляет по меньшей мере приблизительно 10%, по меньшей мере приблизительно 20%, по меньшей мере приблизительно 30%, по меньшей мере приблизительно 40%, по меньшей мере приблизительно 60% или по меньшей мере приблизительно 80% по сравнению с известным контрольным уровнем.

[0036] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию вводят перорально. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию вводят непосредственно после, приблизительно через 1 час, приблизительно через 3 часа, приблизительно через 6 часов, приблизительно через 12 часов, приблизительно через 1 сутки, приблизительно через 3 суток, приблизительно через 1 неделю, приблизительно через 2 недели, приблизительно через 1 месяц, приблизительно через 2 месяца, приблизительно через 3 месяца, приблизительно через 4 месяца, приблизительно через 5 месяцев, приблизительно через 6 месяцев, приблизительно через 7 месяцев, приблизительно через 8 месяцев, приблизительно через 9 месяцев, приблизительно через 10 месяцев, приблизительно через 11 месяцев или приблизительно через 12 месяцев после хирургического лечения CD.

[0037] В другом аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей множество диастереомеров антисмыслового олигонуклеотида (ASO) против SMAD7, являющихся фармакологически и/или клинически эффективными, которая получена способом, включающим: а) подтверждение спектра ^{31}P -ЯМР для множества диастереомеров, имеющего один или несколько резонансов между 54,8 и 55,5 м.д.; и б) подтверждение того, что спектр ^{31}P -ЯМР имеет: (i) показатель первого главного

компонента (PC1) ниже приблизительно -0,20 или выше приблизительно 0,25 и показатель второго главного компонента (PC2) ниже приблизительно 0,00, или (ii) показатель PC1, который находится за пределами диапазона от -0,32 до 0,30, и/или показатель PC2, который находится за пределами диапазона от 0,00 до 0,20 при определении посредством анализа главных компонент (PCA).

[0038] В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу производства фармацевтической композиции, содержащей множество диастереомеров антисмыслового олигонуклеотида (ASO) против SMAD7, причем способ включает: а) подтверждение спектра ^{31}P -ЯМР для множества диастереомеров одного или нескольких резонансов между 54,8 и 55,5 м.д.; и б) подтверждение того, что спектр ^{31}P -ЯМР имеет: (i) показатель первого главного компонента (PC1) ниже приблизительно -0,20 или выше приблизительно 0,25 и показатель второго главного компонента (PC2) ниже приблизительно 0,00, или (ii) показатель PC1, который находится за пределами диапазона от -0,32 до 0,30, и/или показатель PC2, который находится за пределами диапазона от 0,00 до 0,20 при определении посредством анализа главных компонент (PCA).

[0039] В некоторых вариантах осуществления способ включает подтверждение того, что: а) показатель PC1 ниже приблизительно -0,20 и показатель PC2 ниже приблизительно 0,00; б) показатель PC1 выше приблизительно 0,25 и показатель PC2 ниже приблизительно 0,00; в) показатель PC1 составляет от приблизительно -0,47 до приблизительно -0,20 и показатель PC2 составляет от приблизительно -0,27 до приблизительно 0,00; д) показатель PC1 составляет от приблизительно 0,65 до приблизительно 0,9 и показатель PC2 составляет от приблизительно -0,47 до приблизительно 0,00; е) показатель PC1 находится за пределами диапазона от -0,32 до 0,30, когда показатель PC2 выше 0,00 и ниже 0,20; и/или ф) показатель PC2 находится за пределами диапазона от 0,00 до 0,20, когда показатель PC1 выше -0,32 и ниже 0,30. В некоторых вариантах осуществления способ включает подтверждение того, что: а) спектр ^{31}P -ЯМР имеет два или более резонанса между 54,8 и 55,5 м.д.; б) спектр ^{31}P -ЯМР имеет один или несколько резонансов на уровне приблизительно 54,8 м.д.; в) спектр ^{31}P -ЯМР имеет два или более резонансов на уровне приблизительно 54,8 м.д.; д) спектр ^{31}P -ЯМР имеет один или несколько резонансов на уровне приблизительно 54,9 м.д.; е) спектр ^{31}P -ЯМР имеет два или более резонансов на уровне приблизительно 54,9 м.д.; ф) спектр ^{31}P -ЯМР имеет один или несколько резонансов на уровне приблизительно 55,0 м.д.; г) спектр ^{31}P -ЯМР имеет два или более резонансов на уровне приблизительно 55,0 м.д.; х) спектр ^{31}P -ЯМР имеет один или несколько резонансов на уровне приблизительно 55,1 м.д.; и) спектр ^{31}P -ЯМР имеет два или более резонансов на уровне приблизительно 55,1 м.д.; j) спектр ^{31}P -ЯМР имеет один или несколько резонансов на уровне приблизительно 55,2 м.д.; к) спектр ^{31}P -ЯМР имеет два или более резонансов на уровне приблизительно 55,2 м.д.; l) спектр ^{31}P -ЯМР имеет один или несколько резонансов на уровне приблизительно 55,3 м.д.; m) спектр ^{31}P -ЯМР имеет два или более резонансов на уровне приблизительно 55,3 м.д.; n) спектр ^{31}P -ЯМР имеет один или несколько резонансов на уровне

приблизительно 55,4 м.д.; о) спектр ^{31}P -ЯМР имеет два или более резонансов на уровне приблизительно 55,4 м.д.; р) спектр ^{31}P -ЯМР имеет один или несколько резонансов на уровне приблизительно 55,5 м.д.; q) спектр ^{31}P -ЯМР имеет два или более резонансов на уровне приблизительно 55,5 м.д.; и/или r) спектр ^{31}P -ЯМР имеет два или более резонансов между 54,8 и 55,5 с разной интенсивностью.

[0040] В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу прогнозирования фармакологической и/или клинической эффективности композиции-кандидата, содержащей множество диастереомеров антисмыслового олигонуклеотида (ASO) против SMAD7, причем способ включает проведение для спектра ^{31}P -ЯМР для множества диастереомеров анализа главных компонентов (PCA) с получением первого главного компонента (PC1) и второго главного компонента (PC2), где: а) показатель PC1 ниже приблизительно -0,20 или выше приблизительно 0,25, и показатель PC2 ниже приблизительно 0,00 прогнозирует фармакологическую и/или клиническую эффективность, или б) показатель PC1 за пределами диапазона от -0,32 до 0,31 и/или показатель PC2 за пределами диапазона от 0,00 до 0,20 прогнозирует фармакологическую и/или клиническую эффективность. В некоторых вариантах осуществления а) показатель PC1 ниже приблизительно -0,20 и показатель PC2 ниже приблизительно 0,00; б) показатель PC1 выше приблизительно 0,25 и показатель PC2 ниже приблизительно 0,00; с) показатель PC1 от приблизительно -0,47 до приблизительно -0,20 и показатель PC2 от приблизительно -0,27 до приблизительно 0,00; d) показатель PC1 от приблизительно 0,65 до приблизительно 0,9 и показатель PC2 от приблизительно -0,47 до приблизительно 0,00; е) показатель PC1 за пределами диапазона от -0,32 до 0,30, когда показатель PC2 выше 0,00 и ниже 0,20; и/или f) показатель PC2 за пределами диапазона от 0,00 до 0,20, когда показатель PC1 выше -0,32 и ниже 0,30, прогнозирует фармакологическую и/или клиническую эффективность.

[0041] В некоторых вариантах осуществления PCA включает выбор главных компонентов с использованием моделирующего набора данных. В некоторых вариантах осуществления моделирующий набор данных включает пять, шесть, семь, восемь, девять, десять или вплоть до двадцати семи спектров ^{31}P -ЯМР, выбранных из спектров ^{31}P -ЯМР, как показано на фиг.5C-5CC. В некоторых вариантах осуществления моделирующий набор данных включает спектры ^{31}P -ЯМР, как показано на фиг.5C, 5L, 5X, 5H, 5P, 5I, 5M, 5T, 5S и 5BB. В некоторых вариантах осуществления главные компоненты выбраны с учетом более 90% дисперсии моделирующего набора данных. В некоторых вариантах осуществления ^{31}P -ЯМР проводят при разрешении приблизительно 14,1 Т. В некоторых вариантах осуществления ASO против SMAD7 содержит последовательность, выбранную из любой из SEQ ID NO: 1-6 или их фармацевтически приемлемых солей. В некоторых вариантах осуществления межнуклеотидные связи ASO против SMAD7 представляют собой O, O-связанные фосфоротиоаты. В некоторых вариантах осуществления ASO против SMAD7 имеет последовательность согласно SEQ ID NO: 1 (5'-GTXGCCCCCTTCTCCCXGCAGC-3'), в которой все межнуклеозидные связи представляют

собой O, O-связанные фосфоротиоатные связи и X представляет собой 5-метил 2'-дезоксцитидин.

[0042] В некоторых вариантах осуществления в рамках настоящего изобретения предусматривается способ лечения воспалительного заболевания кишечника у индивидуума, нуждающегося в этом, включающий введение индивидууму ASO против SMAD7, произведенного способом, описанным в настоящем описании, или ASO против SMAD7, который способом, описанным в настоящем описании, спрогнозирован как фармакологически и/или клинически эффективный. В некоторых вариантах осуществления воспалительное заболевание кишечника представляет собой болезнь Крона. В некоторых вариантах осуществления болезнь Крона представляет собой послеоперационную болезнь Крона.

[0043] Эти и другие аспекты и преимущества и другие аспекты изобретения, описанные в настоящей заявке, проиллюстрированы с помощью приведенных ниже чертежей, подробного описания и формулы изобретения.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

[0044] Для понимания изобретения и для демонстрации того, как его можно применять на практике, далее варианты осуществления описаны только в качестве неограничивающих примеров с ссылкой на прилагаемые чертежи, на которых:

[0045] На **фиг.1** приводится иллюстрация, демонстрирующая структуру иллюстративных антисмысловых олигонуклеотидов (ASO) против SMAD7.

[0046] На **фиг.2A-2E** представлены изображения вестерн-блотов лизатов цельных клеток, полученных из клеток HCT-116, трансфицированных разными партиями ASO против SMAD7. На **фиг.2A** представлены вестерн-блоты, обработанные SMAD7 (верхняя панель) и контролем нагрузки в виде β-актина (нижняя панель), для лизатов полученных из клеток HCT-116, трансфицированных либо 0,5 мкг/мл, либо 1 мкг/мл ASO против SMAD7 (SEQ ID NO:1) партий T, P, H, A или J, либо только Lipofectamin 3000 (отрицательный контроль). На **фиг.2B** представлены вестер-блоты, обработанные SMAD7 (верхняя панель) и контролем нагрузки в виде β-актина (нижняя панель), для лизатов полученных из клеток HCT-116, трансфицированных 1 мкг/мл ASO против SMAD7 (SEQ ID NO:1) партий E, M, X, B, F, S, C, K, W, U или A, или только Lipofectamin 3000 (отрицательный контроль). На **фиг.2C** представлены вестерн-блоты, обработанные SMAD7 (верхняя панель) и контролем нагрузки в виде β-актина (нижняя панель), для лизатов полученных из клеток HCT-116, трансфицированных 1 мкг/мл ASO против SMAD7 (SEQ ID NO:1) партий I, V, N, O, Y, Z, D, G, Q, L или A, или только Lipofectamin 3000 (отрицательный контроль). На **фиг.2D** представлены вестерн-блоты, обработанные SMAD7 (верхняя панель) и контролем нагрузки в виде β-актина (нижняя панель), для лизатов полученных из клеток HCT-116, трансфицированных 1 мкг/мл ASO против SMAD7 (SEQ ID NO:1) партий A, F, O или S, или только Lipofectamin 3000 (отрицательный контроль). На **фиг.2E** представлены вестерн-блоты, обработанные SMAD7 (верхняя панель) и контролем нагрузки в виде β-актина (нижняя панель), для

лизатов полученных из клеток НСТ-116, трансфицированных 1 мкг/мл ASO против SMAD7 (SEQ ID NO:1) партий А или S20, или только Lipofectamin 3000 (отрицательный контроль).

[0047] На **фиг.3А** представлена столбиковая диаграмма, демонстрирующая среднее процентное отличие экспрессии белка SMAD7 после трансфекции клеток НСТ-116 различными партиями ASO против SMAD7 (SEQ ID NO:1) по сравнению с клетками, обработанными только Lipofectamin 3000 (отрицательный контроль).

[0048] На **фиг.3В** представлена столбиковая диаграмма, демонстрирующая средний показатель эффективности партий ASO против SMAD7 (SEQ ID NO:1) относительно партии А (положительный контроль).

[0049] На **фиг.3С** представлена столбиковая диаграмма, демонстрирующая анализ посредством ПЦР в реальном времени экспрессии мРНК SMAD7 в клетках НСТ-116, трансфицированных ASO против SMAD7 (SEQ ID NO:1) партий А, Х, К или Т, по сравнению с клетками, обработанными только Lipofectamin 3000 (отрицательный контроль).

[0050] На **фиг.4А** представлена столбиковая диаграмма, демонстрирующая среднее изменение показателя индекса активности болезни Крона (СDAI) у пациентов, которым вводили различные партии ASO против SMAD7, по сравнению с исходным уровнем в конце введения каждые сутки в течение 4 недель.

[0051] На **фиг.4В** представлено наложение спектров ^{31}P -ЯМР при 14,1 Т в области 56,5-53,5 м.д. для партий ASO против SMAD7 (SEQ ID NO:1), использованных для лечения пациентов в соответствии с графиком клинической эффективности на **фиг.4А**.

[0052] На **фиг.5А** представлено наложение спектров ^1H -ЯМР 27 протестированных партий ASO против SMAD7 (SEQ ID NO:1). На **фиг.5В** представлено наложение спектров ^{31}P -ЯМР при 14,1 Т в области 57-53 м.д. для 27 протестированных партий ASO против SMAD7 (SEQ ID NO:1). На **фиг.5С, 5D, 5Е, 5F, 5G, 5H, 5I, 5J, 5K, 5L, 5M, 5N, 5O, 5P, 5Q, 5R, 5S, 5T, 5U, 5V, 5W, 5X, 5Y, 5Z, 5AA, 5BB** и **5CC** приведены спектры ^{31}P -ЯМР в области 56,5-53,5 м.д. для ASO против SMAD7 (SEQ ID NO:1) партий А, В, С, D, Е, F, G, H, I, J, K, L, M, N, O, P, Q, R, S, T, U, V, W, X, Y, Z и S20, соответственно. На **фиг.5DD** представлено наложение спектров ^{31}P -ЯМР в области 56,5-53,5 м.д. для ASO против SMAD7 (SEQ ID NO:1) партий А (сплошная линия) и Y (пунктирная линия). На **фиг.5EE** представлено наложение спектров ^{31}P -ЯМР в области 56,5-53,5 м.д. для ASO против SMAD7 (SEQ ID NO:1) партий P (сплошная линия) и T (пунктирная линия). На **фиг.5FF** представлено наложение спектров ^{31}P -ЯМР в области 56,5-53,5 м.д. для ASO против SMAD7 (SEQ ID NO:1) партий А, В и D, которые соответствуют партиям в трех различных областях графика показателя PCA, приведенного на **фиг.7D**.

[0053] На **фиг.6** представлены спектры кругового дихроизма с переменной температурой для разных партий ASO против SMAD7. Точки перегиба указаны серыми кругами.

[0054] На **фиг.7А** представлены наложенные спектры ^{31}P -ЯМР в области 57-53 м.д.

для ASO против SMAD7 партий A, F, G, J, K, N, Q, R, V и Z, использованных в качестве обучающей выборки в анализе главных компонентов (PCA). На **фиг.7B** представлен осыпной график, полученный для спектров ^{31}P -ЯМР партий ASO против SMAD7, использованных в качестве обучающей выборки. На **фиг.7C** представлен график показателя PCA с первыми двумя компонентами спектров ^{31}P -ЯМР партий ASO против SMAD7, использованных в качестве обучающей выборки. На **фиг.7D** представлен график показателя PCA спектров ^{31}P -ЯМР дополнительных партий ASO против SMAD7, спроецированный на график PCA, полученный для обучающей выборки, как представлено на **фиг.7C**.

[0055] На **фиг.8A-8C** представлены репрезентативные эндоскопические изображения нижней области подвздошной кишки пациентов с болезнью Крона (CD) без признаков послеоперационного эндоскопического рецидива (i0), с тяжелым эндоскопическим рецидивом (i4) и с развернутыми очагами повреждения (т.е. развернутой CD) (**фиг.8A**) и иммунологическое окрашивание положительных по SMAD7 клеток у пациентов с CD на разных стадиях заболевания (**фиг.8B** и **фиг.8C**). На вставках 1-3 на **фиг.8C** представлены микрофотографии более высокого увеличения; на вставке 4 на **фиг.8C** представлено иммуногистохимическое окрашивание контрольным IgG.

[0056] На **фиг.9A-9C** представлено количественное определение положительных по SMAD7 клеток в целой слизистой оболочке кишечника (**фиг.9A**), эпителии (**фиг.9B**) и собственной пластинке (**фиг.9C**) пациентов с CD без эндоскопического рецидива (i0-i1), пациентов с CD с эндоскопическим рецидивом (i2-i4), пациентов с CD с развернутыми очагами повреждения (т.е. развернутой CD) и пациентов контрольной группы. Для каждой группы пациентов положительные по SMAD7 клетки подсчитывали вручную по меньшей мере в 5 полях зрения под большим увеличением на срез для 3 независимых экспериментов. Данные представлены в качестве медианы и межквартильных диапазонов.

[0057] На **фиг.10A-10C** представлено количественное определение положительных по SMAD7 клеток в целой слизистой оболочке кишечника (**фиг.10A**), образцах эпителия (**фиг.10B**) и собственной пластинки (**фиг.10C**) от пациентов с CD через 6 месяцев после тонкотолстокишечной хирургической операции, от пациентов с CD через 12 месяцев после тонкотолстокишечной хирургической операции, от пациентов с CD с развернутыми очагами повреждения в момент тонкотолстокишечной хирургической операции, и от контрольной группы пациентов. Для каждой группы пациентов положительные по SMAD7 клетки подсчитывали вручную по меньшей мере в 5 полях зрения под большим увеличением на срез для 3 независимых экспериментов. Данные представлены в качестве медианы и межквартильных диапазонов.

[0058] На **фиг.11A** и **фиг.11B** представлена корреляция между количеством положительных по SMAD7 клеток собственной пластинки, проанализированных посредством иммуногистохимии, и процентом положительных по IFN- γ клеток (**фиг.11A**) и процентом положительных по IL-17A клеток (**фиг.11B**), проанализированных посредством проточной цитометрии у пациентов с CD на разных стадиях заболевания.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

[0059] В рамках настоящего изобретения предусматриваются, среди прочего, композиции олигонуклеотида, такого как антисмысловой олигонуклеотид (например, антисмысловой олигонуклеотид против SMAD7), содержащие множество диастереомеров, и способы прогнозирования фармакологической и/или клинической эффективности, выбора, производства и применения композиций для лечения, предупреждения и управления течением заболевания или нарушения, такого как воспалительное заболевание кишечника (например, болезнь Крона и язвенный колит). Способы прогнозирования фармакологической и/или клинической эффективности, выбора, производства и применения композиций включают получение, сравнение, оценку и/или охарактеризацию спектроскопических профилей и/или проведение хемометрического анализа. Также предусматриваются способы предупреждения или лечения послеоперационного рецидива болезни Крона (CD) с использованием ингибитора SMAD7 (например, антисмысловой олигонуклеотид против SMAD7). Также в рамках настоящего изобретения предусматриваются способы прогнозирования послеоперационного рецидива CD у индивидуума и идентификации индивидуума, имеющего риск послеоперационного рецидива CD.

Определения

[0060] Как используют в рамках изобретения, "олигонуклеотиды" относятся к коротким молекулам ДНК или РНК. Олигонуклеотиды могут состоять из 2'-дезоксирибонуклеотидов (олигодезоксирибонуклеотиды), которые могут быть модифицированы в фосфатном остове или в положении 2' сахара. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотиды по изобретению одну или несколько фосфоротиоатных (PS) модификаций остова, где один или несколько из не являющихся мостиковыми атомов кислорода в фосфатном остове заменены атомом серы. В некоторых вариантах осуществления "фосфоротиоатный олигонуклеотид" или "PS-олигонуклеотид" имеет по меньшей мере одну межнуклеозидную связь, которая представляет собой O, O-связанную фосфоротиоатную связь (т.е. фосфоротиоатную связь). В некоторых вариантах осуществления в PS-олигонуклеотиде все межнуклеозидные связи представляют собой O, O-связанные фосфоротиоатные связи (т.е. фосфоротиоатная связь).

[0061] "Антисмысловой олигонуклеотид" ("ASO"), как используют в рамках изобретения, относится к короткой синтетической олигонуклеотидной последовательности, комплементарной матричной РНК (мРНК), которая кодирует белок-мишень (например, SMAD7). Без связи с конкретной теорией, антисмысловые олигонуклеотидные последовательности могут гибридизоваться с комплементарной областью в молекуле мРНК, тем самым образуя двухцепочечный гибрид, который может приводить к активации повсеместно присутствующих каталитических ферментов, таких как РНК-аза H, которые деградируют гибридные цепи ДНК/РНК, таким образом, препятствуя трансляции белка. Без связи с теорией, антисмысловой олигонуклеотид, описанный в настоящем описании, может гибридизоваться с его последовательностью-

мишенью в форме РНК или ДНК. Таким образом, даже если последовательность ДНК предоставлена в качестве мишени, соответствующая последовательность РНК (включающая урацил вместо тимина) включена в качестве ASO. "Фосфоротиоатные антисмысловые олигонуклеотиды" или "PS ASO" представляют собой антисмысловые олигонуклеотиды, которые модифицированы так, чтобы они имели фосфоротиоатный остов.

[0062] Настоящее изобретение также относится к способам лечения воспалительного заболевания кишечника (например, болезнь Крона, такая как послеоперационный рецидив болезни Крона и язвенный колит) посредством введения специфических ингибиторов SMAD7. "Специфический ингибитор", как используют в рамках изобретения, относится к средству, которое имеет структурные и/или функциональные свойства, которые позволяют ему исключительно или с высокой степенью селективности действовать на молекулярную мишень. В некоторых вариантах осуществления специфический ингибитор SMAD7 может снижать экспрессию и/или биологическую функцию SMAD7, одновременно не имея эффекта или имея ограниченный эффект на другие молекулы, например, другие белки семейства SMAD. В некоторых вариантах осуществления специфический ингибитор SMAD7 может представлять собой антисмысловой олигонуклеотид против SMAD7.

[0063] Как используют в рамках изобретения, "Матери против декапентаплегического гомолога 7" ("SMAD7", также известный как CRCS3, FLJ16482, MADH7, MADH8, гомолог 7 MAD (материнский белок против декапентаплегии, *Drosophila*), гомолог 8 MAD, SMAD, матери против гомолога 7 DPP, матери против гомолога 8 DPP) означает белок человека или любой из мРНК-транскриптов, кодируемых генов, идентифицированных в Entrez GeneID № 4092, и их аллельных вариантов.

[0064] Как используют в рамках изобретения, под "антисмысловым олигонуклеотидом против SMAD7" или "ASO против SMAD7" подразумевают олигонуклеотид, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, которая комплементарна последовательности нуклеиновой кислоты в молекуле мРНК, транскрибированной с гена SMAD7. Более конкретно, такой олигонуклеотид может быть комплементарен последовательности нуклеиновой кислоты в кодирующей области такой мРНК. В некоторых вариантах осуществления антисмысловой олигонуклеотид против SMAD7 обладает присущим ему функциональным свойством нацеливания на ген SMAD7, его РНК или белковые продукты, или другую молекулярную структуру, чья активность или экспрессия влияет на активность или экспрессию SMAD7 или его продуктов либо исключительно, либо с высокой степенью специфичности. В некоторых вариантах осуществления антисмысловой олигонуклеотид против SMAD7 может снижать экспрессию SMAD7 при введении в клетку (например, иммунную клетку, такую как РВМС, дендритная клетка или В-клетка). В некоторых вариантах осуществления антисмысловой олигонуклеотид против SMAD7 может снижать экспрессию мРНК, транскрибированной с гена. В некоторых вариантах осуществления антисмысловой

олигонуклеотид против SMAD7 может снижать экспрессию белка, кодируемого геном. В некоторых вариантах осуществления антисмысловой олигонуклеотид против SMAD7 может снижать секрецию белка, кодируемого геном, из клетки, в которую был введен антисмысловой олигонуклеотид против SMAD7. В некоторых вариантах осуществления антисмысловой олигонуклеотид против SMAD7 содержит последовательность SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5 или 6, или ее фармацевтически приемлемые соли.

[0065] Как используют в рамках изобретения, "фармакологическая эффективность" относится к способности лекарственного вещества вызывать желаемый или предполагаемый терапевтический эффект. "Фармакологически эффективное" лекарственное вещество, таким образом, способно вызывать желаемый или предполагаемый терапевтический эффект. Как используют в рамках изобретения, "клиническая эффективность" относится к способности лекарственного вещества вызывать желаемый или предполагаемый эффект при введении индивидууму. "Терапевтический эффект" относится к ответу(ам) после лечения любого типа, результаты которого определяют как полезные или благоприятные. Следует понимать, что установление эффективности лекарственного вещества часто проводят относительно других доступных лекарственных веществ, с которыми его сравнивают. В некоторых вариантах осуществления фармакологическую и/или клиническую эффективность лекарственного вещества можно оценивать по присутствию, отсутствию или степени одного или нескольких симптомов, ассоциированных с заболеванием или нарушением (например, болезнь Крона и язвенный колит), посредством анализа гистологии тканей, биохимического анализа, способов визуализации, таких как магнитно-резонансная томография, или других известных способов. Например, фармакологическую и/или клиническую эффективность антисмыслового олигонуклеотида против SMAD7 можно оценивать посредством оценки индекса активности болезни Крона (CAAI) после введения антисмыслового олигонуклеотида против SMAD7 пациенту с болезнью Крона. Также для оценки фармакологической и/или клинической эффективности можно использовать биохимические способы анализа, которые исследуют экспрессию белка или РНК. Также можно оценивать присутствие или уровень экспрессии полезных биомаркеров для оценки прогрессирования заболевания или нарушения и тем самым фармакологической и/или клинической эффективности.

[0066] Термины "пациент", "индивидуум" и "субъект" используются взаимозаменяемо, и они относятся к любому животному, которое страдает или у которого диагностировано заболевание или нарушение, такое как воспалительное заболевание кишечника, например, болезнь Крона (такая как послеоперационный рецидив болезни Крона) или язвенный колит, включая, но не ограничиваясь ими, млекопитающих, приматов и людей. В определенных вариантах осуществления пациентом может быть не являющееся человеком млекопитающее, например, такое как кошка, собака или лошадь. В предпочтительном варианте осуществления пациентом является человек. Ни один из этих терминов не требует наблюдения медицинским специалистом.

[0067] Термины "заболевание", "нарушение" и "состояние" используются в настоящем описании взаимозаменяемо.

[0068] "Лечение" включает любой эффект, например, уменьшение, снижение, модулирование, предупреждение или устранение, который приводит к улучшению состояния, заболевания, нарушения, симптома и т.д. "Проведение лечения" или "лечение" заболевания включает: (1) ингибирование заболевания, т.е. остановку развития заболевания или его клинических симптомов; (2) облегчение заболевания, т.е. обеспечение временной или постоянной регрессии заболевания или его клинических симптомов; (3) снижение или уменьшение симптомов заболевания; или (4) предупреждение заболевания, например, обеспечение того, что клинические симптомы заболевания не развиваются у индивидуума, у которого может возникнуть или который может быть предрасположен к заболеванию, но который еще не испытывает или не демонстрирует симптомов заболевания.

[0069] Как используют в рамках изобретения, "предупреждение" или "предупреждать" относится к снижению или устранению возникновения симптомов или осложнений заболевания, состояния или нарушения. Термин "предупреждение", когда его используют в отношении состояния, такого как воспаление или рецидив болезни Крона, является известным в данной области и относится к способности состава, композиции и/или устройства снижать частоту или отсрочивать возникновение признаков и/или симптомов медицинского состояния у индивидуума относительно индивидуума, которому не вводят состав, композицию и/или устройство. Поскольку способы по настоящему изобретению относятся к предупреждению нарушений, понятно, что термин "предупреждать" не требует, чтобы заболевание полностью предотвращалось.

[0070] Как используют в рамках изобретения, "снижать" или другие формы этого слова, такие как "снижающий" или "снижение", относятся к снижению встречаемости события или уменьшению характеристики (например, воспаления или повреждения). Понятно, что оно, как правило, относится к некоторой стандартной или ожидаемой величине, иными словами, оно является относительным, но что не всегда необходимо, чтобы стандартная или эталонная величина была указана.

[0071] Как используют в рамках изобретения, "облегчение симптома" или другие формы этого термина, такие как "облегчать симптом", относится к смягчению одного или нескольких симптомов заболевания или нарушения у хозяина и/или снижению, ингибирование или устранение конкретного симптома, ассоциированного с заболеванием или нарушением, до и/или после введения терапевтического средства.

[0072] Как используют в рамках изобретения, "управлять течением", "управление течением", "управляющий течением" и т.п., главным образом, относятся к контролю тяжести или проявления симптомов заболевания, или средствам лечения заболевания. Как правило, управление течением используют для достижения желаемого фармакологического, физиологического и/или клинического эффекта. Этот эффект может быть терапевтическим с точки зрения частичного или полного излечения заболевания

и/или неблагоприятного эффекта, связанного с заболеванием, или обеспечения того, что симптом или проявление заболевания у пациента не возникнет или вновь не возникнет у пациента или не возрастет до нежелательного или непереносимого уровня у пациента. Термин "управление течением", как используют в рамках изобретения, охватывает любое управление течением заболевания у млекопитающего, в частности, человека, и включает: (a) ингибирование заболевания, т.е. предупреждение повышения тяжести или масштаба заболевания; (b) смягчение заболевания, т.е. обеспечение частичного или полного облегчения заболевания; или (c) предупреждение рецидива заболевания, т.е. предупреждение возвращения заболевания в активное состояние после предшествующего успешного лечения симптомов заболевания или лечения заболевания.

[0073] Термин "болезнь Крона" ("CD"), как используют в рамках изобретения, имеет его обычное значение воспалительного заболевания кишечника, которое вызывает хроническое воспаление желудочно-кишечного тракта. Болезнь Крона может поражать любую часть желудочно-кишечного тракта, однако наиболее часто она поражает тонкую кишку и толстую кишку. Часто пациентам с болезнью Крона требуется хирургическое вмешательство.

[0074] В некоторых вариантах осуществления болезнь Крона, как используют в рамках изобретения, может представлять собой послеоперационный рецидив болезни Крона. Послеоперационный рецидив болезни Крона может манифестироваться гистологическими или эндоскопическими данными или клиническими симптомами. "Гистологический рецидив (HR)" представляет собой наличие гистологической активности в биоптатах слизистой оболочки, полученных в ходе илеоколоноскопии, которая может наблюдаться в пределах одной недели от хирургической операции. Эндоскопическая оценка является ценным инструментом для определения послеоперационного рецидива и определения медицинского управления течением. Наиболее широко используемой системой оценки степени "эндоскопического рецидива (ER)" является система оценки Рутгирта. Этот показатель оценивают путем оценки подвздошной кишки проксимально анастомозу (неотерминальная область подвздошной кишки): i0 указывает на отсутствие признаков очагов повреждения; i1, 5 или менее афтозных очагов повреждения; i2 применимо к более чем 5 афтозным очагам повреждения с нормальной слизистой оболочкой между очагами повреждения, или непораженными сегментами в случае более крупных очагов повреждения, или к очагам повреждения, ограниченным выстилкой тонкотолстокишечного анастомоза; i3 указывает на диффузный афтозный илеит с диффузно воспаленной слизистой оболочкой; и i4 представляет собой диффузное воспаление подвздошной кишки с более крупными язвами, узлами или сужением. "Радиографический рецидив" представляет собой проявление симптомов, наблюдаемых при использовании радиографических способов, таких как контрастная ультрасонография и энтероклизис с компьютерной томографией (СТ) или магнитный резонансный (MR) энтероклизис. "Клинический рецидив" определяют с использованием индекса активности болезни Крона (CDAI) - инструмента, используемого

для количественного определения симптомов у пациентов с болезнью Крона, как, например, CDAI > 150 или CDAI > 200.

[0075] Индивидуумы, нуждающиеся в лечении способами, описанными в настоящем описании, включают индивидуумов, имеющих болезнь Крона, такую послеоперационный рецидив болезни Крона. В некоторых вариантах осуществления индивидуум может иметь эндоскопический рецидив болезни Крона. Признаки эндоскопического рецидива включают, но не ограничиваются ими, очаги повреждения (например, очаги повреждения в слизистой оболочке), афты, язвы, сужение просвета в неотерминальной области подвздошной кишки, абсцессы, фистулы, боль в суставах, диарею, боль или спазмы в животе, лихорадку, кровянистый стул и анемию.

[0076] На протяжении описания и формулы изобретения настоящей заявки слово "содержать" и другие формы этого слова, такие как "содержащий" и "содержит", означает "включая, но не ограничиваясь ими", и оно не предназначено для исключения, например, других добавок, компонентов, целых чисел или стадий.

[0077] "Необязательный" или "необязательно" означает, что описанное после них событие или обстоятельство может произойти или может не произойти, и что описание включает случаи, когда событие или обстоятельство происходит, и случаи, когда оно не происходит.

[0078] Как используют в рамках изобретения, термин "приблизительно" или "примерно", когда его используют в отношении количественной величины, включает саму указанную количественную величину, если конкретно не указано иное. Как используют в рамках изобретения, термин "приблизительно" или "примерно" относится к отклонению $\pm 10\%$ от указанной количественной величины, если нет иных указаний или не очевидно из контекста.

[0079] Терминология, используемая в настоящем описании, предназначена только для описания конкретных вариантов осуществления и не предназначена для ограничения объема настоящего изобретения. Как используют на протяжении настоящего описания, форма единственного числа включает множественное число, если контекст явно не определяет иное. Таким образом, например, указание на "композицию" включает множество таких композиций, а также одну композицию, и указание на "терапевтическое средство" представляет собой указание на одно или несколько терапевтических и/или фармацевтических средств и их эквивалентов, известных специалистам в данной области, и т.д. Все проценты и соотношения, используемые в настоящем описании, если нет иных указаний, приведены по массе.

[0080] Если не определено иначе, все технические и научные термины, используемые в настоящем описании, обладают тем же значением, которое обычно подразумевает специалист в области, к которой относится настоящее изобретение. В случае противоречий, следует руководствоваться настоящим описанием. Хотя способы и материалы, сходные или эквивалентные способам и материалам, описанным в настоящем описании, можно использовать при применении на практике или тестирования

настоящего изобретения, подходящие способы и материалы описаны ниже.

Олигонуклеотиды по изобретению

[0081] В рамках настоящего изобретения предусматриваются, среди прочего, фармацевтические композиции, содержащие множество диастереомеров антисмыслового олигонуклеотида (ASO) против SMAD7, где множество диастереомеров ASO против SMAD7 имеют спектр ядерного магнитного резонанса фосфора-31 (31P-ЯМР), включающий: (a) один или несколько резонансов между 54,8 и 55,5 м.д.; и (b) показатель первого главного компонента (PC1) и показатель второго главного компонента (PC2), где (i) показатель PC1 ниже приблизительно -0,20 или выше приблизительно 0,25 и показатель PC2 ниже приблизительно 0,00; или (ii) показатель PC1 находится за пределами диапазона от -0,32 до 0,31 и/или показатель PC2 находится за пределами диапазона от 0,00 до 0,20.

[0082] В некоторых вариантах осуществления ASO против SMAD7 имеет последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 1 (5'-GTXGCCCCTTCTCCCXGCAGC-3'), в которой X представляет собой 5-метил 2'-дезокситидин. В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции содержат множество диастереомеров ASO против SMAD7, имеющих последовательность по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 1 (5'-GTXGCCCCTTCTCCCXGCAGC-3'), в которой X представляет собой 5-метил 2'-дезокситидин. В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции содержат множество диастереомеров ASO против SMAD7, имеющих последовательность согласно SEQ ID NO: 1 (5'-GTXGCCCCTTCTCCCXGCAGC-3'), в которой X представляет собой 5-метил 2'-дезокситидин.

[0083] В некоторых вариантах осуществления ASO против SMAD7 имеет последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 2 (5'-GTXGCCCCTTCTCTCXGCAGC-3'), в которой X представляет собой 5-метил 2'-дезокситидин. В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции содержат множество диастереомеров ASO против SMAD7, имеющих последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции содержат множество диастереомеров ASO против SMAD7, имеющих последовательность согласно SEQ ID NO: 2.

[0084] В некоторых вариантах осуществления ASO против SMAD7 имеет последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 3 (5'-GTXYCCCCTTCTCCCXYCAG-3'), в которой X представляет собой нуклеотид, включающий азотистое основание цитозин, 5-метилцитозин или 2'-О-метилцитозин, и Y представляет собой нуклеотид, включающий азотистое основание гуанин, 5-метилгуанин или 2'-О-метилгуанин, при условии, что по меньшей мере один из X и Y включает метилированное азотистое основание. В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции содержат множество диастереомеров ASO против SMAD7, имеющих последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 3. В

некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции содержат множество диастереомеров ASO против SMAD7, имеющих последовательность согласно SEQ ID NO: 3.

[0085] В некоторых вариантах осуществления ASO против SMAD7 имеет последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 4 (5'-GTXGCCCCCTTCTCCCCXGCAG-3'), в которой X представляет собой 5-метил 2'-дезокситидин. В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции содержат множество диастереомеров ASO против SMAD7, имеющих последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 4. В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции содержат множество диастереомеров ASO против SMAD7, имеющих последовательность согласно SEQ ID NO: 4.

[0086] В некоторых вариантах осуществления ASO против SMAD7 имеет последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 5 (5'-GTC*GCCCCCTTCTCCCC*YCAGC-3'), в которой C* представляет собой 5-метил-2'-дезокситидин и Y представляет собой нуклеотид, включающий азотистое основание гуанин, 5-метилгуанин или 2'-О-метилгуанин. В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции содержат множество диастереомеров ASO против SMAD7, имеющих последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции содержат множество диастереомеров ASO против SMAD7, имеющих последовательность согласно SEQ ID NO: 5.

[0087] В некоторых вариантах осуществления ASO против SMAD7 имеет последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 6 (5'-GTC*GCCCCCTTCTCTCC*YCAGC-3'), в которой C* представляет собой 5-метил-2'-дезокситидин и Y представляет собой нуклеотид, включающий азотистое основание гуанин, 5-метилгуанин или 2'-О-метилгуанин. В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции содержат множество диастереомеров ASO против SMAD7, имеющих последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции содержат множество диастереомеров ASO против SMAD7, имеющих последовательность согласно SEQ ID NO: 6.

[0088] В некоторых вариантах осуществления ASO является химически модифицированным. В некоторых вариантах осуществления ASO представляет собой фосфоротиоатный (PS) олигонуклеотид, где один из не мостиковых атомов кислорода в фосфатном остове заменен атомом серы. В некоторых вариантах осуществления ASO имеет по меньшей мере одну межнуклеозидную связь, которая представляет собой O, O-связанную фосфоротиоатную связь (т.е. фосфоротиоатную связь). В некоторых вариантах осуществления в ASO все межнуклеозидные связи представляют собой O, O-связанные фосфоротиоатные связи (т.е. фосфоротиоатную связь).

[0089] В некоторых вариантах осуществления предусматриваемые композиции,

описанные в настоящем описании, могут включать фармацевтически приемлемую соль, например, натриевую соль антисмыслового олигонуклеотида SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6, которая необязательно может включать от 1 до 20 O, O-связанных фосфоротиоатных межнуклеозидных связей (т.е. фосфоротиоатных связей). В некоторых вариантах осуществления предусматриваемый антисмысловый олигонуклеотид представляет собой антисмысловый олигонуклеотид, содержащий форму свободной кислоты, солевую форму или анионную форму без противоиона SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6, где каждая из 20 межнуклеозидных связей представляет собой O, O-связанную фосфоротиоатную связь. В некоторых вариантах осуществления фосфоротиоатный остов SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6 может быть полностью или частично протонирован с образованием кислотной формы SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6. Предусматриваемые соли олигонуклеотидов включают соли, которые являются полностью нейтрализованными, например, каждая фосфоротиоатная связь ассоциирована с ионом, таким как Na⁺. В некоторых вариантах осуществления соль антисмыслового олигонуклеотида SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6 является только частично нейтрализованной, например, менее чем все фосфоротиоатные связи ассоциированы с ионом (например, менее 99%, менее 95%, менее 90%, менее 85%, менее 80%, менее 75%, менее 70%, менее 65%, менее 60%, менее 55%, менее 50%, менее 45%, менее 40%, менее 35%, менее 30%, менее 25%, менее 20%, менее 15%, менее 10%, менее 5%, менее 3% или менее 1% нейтрализованы). Олигонуклеотиды могут включать встречающиеся в природе нуклеотидные основания, сахара и ковалентные межнуклеозидные связи (остова), а также не встречающиеся в природе части. В различных вариантах осуществления антисмысловые олигонуклеотиды по настоящему изобретению, например, антисмысловый олигонуклеотид SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6, включают или могут включать нуклеотиды, включающие дезоксицитидин и/или 5-метил 2'-дезоксицитидин, включая, но не ограничиваясь ими, 5-метил-2'-дезоксицитидин 5'-монофосфат и 5-метил-2'-дезоксицитидин 5'-монофосфоротиоат.

[0090] В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции, содержащие множество диастереомеров SEQ ID NO: 1, содержат более 50 миллимоль, более 100 миллимоль, более 200 миллимоль, более 300 миллимоль, более 400 миллимоль, более 500 миллимоль, более 600 миллимоль, более 700 миллимоль, более 800 миллимоль, более 900 миллимоль, более 1 моль, более 1,5 моль, более 2 моль, более 2,5 моль, более 3 моль, более 4 моль или более 5 моль множества диастереомеров SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции, содержащие множество диастереомеров SEQ ID NO: 1, содержат более 2 моль множества диастереомеров SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая

миллимоль, приблизительно 700 миллимоль, приблизительно 650 миллимоль, приблизительно 600 миллимоль, приблизительно 550 миллимоль, приблизительно 500 миллимоль, приблизительно 450 миллимоль, приблизительно 400 миллимоль, приблизительно 350 миллимоль, приблизительно 300 миллимоль, приблизительно 250 миллимоль, приблизительно 200 миллимоль, приблизительно 150 миллимоль или приблизительно 100 миллимоль множества диастереомеров SEQ ID NO: 1.

[0091] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид, нацеленный на SMAD7 по изобретению (например, SEQ ID NO: 1), или фармацевтическая композиция, описанная в настоящем описании (например, композиция, содержащая множество диастереомеров SEQ ID NO: 1), снижает экспрессию SMAD7. В некоторых вариантах осуществления экспрессия SMAD7 представляет собой экспрессию белка и/или мРНК SMAD7. В некоторых вариантах осуществления экспрессия белка SMAD7 снижается в клетке на более чем приблизительно 10%, более чем приблизительно 15%, более чем приблизительно 20%, более чем приблизительно 25%, более чем приблизительно 30%, более чем приблизительно 35%, более чем приблизительно 40%, более чем приблизительно 45%, более чем приблизительно 50%, более чем приблизительно 55%, более чем приблизительно 60% или более чем приблизительно 65% по сравнению с необработанной клеткой. В некоторых вариантах осуществления экспрессия белка SMAD7 снижается в клетке на более чем приблизительно 40% по сравнению с необработанной клеткой. В некоторых вариантах осуществления снижение экспрессии белка SMAD7 может быть определено, как описано в примере 2.

Профиль диастереомеров

[0092] В некоторых вариантах осуществления множество диастереомеров имеет характерный профиль диастереомеров. В некоторых вариантах осуществления множество диастереомеров имеет спектроскопический профиль, указывающий на фармакологическую и/или клиническую эффективность. Спектроскопический профиль, указывающий на фармакологическую и/или клиническую эффективность, представляет собой по меньшей мере один из спектра ^{31}P -ЯМР, спектра ^1H -ЯМР, спектра ^{13}C -ЯМР и спектра VTCD.

[0093] В некоторых вариантах осуществления спектроскопический профиль, указывающий на фармакологическую и/или клиническую эффективность, представляет собой спектр ^{31}P -ЯМР. В некоторых вариантах осуществления ^{31}P -ЯМР проводят при приблизительно 14,1 Т. В некоторых вариантах осуществления ^{31}P -ЯМР проводят в растворе.

[0094] В некоторых вариантах осуществления спектр ^{31}P -ЯМР имеет один или несколько резонансов между 54,8 и 55,8 м.д. В некоторых вариантах осуществления спектр ^{31}P -ЯМР имеет один или несколько резонансов между 54,8 и 55,5 м.д. В некоторых вариантах осуществления спектр ^{31}P -ЯМР имеет два или более резонансов между 54,8 и 55,5 м.д. В некоторых вариантах осуществления спектр ^{31}P -ЯМР имеет два или более резонансов между 54,8 и 55,5 м.д. с разной интенсивностью. В некоторых

вариантах осуществления спектр 31P-ЯМР имеет один или несколько резонансов между 55,0 и 55,4 м.д. В некоторых вариантах осуществления спектр 31P-ЯМР независимо имеет один или несколько резонансов при 54,8 м.д., 54,9 м.д., 55,0 м.д., 55,1 м.д., 55,2 м.д., 55,3 м.д., 55,4 м.д. и/или 55,5 м.д. В некоторых вариантах осуществления спектр 31P-ЯМР имеет один или несколько резонансов на уровне приблизительно 54,8 м.д. В некоторых вариантах осуществления спектр 31P-ЯМР имеет один или несколько резонансов на уровне приблизительно 54,9 м.д. В некоторых вариантах осуществления спектр 31P-ЯМР имеет один или несколько резонансов на уровне приблизительно 55,0 м.д. В некоторых вариантах осуществления спектр 31P-ЯМР имеет один или несколько резонансов на уровне приблизительно 55,1 м.д. В некоторых вариантах осуществления спектр 31P-ЯМР имеет один или несколько резонансов на уровне приблизительно 55,2 м.д. В некоторых вариантах осуществления спектр 31P-ЯМР имеет один или несколько резонансов на уровне приблизительно 55,3 м.д. В некоторых вариантах осуществления спектр 31P-ЯМР имеет один или несколько резонансов на уровне приблизительно 55,4 м.д. В некоторых вариантах осуществления спектр 31P-ЯМР имеет один или несколько резонансов на уровне приблизительно 55,5 м.д. В некоторых вариантах осуществления спектр 31P-ЯМР независимо имеет два или более резонансов при 54,8 м.д., 54,9 м.д., 55,0 м.д., 55,1 м.д., 55,2 м.д., 55,3 м.д., 55,4 м.д. и/или 55,5 м.д. В некоторых вариантах осуществления спектр 31P-ЯМР имеет два или более резонансов на уровне приблизительно 54,8 м.д. В некоторых вариантах осуществления спектр 31P-ЯМР имеет два или более резонансов на уровне приблизительно 54,9 м.д. В некоторых вариантах осуществления спектр 31P-ЯМР имеет два или более резонансов на уровне приблизительно 55,0 м.д. В некоторых вариантах осуществления спектр 31P-ЯМР имеет два или более резонансов на уровне приблизительно 55,1 м.д. В некоторых вариантах осуществления спектр 31P-ЯМР имеет два или более резонансов на уровне приблизительно 55,2 м.д. В некоторых вариантах осуществления спектр 31P-ЯМР имеет два или более резонансов на уровне приблизительно 55,3 м.д. В некоторых вариантах осуществления спектр 31P-ЯМР имеет два или более резонансов на уровне приблизительно 55,4 м.д. В некоторых вариантах осуществления спектр 31P-ЯМР имеет два или более резонансов на уровне приблизительно 55,5 м.д.

[0095] В некоторых вариантах осуществления спектр 31P-ЯМР, когда для него проводят анализ главных компонент (РСА), включает показатель первого главного компонента (PC1), который ниже приблизительно -0,20 или выше приблизительно 0,25, и показатель второго главного компонента (PC2), который ниже приблизительно 0,00. В некоторых вариантах осуществления спектр 31P-ЯМР, когда для него проводят РСА, включает показатель PC1, который находится за пределами диапазона от -0,32 до 0,31, и/или показатель PC2, который находится за пределами диапазона от 0,00 до 0,20. В некоторых вариантах осуществления спектр 31P-ЯМР, когда для него проводят РСА, включает показатель PC1, который ниже приблизительно -0,20, и показатель PC2, который ниже приблизительно 0,00. В некоторых вариантах осуществления спектр 31P-

ЯМР, когда для него проводят РСА, включает показатель РС1, который выше приблизительно 0,25, и показатель РС2, который ниже приблизительно 0,00. В некоторых вариантах осуществления спектр ^{31}P -ЯМР, когда для него проводят РСА, включает показатель РС1, который составляет от приблизительно -0,47 до приблизительно -0,20, и показатель РС2, который составляет от приблизительно -0,27 до приблизительно 0,00. В некоторых вариантах осуществления спектр ^{31}P -ЯМР, когда для него проводят РСА, включает показатель РС1, который составляет от приблизительно 0,65 до приблизительно 0,9, и показатель РС2, который составляет от приблизительно -0,47 до приблизительно 0,00. В некоторых вариантах осуществления спектр ^{31}P -ЯМР, когда для него проводят РСА, включает показатель РС1, который находится за пределами диапазона от -0,32 до 0,30, когда показатель РС2 выше 0,00 и ниже 0,20. В некоторых вариантах осуществления спектр ^{31}P -ЯМР, когда для него проводят РСА, включает показатель РС2, который находится за пределами диапазона от 0,00 до 0,20, когда показатель РС1 выше -0,32 и ниже 0,30.

[0096] В некоторых вариантах осуществления РСА включает выбор главных компонентов с использованием моделирующего набора данных. В некоторых вариантах осуществления моделирующий набор данных включает пять, шесть, семь, восемь, девять, десять или вплоть до двадцати семи спектров ^{31}P -ЯМР, выбранных, например, из спектров ^{31}P -ЯМР, представленных на фиг.5С-5СС. В некоторых вариантах осуществления моделирующие данные включают десять спектров ^{31}P -ЯМР, например, десять спектров ^{31}P -ЯМР, представленных на фиг.5С, 5L, 5X, 5H, 5P, 5I, 5M, 5T, 5S и 5ВВ.

[0097] В некоторых вариантах осуществления главные компоненты выбирают так, чтобы они составляли более 65%, более 70%, более 75%, более 80%, более 85%, более 90%, более 95% или более 99% дисперсии моделирующего набора данных. В некоторых вариантах осуществления главные компоненты выбирают так, чтобы они составляли более 90% дисперсии моделирующего набора данных. В некоторых вариантах осуществления РСА можно проводить, как описано в примере 7.

[0098] В некоторых вариантах осуществления спектроскопический профиль, указывающий на фармакологическую и/или клиническую эффективность, представляет собой спектр ^1H -ЯМР. В некоторых вариантах осуществления спектроскопический профиль, указывающий на фармакологическую и/или клиническую эффективность, представляет собой спектр ^{13}C -ЯМР.

[0099] В некоторых вариантах осуществления спектроскопический профиль, указывающий на фармакологическую и/или клиническую эффективность, представляет собой по меньшей мере спектр VTCD. В некоторых вариантах осуществления спектр VTCD имеет по меньшей мере одну точку перегиба между 40°C и 55°C. В некоторых вариантах осуществления спектр VTCD имеет по меньшей мере одну точку перегиба между 42°C и 48°C. В некоторых вариантах осуществления спектр VTCD имеет по меньшей мере одну точку перегиба между 44°C и 46°C. В некоторых вариантах осуществления спектр VTCD имеет точку перегиба при приблизительно 45°C.

Способы лечения воспалительного заболевания кишечника по изобретению

[0100] В определенных вариантах осуществления предусматриваются фармацевтические композиции для применения для лечения воспалительного заболевания кишечника, содержащие множество диастереомеров антисмыслового олигонуклеотида против SMAD7 (например, антисмысловой олигонуклеотид SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5 или 6, или его фармацевтически приемлемая соль), где множество диастереомеров имеют спектр ³¹P-ЯМР, включающий: а) один или несколько резонансов между 54,8 и 55,5 м.д.; и б) (i) показатель первого главного компонента (PC1) ниже приблизительно -0,20 или выше приблизительно 0,25 и показатель второго главного компонента (PC2) ниже приблизительно 0,00; или (ii) показатель PC1 за пределами диапазона от -0,32 до 0,31 и/или показатель PC2 за пределами диапазона от 0,00 до 0,20. В некоторых вариантах осуществления антисмысловой олигонуклеотид против SMAD7 содержит последовательность, выбранную из любой из SEQ ID NO: 1-6 или их фармацевтически приемлемых солей. В некоторых вариантах осуществления антисмысловой олигонуклеотид против SMAD7 имеет последовательность согласно SEQ ID NO: 1 (5'-GTXGCCCTTCTCCCXGCAGC-3'), в которой все межнуклеозидные связи представляют собой O, O-связанные фосфоротиоатные связи и X представляет собой 5-метил 2'-дезоксцитидин.

[0101] Множество диастереомеров антисмыслового олигонуклеотида против SMAD7 согласно предусматриваемому способу имеет профиль спектроскопии, указывающий на фармакологическую и/или клиническую эффективность. В некоторых вариантах осуществления профиль спектроскопии, указывающий на фармакологическую и/или клиническую эффективность, представляет собой спектр ³¹P-ЯМР, включающий: а) один или несколько резонансов между 54,8 и 55,5 м.д.; и б) показатель первого главного компонента (PC1) и показатель второго главного компонента (PC2) при определении посредством анализа главных компонентов (PCA), где (i) показатель PC1 ниже приблизительно -0,20 или выше приблизительно 0,25 и показатель PC2 ниже приблизительно 0,00, или (ii) показатель PC1 находится за пределами диапазона от -0,32 до 0,31 и/или показатель PC2 находится за пределами диапазона от 0,00 до 0,20. В некоторых вариантах осуществления спектр ³¹P-ЯМР включает: а) показатель PC1 ниже приблизительно -0,20 и показатель PC2 ниже приблизительно 0,00; б) показатель PC1 выше приблизительно 0,25 и показатель PC2 ниже приблизительно 0,00; с) показатель PC1 от приблизительно -0,47 до приблизительно -0,20 и показатель PC2 от приблизительно -0,27 до приблизительно 0,00; и/или d) показатель PC1 от приблизительно 0,65 до приблизительно 0,9 и показатель PC2 от приблизительно -0,47 до приблизительно 0,00; d) показатель PC1 за пределами диапазона от -0,32 до 0,30, когда показатель PC2 выше 0,00 и ниже 0,20; и/или f) показатель PC2 за пределами диапазона от 0,00 до 0,20, когда показатель PC1 выше -0,32 и ниже 0,30.

[0102] В некоторых вариантах осуществления профиль спектроскопии, указывающий на фармакологическую и/или клиническую эффективность, представляет

за пределами диапазона от -0,32 до 0,31 и/или показатель PC2 за пределами диапазона от 0,00 до 0,20. В некоторых вариантах осуществления спектр ^{31}P -ЯМР, когда для него проводят PCA, включает показатель PC1 ниже приблизительно -0,20 и показатель PC2 ниже приблизительно 0,00. В некоторых вариантах осуществления спектр ^{31}P -ЯМР, когда для него проводят PCA, включает показатель PC1 выше приблизительно 0,25 и показатель PC2 ниже приблизительно 0,00. В некоторых вариантах осуществления спектр ^{31}P -ЯМР, когда для него проводят PCA, включает показатель PC1 от приблизительно -0,47 до приблизительно -0,20 и показатель PC2 от приблизительно -0,27 до приблизительно 0,00. В некоторых вариантах осуществления спектр ^{31}P -ЯМР, когда для него проводят PCA, включает показатель PC1 от приблизительно 0,65 до приблизительно 0,9 и показатель PC2 от приблизительно -0,47 до приблизительно 0,00. В некоторых вариантах осуществления спектр ^{31}P -ЯМР, когда для него проводят PCA, включает показатель PC1 за пределами диапазона от -0,32 до 0,30, когда показатель PC2 выше 0,00 и ниже 0,20. В некоторых вариантах осуществления спектр ^{31}P -ЯМР, когда для него проводят PCA, включает показатель PC2 за пределами диапазона от 0,00 до 0,20, когда показатель PC1 выше -0,32 и ниже 0,30. В некоторых вариантах осуществления PCA можно проводить, как описано в примере 7. В некоторых вариантах осуществления PCA включает выбор главных компонентов с использованием моделирующего набора данных. В некоторых вариантах осуществления моделирующий набор данных включает пять, шесть, семь, восемь, девять, десять или вплоть до двадцати семи спектров ^{31}P -ЯМР, например, выбранных из спектров ^{31}P -ЯМР, представленных на фиг.5C-5CC. В некоторых вариантах осуществления моделирующие данные включают десять спектров ^{31}P -ЯМР, например, десять спектров ^{31}P -ЯМР, представленных на фиг.5C, 5L, 5X, 5H, 5P, 5I, 5M, 5T, 5S и 5BV. В некоторых вариантах осуществления главные компоненты выбирают так, чтобы они составляли более 65%, более 70%, более 75%, более 80%, более 85%, более 90%, более 95% или более 99% дисперсии моделирующего набора данных. В некоторых вариантах осуществления главные компоненты выбирают так, чтобы они составляли более 90% дисперсии моделирующего набора данных. В некоторых вариантах осуществления спектр VTCD имеет по меньшей мере одну точку перегиба между 40°C и 55°C. В некоторых вариантах осуществления спектр VTCD имеет по меньшей мере одну точку перегиба между 42°C и 48°C. В некоторых вариантах осуществления спектр VTCD имеет по меньшей мере одну точку перегиба между 44°C и 46°C. В некоторых вариантах осуществления спектр VTCD имеет точку перегиба при приблизительно 45°C.

Воспалительное заболевание кишечника

[0103] В определенных вариантах осуществления описаны способы лечения, предупреждения и/или смягчения воспалительного заболевания кишечника или его симптомов у индивидуума, нуждающегося в этом, причем способ включает введение индивидууму фармацевтической композиции, содержащей множество диастереомеров антисмысловых олигонуклеотидов против SMAD7 (например, антисмысловой олигонуклеотид согласно SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5 или 6, или его фармацевтически

приемлемую соль), где множество диастереомеров имеют спектр ^{31}P -ЯМР, включающий: а) один или несколько резонансов между 54,8 и 55,5 м.д.; и б) (i) показатель PC1 ниже приблизительно -0,20 или выше приблизительно 0,25 и показатель PC2 ниже приблизительно 0,00; или (ii) показатель PC1 за пределами диапазона от -0,32 до 0,31 и/или показатель PC2 за пределами диапазона от 0,00 до 0,20. В некоторых вариантах осуществления в рамках настоящего изобретения предусматриваются способы лечения воспалительного заболевания кишечника, включающие введение фармацевтической композиции, содержащей множество диастереомеров антисмысловых олигонуклеотидов против SMAD7, где множество диастереомеров имеют спектр ^{31}P -ЯМР, включающий: а) один или несколько резонансов между 54,8 и 55,5 м.д.; и б) (i) показатель PC1 ниже приблизительно -0,20 или выше приблизительно 0,25 и показатель PC2 ниже приблизительно 0,00; или (ii) показатель PC1 за пределами диапазона от -0,32 до 0,31 и/или показатель PC2 за пределами диапазона от 0,00 до 0,20.

[0104] В некоторых вариантах осуществления воспалительное заболевание кишечника может представлять собой болезнь Крона или язвенный колит. В некоторых вариантах осуществления воспалительное заболевание кишечника представляет собой болезнь Крона или язвенный колит. В некоторых вариантах осуществления воспалительное заболевание кишечника представляет собой болезнь Крона. В некоторых вариантах осуществления воспалительное заболевание кишечника представляет собой язвенный колит. В некоторых вариантах осуществления предусматриваемый способ снижает или облегчает один или несколько симптомов, ассоциированных с воспалительным заболеванием кишечника, включая, но не ограничиваясь ими: боль в животе, диарею, ректальное кровотечение, тяжелые внутренние колики/мышечные спазмы в области таза, снижение массы тела, анемию. В некоторых вариантах осуществления предусматриваемый способ снижает показатель индекса активности болезни Крона (CDAI) у индивидуума.

Послеоперационный рецидив болезни Крона (CD)

[0105] В определенных вариантах осуществления в рамках настоящего изобретения описаны способы лечения, предупреждения и/или облегчения послеоперационного CD или его симптомов у индивидуума, нуждающегося в этом, причем способ включает введение индивидууму фармацевтической композиции, содержащей множество диастереомеров антисмысловых олигонуклеотидов против SMAD7 (например, антисмыслового олигонуклеотида SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5 или 6, или его фармацевтически приемлемой соли), где множество диастереомеров имеет спектр ^{31}P -ЯМР, включающий: а) один или несколько резонансов между 54,8 и 55,5 м.д.; и б) (i) показатель PC1 ниже приблизительно -0,20 или выше приблизительно 0,25 и показатель PC2 ниже приблизительно 0,00; или (ii) показатель PC1 за пределами диапазона от -0,32 до 0,31 и/или показатель PC2 за пределами диапазона от 0,00 до 0,20.

[0106] Экспрессия SMAD7 может быть повышена у послеоперационных пациентов с CD. В некоторых вариантах осуществления послеоперационный пациент с CD может

быть в любой фазе заболевания, например, в ранней фазе послеоперационной CD или фазе рецидива послеоперационной CD. В различных вариантах осуществления ранняя фаза послеоперационной CD может представлять собой любую фазу заболевания CD до фазы рецидива послеоперационной CD. В некоторых вариантах осуществления ранняя фаза послеоперационной CD характеризуется массивной инфильтрацией иммунных клеток, секретирующих высокие уровни воспалительных цитокинов (например, цитокины T_H1). В некоторых вариантах осуществления ранняя фаза CD (например, ранняя фаза послеоперационной CD) представляет собой стадию до появления эндоскопического рецидива. Таким образом, в определенных вариантах осуществления пациенты с CD ранней фазы могут представлять собой послеоперационных пациентов с CD без эндоскопического рецидива (например, показатель Рутгирта $i0$ или $i1$). В некоторых вариантах осуществления количество экспрессирующих SMAD7 клеток в цельной слизистой оболочке кишечника, эпителии слизистой оболочки кишечника и/или собственной пластинке превышает количество клеток на более поздних стадиях заболевания (например, развернутая фаза CD). Как описано в настоящем описании, пациенты с развернутой фазой CD (например, фаза рецидива послеоперационной CD) представляют собой пациентов, имеющих хронически активное заболевание. В некоторых вариантах осуществления пациенты (например, послеоперационные пациенты с CD) с развернутой фазой CD могут быть плохо отвечающими на медицинское лечение. В некоторых вариантах осуществления для пациентов (например, послеоперационные пациенты с CD) с развернутой фазой CD может быть полезным хирургическое вмешательство. В определенных вариантах осуществления развернутая фаза CD может быть определена с использованием индекса активности болезни Крона (CAAI) (например, $CAAI \geq 150$, $CAAI \geq 200$ или $CAAI \geq 250$) или показателя Льюиса (LS) (например, $LS \geq 700$, $LS \geq 750$ или $LS \geq 790$).

[0107] Повышенная экспрессия SMAD7 у послеоперационного пациента с CD может указывать на послеоперационный рецидив CD и/или на то, что пациент имеет риск рецидива CD. В некоторых вариантах осуществления рецидив CD может представлять собой эндоскопический рецидив, гистологический рецидив, радиографический рецидив, клинический рецидив или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления рецидив CD может представлять собой эндоскопический рецидив. В некоторых вариантах осуществления эндоскопический рецидив может характеризоваться одним или несколькими признаками, выбранными из группы, состоящей из: очагов повреждения (например, очаги повреждения слизистой оболочки), афт, язв, сужения просвета неотерминальной области подвздошной кишки, абсцессов, фистул, суставной боли, диареи, боли или спазмов желудка, лихорадки, кровавого стула, анемии и их комбинаций.

[0108] Экспрессию SMAD7 можно определять способами, известными в данной области, для определения уровня экспрессии мРНК SMAD7 или белка SMAD7. Например, уровень экспрессии SMAD7 можно количественно определять посредством, например,

иммуногистохимии (ИНС), твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA), иммунопреципитации белков, иммуноэлектрофореза, вестерн-блоттинга, иммунного окрашивания белков и способов спектрометрии (например, хроматография, масс-спектрометрия). Уровень экспрессии гена SMAD7 можно количественно определять, например, посредством ПЦР в реальном времени (количественная ПЦР, кПЦР), микрочипов, секвенирования последнего поколения (PHK-Seq), нозерн-блоттинга и серийного анализа экспрессии генов (SAGE).

[0109] Для определения того, повышается ли экспрессия SMAD7, уровень экспрессии SMAD7 можно сравнивать с контрольной величиной. В некоторых вариантах осуществления контрольную величину можно определять путем измерения уровня экспрессии SMAD7 у пациентов с CD до хирургического лечения или в ходе хирургического лечения. В некоторых вариантах осуществления контрольную величину можно определять путем измерения уровня экспрессии SMAD7 у индивидуума без CD. В некоторых вариантах осуществления уровень экспрессии SMAD7 по меньшей мере приблизительно на 10%, по меньшей мере приблизительно на 20%, по меньшей мере приблизительно на 30%, по меньшей мере приблизительно на 40%, по меньшей мере приблизительно на 60% или по меньшей мере приблизительно на 80% повышен по сравнению с известным контрольным уровнем.

[0110] В некоторых вариантах осуществления повышение экспрессии SMAD7 является статистически значимым. В некоторых вариантах осуществления повышение уровня экспрессии SMAD7 в слизистой оболочке (например, слизистой оболочке подвздошной кишки) пациента с CD по сравнению с индивидуумом без CD является статистически значимым. Пациент с CD может представлять собой послеоперационного пациента с CD. В некоторых вариантах осуществления повышение уровня экспрессии SMAD7 в слизистой оболочке (например, слизистой оболочке подвздошной кишки) у послеоперационного пациента с CD по сравнению с пациентом с развернутой CD является статистически значимым. Статистическую значимость можно определять с использованием стандартного статистического критерия, например, Т-критерия Стьюдента или U-критерия Манна-Уитни.

[0111] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу предупреждения или лечения послеоперационного рецидива CD. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу предупреждения или лечения послеоперационного рецидива CD посредством ингибирования SMAD7. В некоторых вариантах осуществления ингибирование SMAD7 может включать введение индивидууму фармацевтической композиции, содержащей антисмысловой олигонуклеотид против SMAD7. В некоторых вариантах осуществления ASO против SMAD7 включает последовательность нуклеотидных оснований, выбранную из любой из SEQ ID NO: 1-6 или их фармацевтически приемлемых солей. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит множество диастереомеров SMAD7 антисмысловых олигонуклеотидов (например, антисмысловой олигонуклеотид

согласно SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5 или 6, или его фармацевтически приемлемые соли).

[0112] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию можно вводить перорально. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию можно вводить непосредственно после, приблизительно через 1 час, приблизительно через 3 часа, приблизительно через 6 часов, приблизительно через 12 часов, приблизительно через 1 сутки, приблизительно через 3 суток, приблизительно через 1 неделю, приблизительно через 2 недели, приблизительно через 1 месяц, приблизительно через 2 месяца, приблизительно через 3 месяца, приблизительно через 4 месяца, приблизительно через 5 месяцев, приблизительно через 6 месяцев, приблизительно через 7 месяцев, приблизительно через 8 месяцев, приблизительно через 9 месяцев, приблизительно через 10 месяцев, приблизительно через 11 месяцев или приблизительно через 12 месяцев после проведения хирургического лечения CD у индивидуума.

[0113] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способам прогнозирования послеоперационного рецидива CD у индивидуума, имеющего CD, включающим определение уровня SMAD7 в образце от индивидуума, где повышенный уровень SMAD7 относительно известного контрольного уровня прогнозирует рецидив CD. Также в рамках настоящего изобретения предусматриваются способы идентификации индивидуума, имеющего риск послеоперационного рецидива CD, включающие определение уровня SMAD7 в образце от индивидуума, где повышенный уровень SMAD7 относительно известного контрольного уровня идентифицирует индивидуума как имеющего риск рецидива CD. В некоторых вариантах осуществления известный контрольный уровень в предусматриваемом способе представляет собой уровень SMAD7 в образце, полученном от индивидуума до хирургического лечения или в ходе хирургического лечения. В некоторых других вариантах осуществления известный контрольный уровень представляет собой уровень SMAD7 у здорового индивидуума без CD. В некоторых вариантах осуществления предусматриваемый способ включает, если уровень SMAD7 повышен относительно известного контрольного уровня, введение индивидууму фармацевтической композиции, содержащей ASO против SMAD7. В некоторых вариантах осуществления предусматриваемый способ включает, если уровень SMAD7 не повышен относительно известного уровня, определение уровня SMAD7 во втором образце от индивидуума. В некоторых вариантах осуществления предусматриваемый способ включает мониторинг уровня SMAD7 у индивидуума в течение заданного периода времени (например, приблизительно 1 часа, приблизительно 3 часов, приблизительно 6 часов, приблизительно 12 часов, приблизительно 1 суток, приблизительно 3 суток, приблизительно 1 недели, приблизительно 2 недель, приблизительно 1 месяца, приблизительно 2 месяцев, приблизительно 3 месяцев, приблизительно 4 месяцев, приблизительно 5 месяцев, приблизительно 6 месяцев, приблизительно 7 месяцев, приблизительно 8 месяцев, приблизительно 9 месяцев, приблизительно 10 месяцев, приблизительно 11 месяцев, или

приблизительно 12 месяцев после хирургического лечения CD).

[0114] В некоторых вариантах осуществления у индивидуума в предусматриваемом способе может быть проведено по меньшей мере одно хирургическое лечение CD. В некоторых вариантах осуществления хирургическое лечение выбрано из группы, состоящей из: резекции кишки, тонкотолстокишечной резекции, колэктомии, проктоколэктомии, пластики стриктуры, илеостомии, анальной фистулотомии и их комбинации. В некоторых вариантах осуществления хирургическое лечение представляет собой тонкотолстокишечную резекцию.

[0115] В некоторых вариантах осуществления индивидуум в предусматриваемом способе может не иметь признаков послеоперационного рецидива. В некоторых вариантах осуществления индивидуум имеет по меньшей мере один признак послеоперационного рецидива. В некоторых вариантах осуществления послеоперационный рецидив выбран из группы, состоящей из: эндоскопического рецидива, гистологического рецидива, радиографического рецидива, клинического рецидива и их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления индивидуум имеет по меньшей мере один признак эндоскопического рецидива. В некоторых вариантах осуществления признак послеоперационного рецидива может быть выбран из группы, состоящей из: очагов повреждения (например, очагов повреждения слизистой оболочки), афт, язв, сужения просвета неотерминальной области подвздошной кишки, абсцессов, фистул, суставной боли, диареи, боли или спазмов желудка, лихорадки, кровянистого стула, анемии и их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления признаком послеоперационного рецидива могут быть очаги повреждения, такие как очаги повреждения слизистой оболочки.

[0116] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один образец от индивидуума в предусматриваемом способе может иметь повышенный уровень SMAD7 относительно известного контрольного уровня. В некоторых вариантах осуществления известный контрольный уровень предусматриваемого способа представляет собой уровень SMAD7 в образце, полученном от индивидуума до хирургического лечения или в ходе хирургического лечения. В некоторых других вариантах осуществления известный контрольный уровень представляет собой уровень SMAD7 у здорового индивидуума без CD. В некоторых вариантах осуществления уровень SMAD7 может представлять собой уровень мРНК SMAD7 или уровень белка SMAD7. В некоторых вариантах осуществления уровень SMAD7 по меньшей мере приблизительно на 10%, по меньшей мере приблизительно на 20%, по меньшей мере приблизительно на 30%, по меньшей мере приблизительно на 40%, по меньшей мере приблизительно на 60% или по меньшей мере приблизительно на 80% повышен по сравнению с известным контрольным уровнем. В некоторых вариантах осуществления образец от индивидуума в предусматриваемом способе может представлять собой образец ткани, такой как образец кожи или ткани слизистой оболочки. В некоторых вариантах осуществления образец может представлять собой образец ткани слизистой оболочки. В некоторых вариантах осуществления образец

ткани от индивидуума (например, образец ткани тонкой кишки, толстой кишки и/или неотерминальной области подвздошной кишки индивидуума) может использоваться в качестве источника клеток, источника РНК, источника белка или источника тонких срезов для измерения количества положительных по SMAD7 клеток в образце, например, с использованием иммуногистохимии (ИНС) или проточной цитометрии. Образец ткани может быть получен с использованием общепринятых инструментов и методик биопсии, такой как эндоскопическая биопсия, эксцизионная биопсия или инцизионная биопсия. Образец ткани может быть в любой форме, достаточной для сортировки клеток, экстракции РНК, экстракции белка или получения тонких срезов. Таким образом, образец ткани может быть свежим, сохраненным посредством подходящих криогенных способов или сохраненным посредством некриогенных способов. Иллюстративным стандартным способом обработки клинических образцов биопсии является фиксация образца ткани в формалине, а затем заливка его парафином. Образцы в этой форме обычно известны как фиксированная формалином залитая парафином (FFPE) ткань. Подходящие способы подготовки тканей для последующего анализа хорошо известны специалистам в данной области. В некоторых вариантах осуществления образец индивидуума может быть получен сразу после, приблизительно через 1 час, приблизительно через 3 часа, приблизительно через 6 часов, приблизительно через 12 часов, приблизительно через 1 сутки, приблизительно через 3 суток, приблизительно через 1 неделю, приблизительно через 2 недели, приблизительно через 1 месяц, приблизительно через 2 месяца, приблизительно через 3 месяца, приблизительно через 4 месяца, приблизительно через 5 месяцев, приблизительно через 6 месяцев, приблизительно через 7 месяцев, приблизительно через 8 месяцев, приблизительно через 9 месяцев, приблизительно через 10 месяцев, приблизительно через 11 месяцев или приблизительно через 12 месяцев после хирургического лечения CD.

Спектроскопические способы по изобретению

[0117] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к оценке спектроскопического профиля олигонуклеотидов. Спектроскопический профиль может быть получен посредством одного или нескольких различных спектроскопических способов, например, кругового дихроизма (например, круговой дихроизм с переменной температурой), флуоресцентной спектроскопии, масс-спектроскопии, спектроскопии ядерного магнитного резонанса (ЯМР) (например, ЯМР фосфора-31, ^1H -ЯМР, ^{13}C -ЯМР), рамановской спектроскопии, спектроскопии в видимой и ультрафиолетовой областях спектра и рентгеновской фотоэлектронной спектроскопии. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способам оценки профиля диастереомеров олигонуклеотида путем оценки его спектроскопического профиля. В некоторых вариантах осуществления получают спектроскопический профиль ASO, где "получение" относится к проведению спектроскопического анализа и получению данных по меньшей мере одного из ^{31}P -ЯМР, ^1H -ЯМР, ^{13}C -ЯМР и VTCD, и/или получению спектроскопических данных по меньшей мере одного из анализа ^{31}P -ЯМР, анализа ^1H -

ЯМР, анализа ^{13}C -ЯМР и анализа VTCD, который уже проведен. Кроме того, настоящее изобретение относится к способу прогнозирования фармакологической эффективности олигонуклеотида путем оценки его спектроскопического профиля. В некоторых вариантах осуществления в рамках настоящего изобретения предусматривается способ выбора фармакологически и/или клинически эффективного олигонуклеотида путем оценки спектроскопического профиля олигонуклеотида.

Спектроскопия ядерного магнитного резонанса фосфора-31 (^{31}P -ЯМР)

[0118] Спектроскопия ^{31}P -ЯМР представляет собой часто используемый способ аналитической химии, в котором используется ядерный магнитный резонанс для изучения содержащих фосфор молекул, такого как изучение структуры и динамики ДНК и фрагментов ДНК. ^{31}P -ЯМР может быть очень чувствительной, поскольку она имеет большой диапазон резонанса, обеспечивая специфическую информацию о химическом окружении разных атомов фосфора, присутствующих в молекуле. В дополнение к первичной информации (резонанс индивидуального атома ^{31}P , связанный с химическим окружением), точная структура каждого пика может предоставить информацию о локальной конформации молекулы (путем определения констант связывания одинарной связи и тройной связи).

[0119] Фосфоротиоатные (PS) олигонуклеотиды имеют один или несколько хиральных PS-центров на атоме(ах) фосфора фосфоротиоатной связи(ей). Такой PS-олигонуклеотид представляет собой смесь диастереомеров. Например, антисмысловый PS-олигонуклеотид (ASO), который является 21-мером, насчитывает 2^{20} возможных диастереомеров по атомам фосфора.

[0120] При проведении ^{31}P -ЯМР спектроскопии PS ASO (например, спектроскопии ^{31}P -ЯМР в растворе), ожидается, что каждый диастереомер, имеющий 20 атомов фосфора, будет демонстрировать вплоть до 20 более или менее разрешенных линия ^{31}P -ЯМР. Каждый атом ^{31}P будет находиться в сходном химическом окружении, и резонансная дисперсия будет умеренной. Однако вторичные эффекты в результате разной стереохимии диастереомеров могут быть исследованы путем изучения резонанса ^{31}P на спектрах высокого разрешения.

[0121] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к оценке олигонуклеотида посредством ^{31}P -ЯМР. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу оценки профиля диастереомеров олигонуклеотида с использованием спектроскопии ^{31}P -ЯМР в растворе.

[0122] В некоторых вариантах осуществления "резонанс", "сигнал", "химический сдвиг", "пик" и "компонент" используются взаимозаменяемо в отношении спектров ^{31}P -ЯМР.

Спектроскопия протонного ядерного магнитного резонанса (^1H -ЯМР)

[0123] ^1H -ЯМР представляет собой использование ядерного магнитного резонанса в ЯМР-спектроскопии в отношении ядер водорода-1 в молекулах вещества для определения структуры его молекул.

[0124] В некоторых вариантах осуществления PS-связи олигонуклеотида влияют на общую стереохимию и динамику олигонуклеотида, и, тем самым, на спектр ^1H -ЯМР олигонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу оценки профиля диастереомеров олигонуклеотида с использованием спектроскопии ^1H -ЯМР.

Спектроскопия ядерного магнитного резонанса углерода-13 (^{13}C -ЯМР)

[0125] ^{13}C -ЯМР представляет собой применение ядерной магнитно-резонансной спектроскопии в отношении углерода. ^{13}C -ЯМР осуществляет детекцию только ^{13}C -изотопа углерода, чье содержание в природе составляет только 1,1% относительно ядер водорода-1 в молекулах вещества. Резонанс ^{13}C следует тем же принципам, что и резонанс ^1H , в то время как типичный диапазон резонансов значительно превышает диапазон резонансов ^1H . ^{13}C -ЯМР позволяет идентификацию атомов углерода в органической молекуле и является важным инструментом при установлении химической структуры, например, определении пространственного расположения.

[0126] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу оценки профиля диастереомеров олигонуклеотида с использованием спектроскопии ^{13}C -ЯМР.

Круговой дихроизм с переменной температурой

[0127] Круговой дихроизм (CD), такой как CD с переменной температурой (VTCD), является пригодным способом для оценки общей структуры олигонуклеотида. Вследствие различной общей стереохимии различные смеси диастереомеров олигонуклеотида могут проявлять разные спектры кругового дихроизма в зависимости от температуры.

[0128] В некоторых вариантах осуществления в рамках настоящего изобретения предусматривается способ оценки профиля диастереомеров олигонуклеотида с использованием кругового дихроизма с переменной температурой (VTCD).

Хемометрические способы по изобретению

[0129] Хемометрия представляет собой науку об извлечении информации из химических систем с использованием математических и статистических способов или других управляемых данными средств. В хемометрических способах используются способы, часто используемые в анализе основных данных, такие как многопараметрическая статистика, прикладная математика и компьютерная наука, для решения проблем, например, химии, биохимии, медицины и биологии.

[0130] Спектроскопические способы обеспечивают профили, содержащие высокое количество информации, которая может быть с пользой использована при применении хемометрических способов. Например, применение в хемометрических способах спектров ЯМР описано в отношении классификации, диагностики и прогнозирования остеоартрита (WO 2002/085195).

[0131] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к проведению хемометрического анализа спектроскопического профиля олигонуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к

хеометрическим способам для оценки профиля диастереомеров олигонуклеотида, прогнозирования фармакологической эффективности олигонуклеотида и/или выбора фармакологически и/или клинически эффективного олигонуклеотида путем оценки спектроскопического профиля олигонуклеотида.

[0132] Ключевым аспектом хеометрии является многопараметрический анализ. Данные спектроскопических экспериментов являются в высокой степени многообразными. Было обнаружено, что структура этих данных является пригодной для применения способов, таких как анализ главных компонент (PCA) и метод частных наименьших квадратов (PLS). PCA проводят посредством любой из следующих 2 стадий: 1) вычисление ковариационной (или корреляционной) матрицы исходных данных, или 2) проведение разложения по собственным значениям для ковариационной матрицы или сингулярного разложения (SVD) для матрицы эксперимента.

[0133] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к проведению PCA для спектроскопического профиля (например, спектров ^{31}P -ЯМР), как описано в примере 7.

Многомерная калибровка

[0134] Многие спектроскопические проблемы и применения хеометрии вовлекают калибровку. Задачей является разработка моделей (например, многопараметрические регрессионные модели), которые могут использоваться для прогнозирования представляющих интерес свойств на основе измеренных свойств спектров. Примеры включают разработку многопараметрических моделей, касающихся спектральных ответов профиля диастереомеров на фармакологическую и/или клиническую эффективность. Этот способ требует калибровочного или обучающего набора данных (эталонные профили спектроскопии), который включает эталонные величины для представляющих интерес для прогнозирования спектроскопических характеристик, и измеренных признаков, которые соответствуют этим свойствам. Например, можно получать данные для ряда образцов, которые представляют собой разные смеси диастереоизомеров олигонуклеотида, включая спектры ^{31}P -ЯМР для каждого образца и соответствующую фармакологическую и/или клиническую эффективность этого образца. Затем способы многопараметрической калибровки, например, но не ограничиваясь ими, регрессию мелких наименьших квадратов и регрессию главных компонент, применяют для построения математической модели, которая связывает спектр с фармакологической эффективностью, и такую модель можно использовать для эффективного прогнозирования фармакологической и/или клинической эффективности новых образцов.

Классификация, распознавание паттернов, кластеризация

[0135] Способы многопараметрической классификации с обучением в высокой степени сходны с способами многопараметрической калибровки в том, что используется калибровочная или обучающая выборка для разработки математической модели, способной классифицировать будущие образцы. Способы, используемые в хеометрии,

являются сходными со способами, используемыми в других областях, включая, но не ограничиваясь ими, многопараметрический дискриминантный анализ, логистическую регрессию, нейронные сети и регрессионные/классификационные деревья. Использование способов понижения ранга совместно с этими общепринятыми способами классификации является стандартным в хемометрии, например, дискриминантный анализ на главных компонентах или величинах частных наименьших квадратов.

[0136] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к применению распознавания паттернов для ЯМР-спектроскопии. Одно из преимуществ относится к присущей точности в очень сложной матрице потенциальных помех. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к использованию многопараметрического регрессионного моделирования ("MRM") в качестве способа приведения спектральных данных в соответствие с известными изменениями композиции.

Фармацевтические композиции и пути введения

[0137] Фармацевтические композиции, содержащие олигонуклеотид, такой как ASO против SMAD7, описанный в настоящем описании, могут быть предоставлены в единичной дозированной форме и могут быть получены любым подходящим способом. Фармацевтическая композиция должна быть составлена так, чтобы она была совместимой с предполагаемым путем введения. Пригодные составы могут быть получены способами, хорошо известными в области фармацевтики. Например, см. Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th ed. (Mack Publishing Company, 1990).

[0138] Предпочтительно фармацевтические составы являются стерильными. Стерилизацию можно проводить, например, посредством фильтрации через мембраны для стерильной фильтрации. Когда композиция лиофилизована, стерилизацию фильтрованием можно проводить до или после лиофилизации и восстановления.

[0139] В некоторых вариантах осуществления в рамках настоящего изобретения предусматриваются композиции, пригодные для пероральной доставки (например, капсулы, таблетки, капли, пилюли, лепешки, пастилки, порошки и гранулы) олигонуклеотида. Предусматриваемые олигонуклеотиды, такие как антисмысловые нуклеотиды SMAD7 SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, или 6, или фармацевтически приемлемые соли, можно вводить перорально.

[0140] Состав олигонуклеотида (например, олигонуклеотид SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5 или 6, или его фармацевтически приемлемая соль) может представлять собой пероральную фармацевтическую композицию. В некоторых вариантах осуществления пероральная фармацевтическая композиция включает олигонуклеотид (например, SEQ ID NO: 1 или его фармацевтически приемлемая соль). В некоторых вариантах осуществления пероральная фармацевтическая композиция включает антисмысловый олигонуклеотид против SMAD7 (например, олигонуклеотид SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5 или 6, или его фармацевтически приемлемая соль).

[0141] Фармацевтический состав олигонуклеотида (например, олигонуклеотида SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5 или 6, или его фармацевтически приемлемой соли) может

представлять собой таблетку или капсулу.

[0142] Таблетка олигонуклеотида (например, олигонуклеотида SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5 или 6, или его фармацевтически приемлемой соли) может быть составлена в качестве минитаблетки или микротаблетки. Таблетка олигонуклеотида (например, олигонуклеотид SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5 или 6, или его фармацевтически приемлемая соль) может включать минитаблетки, микротаблетки или грануляты. Капсула олигонуклеотида (например, олигонуклеотида SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5 или 6, или его фармацевтически приемлемой соли) может включать минитаблетки, микротаблетки или грануляты. Пероральная фармацевтическая композиция может быть покрыта кишечнорастворимым покрытием. В определенных вариантах осуществления пероральная фармацевтическая композиция (таблетка или капсула) олигонуклеотида (например, олигонуклеотида SEQ ID NO: 1 или его фармацевтически приемлемой соли) является покрытой кишечнорастворимым покрытием и включает покрытые кишечнорастворимым покрытием микропеллеты, микротаблетки, минитаблетки или грануляты. В определенных вариантах осуществления пероральная фармацевтическая композиция (таблетка или капсула) олигонуклеотида (например, олигонуклеотида SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5 или 6, или его фармацевтически приемлемой соли) является покрытой кишечнорастворимым покрытием и включает покрытые кишечнорастворимым покрытием микропеллеты, микротаблетки, минитаблетки или грануляты.

[0143] В определенных вариантах осуществления пероральная фармацевтическая композиция олигонуклеотида (например, олигонуклеотида SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5 или 6, или его фармацевтически приемлемой соли) не является покрытой кишечнорастворимым покрытием. В определенных вариантах осуществления пероральная фармацевтическая композиция олигонуклеотида (например, олигонуклеотида SEQ ID NO: 1 или его фармацевтически приемлемой соли) не является покрытой кишечнорастворимым покрытием. В определенных вариантах осуществления пероральная фармацевтическая композиция олигонуклеотида (например, олигонуклеотида SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5 или 6, или его фармацевтически приемлемой соли) не является покрытой кишечнорастворимым покрытием.

[0144] В некоторых вариантах осуществления композиции олигонуклеотида (т.е. терапевтические средства, включающие олигонуклеотид (например, олигонуклеотид SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5 или 6, или его фармацевтически приемлемую соль)) могут быть пригодными для пероральной доставки олигонуклеотида, как например, таблетки, которые включают кишечнорастворимое покрытие, например, желудочно-резистентное покрытие, так что композиции могут доставлять соединение, например, в желудочно-кишечный тракт пациента. Такое введение может приводить к местному эффекту, например, путем по существу местного применения антисмыслового соединения непосредственно в пораженной части желудочно-кишечного тракта индивидуума. В некоторых вариантах осуществления такое введение может по существу препятствовать нежелательному системному всасыванию антисмыслового соединения.

[0145] Например, пероральная дозированная форма (например, таблетка) для перорального введения может включать гранулы (например, пероральная дозированная форма, по меньшей мере частично образованная из гранул), которые включают описанное антисмысловое соединение (например, SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5 или 6, или его фармацевтически приемлемую соль) и фармацевтически приемлемые эксципиенты. Такая пероральная дозированная форма, например, таблетка, может быть покрыта кишечнорастворимым покрытием. Предусматриваемые пероральные дозированные формы, например, таблетки, могут включать фармацевтически приемлемые эксципиенты, такие как наполнители, связующие вещества, разрыхлители и/или смазывающие вещества, а также красители, противoadгезионные средства, средства для покрытия, подсластители, вкусовые добавки, такие как винтергрин, апельсин, ксилит, сорбит, фруктоза и мальтодекстрин, и отдушки, консерванты и/или антиоксиданты.

[0146] В некоторых вариантах осуществления предусматриваемые пероральные дозированные формы фармацевтических составов включают внутригранулярную фазу, которая включает предусматриваемый антисмысловый олигонуклеотид (например, антисмысловый олигонуклеотид SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5 или 6, или его фармацевтически приемлемую соль) и фармацевтически приемлемый наполнитель. Например, олигонуклеотид (например, олигонуклеотид SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5 или 6, или его фармацевтически приемлемую соль) и наполнитель можно смешивать вместе, необязательно с другими эксципиентами, и формировать в виде гранул. В некоторых вариантах осуществления внутригранулярная фаза может быть получена с использованием влажной грануляции, например, жидкость (например, воду) добавляют к смешанному антисмысловому соединению и наполнителю, а затем комбинацию сушат, измельчают и/или просеивают с получением гранул. Для получения внутригранулярной фазы могут использоваться другие способы, известные в данной области.

[0147] В некоторых вариантах осуществления предусматриваемые пероральные дозированные формы составов включают внегранулярную фазу, которая может включать один или несколько фармацевтически приемлемых эксципиентов и которая может быть смешана с внутригранулярной фазой с получением описанного состава.

[0148] Состав (например, пероральная дозированная форма) олигонуклеотида (например, олигонуклеотида SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5 или 6, или его фармацевтически приемлемой соли) может включать внутригранулярную фазу, которая включает наполнитель. Иллюстративные наполнители включают, но не ограничиваются ими, 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.

[0149] В некоторых вариантах осуществления состав (например, пероральная дозированная форма) олигонуклеотида (например, олигонуклеотида SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5 или 6, или его фармацевтически приемлемой соли) может включать внутригранулярную

фазу и/или внегранулярную фазу, которая включает связующее вещество, которое, как правило, выполняет функцию удержания ингредиентов фармацевтического состава вместе. Иллюстративные связующие вещества включают, но не ограничиваются ими, следующие: крахмалы, сахара, целлюлоза или модифицированная целлюлоза, такая как гидроксипропилцеллюлоза, лактоза, прежелатинизированный кукурузный крахмал, поливинилпирролидон, гидроксипропилцеллюлоза, гидроксипропилметилцеллюлоза, низкозамещенная гидроксипропилцеллюлоза, натрий карбоксиметилцеллюлоза, метилцеллюлоза, этилцеллюлоза, сахарные спирты и другие, включая их комбинации.

[0150] Предусматриваемые составы (например, пероральная дозированная форма) олигонуклеотида (например, олигонуклеотид SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5 или 6, или его фармацевтически приемлемая соль), например, которые включают внутригранулярную фазу и/или внегранулярную фазу, могут включать разрыхлитель, такой как, но не ограничиваясь ими, крахмал, целлюлоза, сшитый поливинилпирролидон, натрия крахмала гликолят, натрий карбоксиметилцеллюлоза, альгинаты, кукурузный крахмал, кроскармелоза натрия, сшитая карбоксиметилцеллюлоза, низкозамещенная гидроксипропилцеллюлоза, гуммиарабик и другие, включая их комбинации. Например, внутригранулярная фаза и/или внегранулярная фаза может включать разрыхлитель.

[0151] В определенных вариантах осуществления предусматриваемый состав олигонуклеотида (например, олигонуклеотида SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5 или 6, или его фармацевтически приемлемой соли) включает внутригранулярную фазу, включающую описанный антисмысловый олигонуклеотид и эксципиенты, выбранные из: маннита, микрокристаллической целлюлозы, гидроксипропилметилцеллюлозы и натрия крахмала гликолята или их комбинаций, и внегранулярную фазу, включающую одно или несколько из: микрокристаллической целлюлозы, натрия крахмала гликолята и стеарата магния, или их смесей.

[0152] В определенных вариантах осуществления предусматриваемый состав олигонуклеотида (например, олигонуклеотида SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5 или 6, или его фармацевтически приемлемой соли) может включать смазывающее вещество, например, внегранулярная фаза может содержать смазывающее вещество. Смазывающие вещества включают, но не ограничиваются ими, тальк, диоксид кремния, 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.

[0153] В определенных вариантах осуществления фармацевтические составы по настоящему изобретению включают кишечно-растворимое покрытие. Как правило, кишечно-растворимые покрытия создают барьер для перорального лекарственного средства, который определяет место в пищеварительном тракте, где лекарственное средство всасывается. Кишечно-растворимые покрытия могут включать полимер, который

распадается с разной скоростью в зависимости от pH. Кишечно-растворимые покрытия могут включать, например, целлюлозы ацетат фталат, сополимер метилакрилат-метакриловая кислота, целлюлозы ацетат сукцинат, гидроксилпропилметилцеллюлозы фталат, сополимеры метилметакрилат-метакриловая кислота, сополимеры этилакрилат-метакриловая кислота, сополимер метакриловой кислоты типа C, поливинилацетат-фталат и целлюлозы ацетат фталат.

[0154] В определенных вариантах осуществления кишечнорастворимое покрытие включает анионный, катионный или нейтральный сополимер на основе метакриловой кислоты, метакриловых/акриловых сложных эфиров или их производных. В определенных вариантах осуществления кишечнорастворимое покрытие включает сополимер этилакрилат-метакриловая кислота. Коммерчески доступные кишечнорастворимые покрытия включают Opadry® AMB, сополимеры этилакрилат-метакриловая кислота (например, Acryl-EZE®), сополимер диметиламиноэтилметакрилат-бутилметакрилат-метилметакрилат (2:1:1), или сополимер метакриловая кислота-метилметакрилат 1:1 и сополимеры метакриловая кислота-метилметакрилат 1:2 (например, Eudragit®). В некоторых вариантах осуществления кишечнорастворимое покрытие составляет от приблизительно 5% до приблизительно 10%, от приблизительно 5% до приблизительно 20%, приблизительно 8 до приблизительно 15%, приблизительно 8% до приблизительно 18%, от приблизительно 10% до приблизительно 12%, или от приблизительно 12% до приблизительно 16% предусматриваемой фармацевтической композиции (например, таблетки) по массе. В некоторых вариантах осуществления кишечнорастворимое покрытие содержит сополимер этилакрилат-метакриловая кислота, который составляет от приблизительно 8 до приблизительно 15% фармацевтической композиции (например, таблетки) по массе. В некоторых вариантах осуществления кишечнорастворимое покрытие содержит сополимер этилакрилат-метакриловая кислота, который составляет приблизительно 12% фармацевтической композиции (например, таблетки) по массе. В некоторых вариантах осуществления кишечнорастворимое покрытие содержит сополимер этилакрилат-метакриловая кислота, который составляет приблизительно 10% фармацевтической композиции (например, таблетки) по массе.

[0155] В некоторых вариантах осуществления предусматривается олигонуклеотид (например, антисмысловый олигонуклеотид SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5 или 6, или его фармацевтически приемлемая соль) в форме таблетки, которая включает от приблизительно 0,5% до приблизительно 70%, например, от приблизительно 0,5% до приблизительно 30%, от приблизительно 1% до приблизительно 20%, или от приблизительно 5% до приблизительно 30% по массе антисмыслового олигонуклеотида или его фармацевтически приемлемой соли. В некоторых вариантах осуществления такая таблетка может включать от приблизительно 0,5% до приблизительно 60% по массе маннита, например, от приблизительно 20% до приблизительно 50% по массе маннита, например, приблизительно 40% или приблизительно 28% 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. В некоторых вариантах осуществления предусматриваемая таблетка может включать внутригранулярную фазу, которая включает от приблизительно 30% до приблизительно 60%, от приблизительно 45% до приблизительно 65% по массе, или альтернативно от приблизительно 5% до приблизительно 10% по массе олигонуклеотида SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5 или 6, или его фармацевтически приемлемой соли, 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% натрия крахмала гликолята по массе. В некоторых вариантах осуществления предусматриваемая таблетка может включать от приблизительно 5% до приблизительно 10% или от приблизительно 10% до приблизительно 30% по массе олигонуклеотида SEQ ID NO: 1, от приблизительно 20% до приблизительно 50% по массе маннита, от приблизительно 10% до приблизительно 30% по массе микрокристаллической целлюлозы, от приблизительно 0,5% до приблизительно 10% по массе гидроксипропилметилцеллюлозы, и от приблизительно 0,5% до приблизительно 10% по массе натрия крахмала гликолята по массе.

[0156] Иллюстративные составы олигонуклеотидов включают дозированные формы, которые включают или по существу состоят из от приблизительно 10 мг до приблизительно 500 мг олигонуклеотида SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5 или 6, или его фармацевтически приемлемой соли, например, в рамках настоящего изобретения предусматриваются таблетки, которые включают приблизительно 10 мг, приблизительно 15 мг, приблизительно 20 мг, приблизительно 25 мг, приблизительно 30 мг, приблизительно 35 мг, приблизительно 40 мг, приблизительно 50 мг, приблизительно 60 мг, приблизительно 70 мг, приблизительно 80 мг, приблизительно 90 мг, приблизительно 100 мг, приблизительно 110 мг, приблизительно 120 мг, приблизительно 130 мг, приблизительно 140 мг, приблизительно 150 мг, приблизительно 160 мг, приблизительно 170 мг, приблизительно 180 мг, приблизительно 190 мг, приблизительно 200 мг или приблизительно 250 мг олигонуклеотида SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5 или 6, или его фармацевтически приемлемой соли. В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции, описанные в настоящем описании, составляют в форме таблеток, содержащих приблизительно 10 мг, приблизительно 15 мг, приблизительно 20 мг, приблизительно 25 мг, приблизительно 30 мг, приблизительно 35 мг, приблизительно 40 мг, приблизительно 50 мг, приблизительно 60 мг, приблизительно 70 мг, приблизительно 80 мг, приблизительно 90 мг, приблизительно 100 мг, приблизительно 110 мг, приблизительно 120 мг, приблизительно 130 мг, приблизительно 140 мг, приблизительно 150 мг, приблизительно 160 мг, приблизительно 170 мг, приблизительно 180 мг, приблизительно 190 мг, приблизительно 200 мг или приблизительно 250 мг

олигонуклеотида SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции, описанные в настоящем описании, составляют в качестве таблеток, содержащих приблизительно 40 мг олигонуклеотида SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции, описанные в настоящем описании, составляют в качестве таблеток, содержащих приблизительно 160 мг олигонуклеотида SEQ ID NO: 1. В определенных вариантах осуществления фармацевтические композиции, описанные в настоящем описании, составляют в качестве таблеток для перорального применения, включающих: от приблизительно 0,5% до приблизительно 30% по массе олигонуклеотида; от приблизительно 20% до приблизительно 50% по массе маннита; и от приблизительно 10% до приблизительно 30% по массе микрокристаллической целлюлозы.

[0157] В некоторых вариантах осуществления предусматривается фармацевтически приемлемая таблетка для перорального введения, которая включает от приблизительно 5% до приблизительно 30% по массе олигонуклеотида SEQ ID NO: 1, от 20% до приблизительно 50% по массе маннита, от приблизительно 10% до приблизительно 30% по массе микрокристаллической целлюлозы, от приблизительно 0,5% до приблизительно 10% по массе гидроксипропилметилцеллюлозы, и от приблизительно 0,5% до приблизительно 10% по массе натрия крахмала гликолята, от приблизительно 0,5% до приблизительно 10% по массе стеарата магния, от приблизительно 0,5% до приблизительно 10% по массе Opadry® AMB, и от приблизительно 5% до приблизительно 20% по массе Acryl-EZE®. В некоторых вариантах осуществления предусматривается фармацевтически приемлемая таблетка для перорального введения, которая включает приблизительно 8,5% по массе олигонуклеотида SEQ ID NO: 1, 40% по массе маннита, приблизительно 25% по массе микрокристаллической целлюлозы, приблизительно 5% по массе гидроксипропилметилцеллюлозы, приблизительно 4% по массе натрия крахмала гликолята, приблизительно 0,4% по массе стеарата магния, приблизительно 4% по массе Opadry® AMB, и от приблизительно 10% до приблизительно 15% по массе Acryl-EZE®. В некоторых вариантах осуществления предусматривается фармацевтически приемлемый таблетка для перорального введения, которая включает приблизительно 23% по массе олигонуклеотида SEQ ID NO: 1, 28% по массе маннита, приблизительно 25% по массе микрокристаллической целлюлозы, приблизительно 5% по массе гидроксипропилметилцеллюлозы, приблизительно 4% по массе натрия крахмала гликолята, приблизительно 0,4% по массе стеарата магния, приблизительно 4% по массе Opadry® AMB, и от приблизительно 7% до приблизительно 12% по массе Acryl-EZE®. В некоторых вариантах осуществления фармацевтически приемлемая таблетка для перорального введения может быть составлена согласно таблице 0-1 и таблице 0-2.

Таблица 0-1

Компонент	Количество (мг)

Таблица 0-2

Компонент	Количество (мг)

SEQ ID NO: 1	40
Маннит	195,3
Микрокристаллическая целлюлоза	118,7
Гидроксипропил-метилцеллюлоза	24
Натрия крахмала гликолят	20
Стеарат магния	2
Опадру АМВ белый	20
Acryl-EZE прозрачный	58,8
Общая масса таблетки	478,8

SEQ ID NO: 1	160
Маннит	193
Микрокристаллическая Целлюлоза	178
Гидроксипропил-метилцеллюлоза	36
Натрия крахмал гликолят	30
Стеарат магния	3
Опадру АМВ белый	30
Acryl-EZE прозрачный	69,3
Общая масса таблетки	699,3

[0158] В иллюстративном варианте осуществления изобретения предусматривается фармацевтически приемлемая таблетка для перорального введения, которая включает внутригранулярную фазу, которая может включать приблизительно 50% по массе олигонуклеотида SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5 или 6, или его фармацевтически приемлемой соли, приблизительно 11,5% по массе маннита, приблизительно 10% по массе микрокристаллической целлюлозы, приблизительно 3% по массе гидроксипропилметилцеллюлозы и приблизительно 2,5% по массе натрия крахмала гликолята; и внегранулярную фазу, которая может включать приблизительно 20% по массе микрокристаллической целлюлозы, приблизительно 2,5% по массе натрия крахмала гликолята и приблизительно 0,5% по массе стеарата магния. Таблетка также может включать кишечно-растворимое покрытие.

[0159] В другом иллюстративном варианте осуществления предусматривается фармацевтически приемлемая таблетка для перорального введения, которая включает или состоит по существу из: внутригранулярной фазы, которая может включать от приблизительно 5% до приблизительно 10%, например, приблизительно 8% по массе олигонуклеотида SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5 или 6, или его фармацевтически приемлемой соли (например, соль натрия), приблизительно 40% по массе маннита, приблизительно 8% по массе микрокристаллической целлюлозы, приблизительно 5% по массе гидроксипропилметилцеллюлозы и приблизительно 2% по массе натрия крахмала гликолята; и внегранулярной фазы, которая может включать приблизительно 17% по массе микрокристаллической целлюлозы, приблизительно 2% по массе натрия крахмала гликолята и приблизительно 0,4% по массе стеарата магния.

[0160] Предусматриваемые таблетки также могут включать кишечно-растворимое покрытие, например, описанная таблетка может включать приблизительно 13%, приблизительно 14%, приблизительно 15%, приблизительно 16% или приблизительно 17% по массе кишечно-растворимого покрытия, например, сополимеров этилакрилат-

меткриловая кислота (например, AcryLEZE[®]).

[0161] Например, олигонуклеотид может быть в форме фармацевтически приемлемой таблетки для перорального применения, включающей внутригранулярную фазу и внегранулярную фазу, в которой, например, внутригранулярная фаза включает от приблизительно 5% до приблизительно 10% по массе (например, приблизительно 8% по массе) олигонуклеотида, соответствующего SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5 или 6, 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 натрия крахмала гликолята, и, например, внегранулярная фаза включает приблизительно 17% по массе микрокристаллической целлюлозы, приблизительно 2% по массе натрия крахмала гликолята, и приблизительно 0,4% по массе стеарата магния, где таблетка может дополнительно включать кишечнорастворимое покрытие.

[0162] В некоторых вариантах осуществления предусматриваемые составы, например, таблетки, при пероральном введении пациенту могут приводить к минимальной концентрации антисмыслового олигонуклеотида в плазме у пациента. В другом варианте осуществления предусматриваемые составы при пероральном введении пациенту доставляют местно в концевую часть подвздошной кишки и/или восходящую ободочную кишку пациента, например, на пораженную или имеющую заболевание область у пациента. Составы, пригодные для перорального введения, могут быть в форме капсул, крахмальных капсул, пилюль, таблеток, пастилок (с использованием, например, вкусовой основы, такой как сахароза и гуммиарабик или трагакант), порошков, гранул или в качестве раствора или суспензии в водной или неводной жидкости, или в качестве жидкой эмульсии типа "масло в воде" или "вода в масле", или в качестве эликсира или сиропа, или в качестве пастилок (с использованием инертной основы, такой как желатин и глицерин, или сахарозы и гуммиарабика), каждый из которых содержит заданное количество рассматриваемой композиции в качестве активного ингредиента. Композиции по настоящему изобретению также могут быть введены в качестве болюса, электуария или пасты.

[0163] В определенных вариантах осуществления фармацевтическая пероральная дозированная форма (например, состав таблетки) олигонуклеотида может включать внутригранулярную фазу, где внутригранулярная фаза включает антисмысловый олигонуклеотид, такой как олигонуклеотид SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5 или 6, или его фармацевтически приемлемую соль (например, соль натрия), и фармацевтически приемлемый наполнитель, и также может включать внегранулярную фазу, которая может включать фармацевтически приемлемый эксципиент, такой как разрыхлитель. Внегранулярная фаза может включать компоненты, выбранные из микрокристаллической целлюлозы, стеарата магния и их смесей. Фармацевтическая композиция также может включать кишечнорастворимое покрытие в количестве приблизительно от 12% до 16% по массе таблетки.

[0164] В некоторых вариантах осуществления фармацевтически приемлемая таблетка для перорального применения содержит от приблизительно 0,5% до приблизительно 10% по массе антисмыслового олигонуклеотида, например, олигонуклеотида SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5 или 6, 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, включающее сополимер этилакрилат-метакриловая кислота.

[0165] В некоторых вариантах осуществления фармацевтически приемлемая таблетка для перорального применения содержит внутригранулярную фазу, включающую от приблизительно 5% до приблизительно 10% по массе антисмыслового олигонуклеотида, например, олигонуклеотида SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5 или 6, или его фармацевтически приемлемой соли, приблизительно 40% по массе маннита, приблизительно 8% по массе микрокристаллической целлюлозы, приблизительно 5% по массе гидропропилметилцеллюлозы, и приблизительно 2% по массе натрия крахмала гликолята; внегранулярную фазу, включающую приблизительно 17% по массе микрокристаллической целлюлозы, приблизительно 2% по массе натрия крахмала гликолята, приблизительно 0,4% по массе стеарата магния; и кишечнорастворимое покрытие поверх таблетки, включающее сополимер этилакрилат-метакриловая кислота.

[0166] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит кишечнорастворимое покрытие, включающее приблизительно 13%, приблизительно 15%, приблизительно 16%, приблизительно 17% или приблизительно 18% по массе, например, AcrylEZE® (см., например, публикацию PCT № WO2010/054826).

[0167] Скорость, с которой покрытие растворяется и активный ингредиент высвобождается, представляет собой скорость его растворения. В одном из вариантов осуществления предусматриваемая таблетка может иметь профиль растворения, например, при тестировании в устройстве USP/EP типа 2 (лопастное) при 100 об/мин и 37°C в фосфатном буфере с pH 7,2, с высвобождением от приблизительно 50% до приблизительно 100% олигонуклеотида через от приблизительно 120 минут до приблизительно 240 минут, например через 180 минут. В другом варианте осуществления предусматриваемая таблетка может иметь профиль растворения, например, при тестировании в устройстве USP/EP типа 2 (лопастное) при 100 об/мин и 37°C в разбавленной HCl с pH 1,0, где олигонуклеотид по существу не высвобождается после 120 минут. В другом варианте осуществления предусматриваемая таблетка может иметь профиль растворения, например, при тестировании в устройстве USP/EP типа 2 (лопастное) при 100 об/мин и 37°C в фосфатном буфере с pH 6,6, с высвобождением от приблизительно 10% до приблизительно 30%, или не более чем приблизительно 50% олигонуклеотида через 30 минут.

[0168] В некоторых вариантах осуществления описанные составы, например, таблетки, при пероральном введении пациенту приводят к минимальной концентрации

олигонуклеотида в плазме пациента. В некоторых вариантах осуществления описанные составы при пероральном введении пациенту доставляют местно в толстую кишку или прямую кишку пациента, например, на пораженную или имеющую заболевание область у пациента.

Режим дозирования

[0169] Состав олигонуклеотида (например, антисмыслового олигонуклеотида SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5 или 6) или его фармацевтически приемлемой соли, описанных в настоящем описании, может быть введен или является пригодным для введения до и/или после появления симптомов воспалительного заболевания кишечника (например, болезнь Крона и язвенный колит).

[0170] Состав по настоящему изобретению (включая, например, SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5 или 6 или их фармацевтически приемлемую соль) может быть введен или пригоден для введения приблизительно каждые 6 часов, приблизительно каждые 12 часов, приблизительно каждые 24 часа, приблизительно каждые 48 часов, приблизительно каждые 72 часа, каждые сутки, два раза в неделю, раз в 2 недели или раз в месяц.

[0171] Частота дозирования может варьироваться зависимости от таких факторов, как путь введения, дозировка и подвергаемое лечению заболевание. Иллюстративная частота дозирования представляет собой один раз в сутки, один раз в неделю и один раз в две недели. В определенных вариантах осуществления дозирование проводят один раз в сутки в течение 7 суток.

[0172] В определенных вариантах осуществления составы включают дозированные формы, которые включают или состоят по существу из от приблизительно 35 мг до приблизительно 500 мг олигонуклеотида (например, олигонуклеотид SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5 или 6, или его фармацевтически приемлемая соль). Например, в рамках настоящего изобретения предусматриваются составы, которые включают приблизительно 35 мг, приблизительно 40 мг, приблизительно 50 мг, приблизительно 60 мг, приблизительно 70 мг, приблизительно 80 мг, приблизительно 90 мг, приблизительно 100 мг, приблизительно 110 мг, приблизительно 120 мг, приблизительно 130 мг, приблизительно 140 мг, приблизительно 150 мг, приблизительно 160 мг, приблизительно 170 мг, приблизительно 180 мг, приблизительно 190 мг, приблизительно 200 мг или приблизительно 250 мг олигонуклеотида (например, олигонуклеотида SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5 или 6, или его фармацевтически приемлемой соли). В определенных вариантах осуществления состав может включать приблизительно 40 мг, приблизительно 80 мг или приблизительно 160 мг олигонуклеотида, такого как олигонуклеотид SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5 или 6. В определенных вариантах осуществления состав может включать по меньшей мере приблизительно 100 мкг олигонуклеотида, такого как олигонуклеотид SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5 или 6. Например, составы могут включать приблизительно 0,1 мг, приблизительно 0,2 мг, приблизительно 0,3 мг, приблизительно 0,4 мг, приблизительно 0,5 мг, приблизительно 1 мг, приблизительно 5 мг, приблизительно 10 мг, приблизительно 15 мг, приблизительно 20 мг или приблизительно 25 мг олигонуклеотида, такого как

олигонуклеотид SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5 или 6.

[0173] Вводимое количество зависит от переменных, таких как тип и степень заболевания или показания, подлежащего лечению, общее состояние здоровья и размер пациента, эффективность олигонуклеотида *in vivo*, фармацевтический состав и путь введения. Первоначальная дозировка может быть увеличена за пределы верхнего уровня для быстрого достижения желаемого уровня в крови или уровня в ткани. Альтернативно первоначальная дозировка может быть меньше оптимальной, и дозировка может быть постепенно увеличена в ходе лечения. Дозировка у человека может быть оптимизирована, например, в общепринятом испытании фазы I с повышением дозы, проводимом от 40 мг до 160 мг.

[0174] В некоторых вариантах осуществления пациенту, имеющему воспалительное заболевание кишечника, например, болезнь Крона или язвенный колит, вводят первоначальную дозу антисмыслового олигонуклеотида против SMAD7, например, антисмыслового олигонуклеотида против SMAD7 SEQ ID NO: 1. Как используют в рамках изобретения, "первоначальная доза" относится к дозе антисмыслового олигонуклеотида против SMAD7, вводимой пациенту, имеющему воспалительное заболевание кишечника, например, болезнь Крона или язвенный колит, в серии доз. Серия доз может включать одну или несколько доз. Например, серия доз может включать однократную дозу антисмыслового олигонуклеотида против SMAD7 или более одной дозы антисмыслового олигонуклеотида против SMAD7. Первоначальная доза может представлять собой дозу антисмыслового олигонуклеотида против SMAD7, вводимую пациенту до какой-либо последующей дозы, вводимой пациенту. Например, первоначальная доза может представлять собой, но не ограничиваться ими, первую дозу антисмыслового олигонуклеотида против SMAD7, вводимую пациенту, которому ранее не проводилось лечение. Первоначальная доза также может представлять собой первую дозу в каком-либо курсе лечения антисмысловым олигонуклеотидом против SMAD7. Например, первоначальная доза может представлять собой первую дозу первого курса лечения, второго курса лечения или любого из последующих курсов лечения.

[0175] В некоторых вариантах осуществления пациенту, имеющему воспалительное заболевание кишечника, например, болезнь Крона или язвенный колит, можно вводить последующую дозу антисмыслового олигонуклеотида против SMAD7, например, антисмыслового олигонуклеотида против SMAD7 SEQ ID NO: 1. Как используют в рамках изобретения, "последующая доза" относится к дозе антисмыслового олигонуклеотида против SMAD7, вводимой пациенту, имеющему воспалительное заболевание кишечника, например, болезнь Крона или язвенный колит, после введения предшествующей дозы, например, первоначальной дозы. Таким образом, последующую дозу можно вводить пациенту, имеющему воспалительное заболевание кишечника, например, болезнь Крона или язвенный колит, посредством серии доз, включающей две или более доз. Более того, в некоторых случаях величина последующей дозы может быть откалибрована относительно первоначальной дозы или предшествующей дозы, так чтобы

последующая доза превышала, была равной или меньшей, чем предшествующая доза. Последующая доза может представлять собой дозу, вводимую пациенту, имеющему воспалительное заболевание кишечника, например, болезнь Крона или язвенный колит, после первой дозы, например, первоначальной дозы антисмыслового олигонуклеотида против SMAD7, вводимой пациенту. Последующая доза также может представлять собой дозу, вводимую после предшествующей дозы антисмыслового олигонуклеотида против SMAD7, вводимой пациенту, имеющему воспалительное заболевание кишечника, например, болезнь Крона или язвенный колит, например, дозы, вводимой после предшествующей дозы в том же раунде лечения или другом раунде лечения, например, предшествующем раунде лечения. Последующая доза может представлять собой последующую дозу относительно любой предшествующей дозы, например, предшествующей дозы, непосредственно предшествующей последующей дозе, или предшествующей дозы, после которой следует одна или несколько доз, вводимых перед введением последующей дозы.

[0176] В некоторых вариантах осуществления пациент, имеющий воспалительное заболевание кишечника, например, болезнь Крона, имеет по меньшей мере приблизительно 5%, приблизительно 10%, приблизительно 20%, приблизительно 30%, приблизительно 40% или даже приблизительно 50% или более снижение индекса активности болезни Крона (CAI) после введения антисмыслового олигонуклеотида против SMAD7, например, антисмыслового олигонуклеотида против SMAD7 SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5 или 6 или его фармацевтически приемлемой соли, например, через 1 сутки, 2 суток, 1 неделю, 1 месяц или 6 месяцев, или более. Введение антисмыслового олигонуклеотида против SMAD7 может происходить, например, на ежедневной основе. Отсрочивание клинического проявления воспалительного заболевания кишечника, например, болезни Крона или язвенного колита, у пациента вследствие введения антисмыслового олигонуклеотида против SMAD7, может составлять по меньшей мере, например, 6 месяцев, 1 год, 18 месяцев или даже 2 года или более по сравнению с пациентом, которому не вводят антисмысловой олигонуклеотид против SMAD7.

[0177] Композиция, или состав, или способ по настоящему изобретению обеспечивает введение олигонуклеотида (например, олигонуклеотида SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5 или 6) или его фармацевтически приемлемой соли индивидууму, который является рефрактерным к первой терапии.

[0178] В некоторых вариантах осуществления индивидуума, который является рефрактерным к первому способу терапии, лечат олигонуклеотидом (например, антисмысловым олигонуклеотидом SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5 или 6) или его фармацевтически приемлемой солью одновременно или после первой терапии.

[0179] В некоторых вариантах осуществления способы, описанные в настоящем описании, могут дополнительно включать введение по меньшей мере одного другого средства, которое направлено на лечение заболеваний и нарушений, описанных в настоящем описании (например, болезнь Крона или язвенный колит). В определенных

вариантах осуществления можно совместно вводить другие средства (например, последовательно или одновременно).

[0180] Предусматриваемые средства включают иммуносупрессивные средства, включающие глюкокортикоиды, цитостатики, антитела, средства, действующие на иммунофилины, интерфероны, опиоиды, TNF-связывающие белки, микофенолат и низкомолекулярные биологические агенты. Например, предусматриваемые иммуносупрессивные средства включают, но не ограничиваются ими: такролимус, циклоспорин, пимекролимус, сиролимус, эверолимус, микофеноловую кислоту, финголимод, дексаметазон, флударабин, циклофосфамид, метотрексат, азатиоприн, лефлуномид, терифлуномид, анакинру, антитимоцитарный глобулин, антилимфоцитарный глобулин, муромонаб-CD3, афутузумаб, ритуксимаб, теплизумаб, эфализумаб, даклизумаб, базиликсимаб, адалимумаб, инфликсимаб и этанерцепт.

[0181] В некоторых вариантах осуществления другие предусматриваемые средства могут включать модуляторы Toll-подобного рецептора (TLR) или модуляторы каскада TLR. В некоторых вариантах осуществления модулятор TLR может модулировать активность TLR3, TLR7, TLR8 и/или TLR9. В некоторых вариантах осуществления модулятор каскада TLR может модулировать активность одного или нескольких компонентов каскада TLR, включая, но не ограничиваясь ими, рецептор 7 хемокина с C-C-мотивом (CCR7), кластер дифференцировки (CD) 80, CD83, CD86, CD69, рецептор эпителиального фактора роста (EGFR), гликопротеин А с преобладающими повторами (GARP), интерлейкин (IL)-1-β, IL-2, IL-10Rα, IL-18, IL-23p19, макрофагальный воспалительный белок-1 альфа (MIP-1α), фосфогистон H3, MAP-киназу фосфо-p38 митоген-активируемых белков, ассоциированную с фосфо-зета-цепью протеинкиназа 70 (фосфо-ZAP70), активатор рецептора лиганда ядерного фактора каппа-В (RANKL), представитель семейства SLAM (SLAMF7), тканевой активатор плазминогена (tPA) и рецептор урокиназы (uPAR). Иллюстративные модуляторы TLR включают, но не ограничиваются ими, BL-7040 (ODN7040), CYT003, CYT003-QbG10, AZD1419, DIMS0150 (ODN150), E6446, CpG ODN2088, IMO-8400, IMO-3100, CL075, VTX-2337, ODN2006 и налтрексон. В некоторых вариантах осуществления модулятор TLR или модулятор каскада TLR может представлять собой агонист. В некоторых других вариантах осуществления модулятор TLR или модулятор каскада TLR может представлять собой антагонист.

ПРИМЕРЫ

[0182] Изобретение далее иллюстрируется следующими примерами. Примеры приведены только для иллюстративных целей, и их не следует истолковывать как ограничивающие объем или содержание изобретения каким-либо образом.

Пример 1: Получение антисмысловых олигонуклеотидов против SMAD7

[0183] 27 партий - партии A-Z и S20 - антисмыслового олигонуклеотида (ASO) против SMAD7 (SEQ ID NO: 1) было произведено в соответствии с протоколами твердофазного синтеза без контроля хиральности в разных масштабах и в разных условиях.

[0184] Каждая партия ASO против SMAD7, полученная посредством синтеза без контроля хиральности, представляет собой смесь диастереомеров с неизвестными индивидуальными уровнями, включающая вплоть до 2^{20} (т.е. 1048576) возможных разных диастереомеров.

Пример 2: Активность in vitro диастереомерных смесей антисмысловых олигонуклеотидов против SMAD7

[0185] Для оценки фармакологической активности in vitro ASO против SMAD7 с разными профилями диастереомеров исследовали способность разных партий ASO против SMAD7 (партии A-Q, S-Z и S20) подавлять экспрессию SMAD7 в клеточной линии HCT-116.

[0186] Партии ASO против SMAD7 в порошковой форме растворяли в фосфатно-солевом буфере (PBS) и определяли концентрацию с использованием обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).

[0187] Клеточную линию карциномы ободочной и прямой кишки человека HCT-116 (American Type Culture Collection, ATCC) поддерживали в среде МакКоя 5А (Lonza), дополненной 10% эмбриональной телячьей сывороткой (FBS) (Euroclone) и 1% пенициллином/стрептомицином (P/S) (Lonza), в полностью увлажненном инкубаторе при 37°C, 5% CO₂.

[0188] Суспензии единичных клеток высевали в количестве 2×10^5 клеток/мл/лунка в 6-луночные чашки для культивирования, и им позволяли прикрепляться в течение ночи. На следующие сутки клетки промывали два раза PBS (Lonza), а затем трансфицировали тестируемыми образцами - ASO против SMAD7 партий A-Q, S-Z и S20 - в количестве 0,5 или 1 мкг/мл в PBS с использованием среды для трансфекции Opti-MEM I и реагента Lipofectamin 3000 (Life Technologies) в соответствии с инструкциями изготовителя. Затем трансфицированные клетки промывали PBS и культивировали со средой МакКоя 5А, дополненной 10% FBS и антибиотиками. Клетки, трансфицированные партией А, использовали в качестве эталона (положительный контроль). Клетки, не трансфицированные, но обработанные средой для трансфекции и Lipofectamin 3000, использовали в качестве отрицательного контроля.

[0189] Через 24 часа клетки промывали PBS и тотальные белки экстрагировали с использованием следующего лизирующего буфера: 10 ммоль/л HEPES, 1 ммоль/л EDTA, 60 ммоль/л KCl, 0,2% Igepal CA-630, 1 ммоль/л фторида натрия, 10 мкг/мл апротинина, 10 мкг/мл лейпептина, 1 ммоль/л DTT и 1 ммоль/л PMSF (Sigma-Aldrich). Лизаты получали на 10% геле SDS-PAGE. Затем блоты инкубировали с противочеловеческим моноклональным антителом мыши, направленным против белка-мишени, в количестве 0,5 мкг/мл (R&D systems), а затем с противомышиным антителом кролика, конъюгированным с пероксидазой хрена (разведение 1:20000, Dako). После анализа белка-мишени SMAD7 каждый блот очищали и инкубировали с моноклональным антителом мыши β-актина человека (Sigma-Aldrich) для подтверждения равной нагрузки дорожек. Для анализа интенсивности иммунореактивных полос и, таким образом, количественного определения

соотношения уровней SMAD7/ β -актин использовали компьютеризованную сканирующую денситометрию (Image Lab Software, Bio-Rad Laboratories).

[0190] Иллюстративные результаты проиллюстрированы на **фиг.3А** и в **таблице 1**, сравнивающих изменение соотношения SMAD7/ β -актин при трансфекции клеток каждой протестированной партией с соотношением SMAD7/ β -актин клеток, обработанных только Lipofectamin 3000 (отрицательный контроль). Величины выражали в качестве среднего значения \pm S.E.M для по меньшей мере трех независимых экспериментов. Данные анализировали с использованием одностороннего дисперсионного анализа (ANOVA), а затем критерия множественных сравнений Даннетта. Значимость определяли в качестве значений P (n.s.=нет значимых отличий; **= $p \leq 0,01$; ***= $p \leq 0,001$). В определенных вариантах осуществления более чем приблизительно 40% подавление экспрессии белка SMAD7 по сравнению с клетками, обработанными только Lipofectamin 3000 (отрицательный контроль), указывает на хорошую активность *in vitro* протестированной партии ASO против SMAD7.

Таблица 1. Среднее процентное отличие экспрессии белка SMAD7 в клетках HCT-116, трансфицированных партиями ASO против SMAD7, по сравнению с клетками, обработанными Lipofectamin 3000

Партия	% экспрессия SMAD7	Партия	% экспрессия SMAD7	Партия	% экспрессия SMAD7
Партия А	-49,72	Партия J	-60,41	Партия T	15,9
Партия В	-40,93	Партия K	1,41	Партия U	-23,41
Партия С	-21,12	Партия L	10,18	Партия V	-51,44
Партия D	-33,11	Партия M	-32,28	Партия W	-3,93
Партия E	-38,75	Партия N	-44,89	Партия X	-43,33
Партия F	-36,06	Партия O	-49,81	Партия Y	-38,33
Партия G	-7,38	Партия P	-22,97	Партия Z	2,33
Партия H	-38,2	Партия Q	1,23	Партия S20	-44,51
Партия I	-33,49	Партия S	7,44		

[0191] Фармакологическая активность каждой протестированной партии, кроме того, представлена на **фиг.3В** и в **таблице 2** в качестве величин, нормализованных к соотношению SMAD7/ β -актин для партии А (положительный контроль). Для каждой протестированной партии приведен показатель эффективности:

$$\text{Показатель эффективности} = -\left[\left(\frac{\text{соотношение SMAD7}/\beta\text{-актин для тестируемой партии}}{\text{соотношение SMAD7}/\beta\text{-актин для партии А}} - 1 \right) \times 100\% \right].$$

В определенных вариантах осуществления показатель эффективности, превышающий или равный -20%, указывает на хорошую активность *in vitro*; показатель эффективности от -20% до -40% указывает на умеренную активность *in vitro*; показатель

эффективности, который ниже или равен -40%, указывает на низкую эффективность *in vitro*.

Таблица 2. Средний показатель эффективности партий ASO против SMAD7

Партия	Показатель эффективности (%)	Партия	Показатель эффективности (%)	Партия	Показатель эффективности (%)
Отрицательный контроль	-120	Партия J	11,79	Партия T	-145
Партия B	-18,3	Партия K	-107	Партия U	-56,6
Партия C	-56,9	Партия L	-159	Партия V	-14
Партия D	-57,7	Партия M	-35,7	Партия W	-92,6
Партия E	-20,1	Партия N	-28,3	Партия X	-12,3
Партия F	-29,8	Партия O	-13	Партия Y	-42,7
Партия G	-117	Партия P	-62,4	Партия Z	-139
Партия H	-24,2	Партия Q	-139	Партия S20	-11,4
Партия I	-55,3	Партия S	-117		

[0192] Эти результаты указывают на то, что 26 разных партий ASO против SMAD7 демонстрируют значимо отличающиеся способности подавлять экспрессию белка SMAD7: партии B, J, O, V, X и S20 имеют хорошую активность *in vitro*; партии E, F, H, M, N имеют умеренную активность *in vitro*; партии C, D, G, I, K, L, P, Q, S, T, U, W, Y, Z имеют низкую активность *in vitro*.

[0193] Для партий A, X, K и T, также проводили ПЦР в реальном времени (RT-PCR) для оценки их эффекта на экспрессию мРНК против SMAD7. После трансфекции клетки собирали и РНК экстрагировали с использованием набора PureLink mRNA mini kit (Thermo Fisher Scientific) в соответствии с инструкциями изготовителя. Постоянное количество РНК (1 мкг/образец) подвергали обратной транскрипции в комплементарную ДНК (кДНК), а затем 1 мкл кДНК/образец амплифицировали посредством RT-PCR с использованием iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad Laboratories) и следующих праймеров против β -актина: FWD: 5'-AAGATGACCCAGATCATGTTTGAGACC-3'; REV: 5'-

AGCCAGTCCAGACGCAGGAT-3'. Экспрессию РНК против SMAD7 оценивали с использованием анализа Taqman (Life Technologies) и вычисляли относительно гена β -актина на основе алгоритма $\Delta\Delta Ct$. Величины, полученные в ходе всех наблюдений, выражали в качестве среднего значения $\pm SEM$ для по меньшей мере трех независимых экспериментов (**фиг.3С**). Данные анализировали с использованием одностороннего дисперсионного анализа (ANOVA), а затем критерия множественных сравнений Даннетта. Значимость определяли как значения $P < 0,05$. Эти результаты указывают на то, что различные партии ASO против SMAD7 демонстрируют разную способность подавлять экспрессию мРНК против SMAD7.

Пример 3: Клиническая активность диастереомерных смесей антисмысловых олигонуклеотидов против SMAD7

[0194] Различные партии ASO против SMAD7 (партии А, Н, К, Р и Т, V, X) тестировали у пациентов с болезнью Крона и оценивали в отношении их клинической эффективности.

[0195] В клинических испытаниях ASO против SMAD7 составляли в качестве желудочно-резистентной таблетки замедленного высвобождения, предназначенной для высвобождения ASO против SMAD7 в кишечнике посредством pH-зависимого механизма. Проводили получение и оценку клинических данных от пациентов, которые принимали таблетки ASO против SMAD7 один раз в сутки в дозе 160 мг/сутки в четырех клинических испытаниях, упоминаемых далее как СТ-А, СТ-В, СТ-Е и СТ-Р. В испытаниях СТ-А, СТ-Е и СТ-Р пациентам групп 2, 3, 4, 5 или 6 проводили лечение в течение всего 12 недель подряд. В испытании СТ-В пациентам в группе 1 проводили лечение в течение 14 дней подряд.

[0196] Для анализа данных пациентов распределяли на группы следующим образом:

Группа 1: пациенты, которых лечили таблетками, произведенными из партии А;

Группа 2: пациенты, которых лечили таблетками, произведенными из партии X;

Группа 3: пациенты, которых лечили таблетками, произведенными из партии V;

Группа 4: пациенты, которых лечили таблетками, произведенными с использованием партии Р и партии Т;

Группа 5: пациенты, которых лечили таблетками, произведенными с использованием партии Н и партии К; и

Группа 6: пациенты, которых лечили таблетками, произведенными с использованием партии К и партии Р.

[0197] Изменение индекса активности болезни Крона (CDAI) оценивали для каждого пациента на исходном уровне и в конце 4 недели периода лечения. Среднее изменение показателя CDAI между 4 неделями и исходным уровнем (" $\Delta CDAI$ ") вычисляли для каждой группы пациентов, и оно представлено на **фиг.4А**. Клинический ответ (снижение CDAI ≥ 70 баллов) наблюдали у пациентов, которых лечили таблетками, произведенными из партий А, X и V, причем пациенты, которых лечили таблетками,

произведенными из партий А и Х, продемонстрировали 100-балльный клинический ответ (снижение CDAI \geq 100 баллов). Пациенты, которых лечили таблетками, произведенными с использованием партий Р/Т, Н/К и К/Р, не продемонстрировали клинически значимого улучшения. Результаты указывают на то, что разные партии ASO против SMAD7 демонстрируют разную фармакологическую эффективность.

Пример 4: Ядерная магнитно-резонансная спектроскопия смесей диастереомеров антисмысловых олигонуклеотидов против SMAD7

[0198] Результаты измерения ядерного магнитного резонанса фосфора-31 (^{31}P -ЯМР) высокого разрешения (спектр 1-D и измерение продольной релаксации) при 14,1 Т (в растворе) использовали для картирования локальной структуры на каждом атоме фосфора и для получения профилей диастереомеров партий ASO против SMAD7.

[0199] Анализировали образцы, соответствующие партиям А-Z и S20, каждый в двух экземплярах. В кратком изложении образцы растворяли в D_2O в концентрации приблизительно 9 мг/0,5 мл и сразу измеряли на спектрометре Agilent Inova 600 МГц (14,1 Тесла) при 25,0°C с получением спектров ^1H - и ^{31}P -ЯМР в соответствии со стандартными протоколами. Для эксперимента ^1H -ЯМР было получено 128 скачков (**фиг.5А**); для эксперимента ^{31}P -ЯМР было получено 2000 скачков с временем релаксации 2 с. Спектры ^1H DOSY-ЯМР оценивали для подтверждения того, что образцы не содержали низкомолекулярных примесей (например, растворители или добавки) или побочных продуктов, и, таким образом отличия, наблюдаемые на спектрах ^{31}P -ЯМР, могут быть приписаны профилям диастереомеров образцов. Спектры ^{31}P -ЯМР представлены на **фиг.5В-5FF**. Формы спектральных линий для двух дублированных проб каждого образца (т.е. партии) соответствуют друг другу, однако существуют значительные отличия форм линий между партиями. Усиленный анализ спектров ^{31}P -ЯМР высокого разрешения (**фиг.5С-5СС**) показал, что спектры разных образцов имеют значительные отличия формы линий (интенсивность, частота, фаза и ширина линии) в диапазоне 54,8-55,5 м.д. в отношении как структур сигнала, так и относительной интенсивности. В противоположность лоренцовой форме линии, характерной для единичных структур, резонанс в диапазоне 54,8-55,5 м.д. является сверткой множественности сигналов вследствие сосуществования многообразия диастереомеров. С другой стороны, область 55,5-56 м.д. спектра ^{31}P -ЯМР, по-видимому, имеет более консервативную форму линии среди партий.

[0200] Эти данные демонстрируют, что разные партии ASO против SMAD7 имеют различные профили диастереомеров и что ^{31}P -ЯМР является пригодным для фингерпринтинга стереохимии антисмысловых олигонуклеотидов, таких как ASO против SMAD7. В частности, область 54,8-55,5 м.д. является сверхчувствительной к различиям диастереомерного состава данного образца ASO против SMAD7.

Пример 5: Спектроскопия кругового дихроизма диастереомерных смесей антисмыслового олигонуклеотида против SMAD7

[0201] Круговой дихроизм, в частности, круговой дихроизм с переменной

температурой (VTCD), использовали для оценки общей стереохимии различных партий ASO против SMAD7.

[0202] Анализировали пять образцов, соответствовавших партиям А, J, H, P и T, каждый в двух экземплярах. Спектры VTCD представлены на **фиг.6**. Как партия А, так и партия H, имеет точку перегиба при приблизительно 45°C. Все из партий J, P и T имеют точку перегиба при приблизительно 50°C±5°C. Партия H имеет множество точек перегиба. Спектры VTCD партии А и партии H, хотя и отличаются друг от друга, далее указывают на более комплексный набор переходов для образцов (2 точки перегиба) по сравнению с другими образцами.

Пример 6: хемометрическое моделирование спектроскопических данных для смесей диастереомеров олигонуклеотидов

[0203] Хемометрическое моделирование используют для сопоставления спектроскопических данных диастереомерных смесей олигонуклеотидов (например, диастереомерные смеси ASO против SMAD7) с фармакологической и/или клинической эффективностью.

[0204] Спектроскопические данные, такие как спектры ¹H-ЯМР, ³¹P-ЯМР и VTCD, классифицируют посредством распознавания паттернов с использованием анализа главных компонент (PCA) для сингулярного разложения (SVD). Проводят построение вектора с использованием интенсивностей ³¹P-ЯМР в качестве функции резонанса (приблизительно 200 точек данных для каждого образца), который впоследствии нормализуют к общему интегралу с получением независимого от концентрации вектора. Затем векторы для различных препаратов олигонуклеотидов подвергают PCA для различных полос м.д., например, в области приблизительно 55 м.д., и, более конкретно, например, в областях 54,8-55,5 м.д. Сходные спектры ³¹P-ЯМР соответствуют сходным структурным модулям. Проведение PCA для векторов (например, области 54,8-55,5 м.д.) выявляет стехиометрическое сходство и разнообразие, которые могут соответствовать наличию или отсутствию фармакологической эффективности и клинической активности.

Пример 7: Анализ главных компонент для данных ядерного магнитного резонанса фосфора-31 SMAD7 для диастереомерных смесей олигонуклеотидов

[0205] Для количественного соотнесения варьирований спектров ³¹P-ЯМР разных партий ASO против SMAD7 с их профилями диастереомеров и ассоциации таких варьирований с фармакологической/клинической эффективностью спектры ³¹P-ЯМР подвергали анализу главных компонент (PCA).

[0206] В кратком изложении, спектры ³¹P-ЯМР образцов, соответствующих партиям A-Z и S20 (как описано в примере 4), подвергали аподизации (LB=4 Гц), коррекции в отношении фазы и исходного уровня с использованием программного обеспечения MestReNova и нормализации путем масштабирования интенсивности к площади (интегральной) между 53 и 57 м.д. Полученные спектральные данные экспортировали в качестве матрицы Excel. Анализ главных компонент проводили с использованием программного обеспечения Chemometrics Agile Tool (CAT)

(www.gruppochemiometria.it/index.php/software/19-download-the-r-based-chemometric-software). Спектры ^{31}P -ЯМР партий A, F, G, J, K, N, Q, R, V и Z (**фиг.7А**) вводили в качестве "обучающей выборки" для определения количества главных компонентов (РС), которые будут сохранены и использованы для построения осыпного графика, представленного на **фиг.7В**. Осыпной график демонстрирует, что первые два РС объясняют 90% дисперсии данных, в то время как первые шесть РС объясняют 99%. Таким образом, первые два компонента (PC1 и PC2) были сохранены для анализа и для построения графика PCA спектров обучающей выборки (**фиг.7С**). Затем спектры ^{31}P -ЯМР дополнительных 17 партий проецировали на график PCA, построенный со спектрами обучающей выборки (**фиг.7D**).

[0207] График PCA для спектра ^{31}P -ЯМР (**фиг.7D**) анализировали с учетом активности *in vitro* каждого образца (как описано в примере 2), и было выявлено, что спектры могут быть сгруппированы на три кластера. Кластер 1 центрируется вокруг (0, 0), показанный закрашенным овалом; кластер 2 центрируется вокруг (-0,35, -0,2), показанный точечным овалом; кластер 3 в области $\text{PC1} > 0,7$, показанный закрашенным прямоугольником. Образцы, которые попадают в кластеры 2 и 3, демонстрируют хорошую активность *in vitro*; образцы, которые попадают в кластер 1, демонстрирует плохую активность *in vitro*. Наложение спектров ^{31}P -ЯМР трех партий A, B и D, попадающих в кластер 3, кластер 2 и кластер 1, соответственно, на графике показателей PCA (**фиг.7D**), представлено на **фиг.5FF**.

[0208] Проецирование спектров ^{31}P -ЯМР на плоскость PC1/PC2 и оценка фармакологии *in vitro* (IV) и клинической эффективности (график CDAI) продемонстрировали корреляцию между фармакологией IV и показателем РС ЯМР против клинической эффективности. Как показано на **фиг.4А** и **фиг.4В**, репрезентативные партии A, H, K, P, T, V и X, чьи спектры ^{31}P -ЯМР представлены на **фиг.4В**, продемонстрировали разную клиническую эффективность (см. график CDAI на **фиг.4А**). Партия A в кластере 3 на графике PCA и партии V и X в кластере 2 графика PCA идентифицированы как клинически эффективные; партии H, K, P и T в кластере 2 на графике PCA не обладают значительной клинической эффективностью (см. пример 3).

Пример 8: Экспрессия SMAD7 у послеоперационных пациентов с болезнью Крона

Пример 8А: Выбор пациентов

[0209] Пациентов отбирали для оценки экспрессии SMAD7 в образцах пациентов с болезнью Крона (CD) на разных фазах заболевания.

[0210] В испытание было включено 17 пациентов с CD, которые ранее были подвергнуты тонкотолстокишечной резекции, в качестве образцов ранней CD. Демографические и клинические характеристики этих пациентов представлены в **таблице 3**. Проводили илеоколоноскопию с взятием биоптатов из неотерминальной области подвздошной кишки (10-20 см выше анастомоза) пациентов для оценки эндоскопического рецидива CD через 6 и/или 12 месяцев после хирургической операции (**фиг.12**). На

момент илеоколоноскопии 82% пациентов получали месаламин и 12% получали тиопурины. Эндоскопический рецидив оценивали в соответствии с показателем Рутгирта.

[0211] 11 из пациентов с ранней CD проводили илеоколоноскопию через 6 месяцев после тонкотолстокишечной резекции. 7 (63,6%) из 11 пациентов продемонстрировали эндоскопический рецидив, из которых 4 также имели клинически активное заболевание (индекс активности CD (CDAI) >150). Остальные 4 (36,4%) не имели эндоскопического очага повреждения, из которых 2 были подвергнуты вторичной эндоскопии через 12 месяцев после резекции, поскольку у них появились симптомы. Оставшиеся 6 пациентов с ранней CD были подвергнуты эндоскопии через 12 месяцев после резекции кишечника.

Таблица 3. Демографические и клинические характеристики пациентов

Характеристики пациентов	N=17
Возраст Лет, медиана (диапазон)	37 (21-64)
Пол, мужской, N (%)	14 (82%)
Привычка курить, N (%) Да Нет	1 (6%) 16 (94%)
Длительность CD Месяцы, медиана (диапазон)	180 (12-320)
Возраст при постановке диагноза, N (%) A1: ≤16 лет A2: 17-40 лет A3: более 40 лет	1 (6%) 13 (76%) 3 (18%)
Поведение CD, N (%) B1: воспалительная B2: стриктура B3: проникающая	0 11 (65%) 6 (35%)
Положение CD, N (%) L1: Подвздошная кишка L2: Ободочная кишка L3: Подвздошная и ободочная кишка	17 (100%) 0 0
Индекс Харви-Брэдшоу во время эндоскопии Медиана (диапазон) Ремиссия Активный	4 (2-9) 13 (76%) 4 (24%)

Медикаментозное лечение от CD на момент эндоскопии	1 (6%)
Отсутствие медикаментозного лечения	14 (82%)
5-аминосалициловая кислота	0
Кортикостероиды	2 (12%)
Тиопурин отдельно	0
TNF отдельно	

[0212] Для образцов развернутой CD проводили взятие образцов слизистых оболочек из подвергнутой резекции подвздошной кишки 11 пациентов с CD (8 мужского пола; срединный возраст 53 (21-69) года; срединная длительность заболевания 149 (36-312) месяцев) на момент тонкотолстокишечной резекции. Все 11 пациентов имели очаги повреждения, ограниченные терминальной областью подвздошной кишки, и им было проведено хирургическое лечение вследствие хронически активного заболевания, плохо отвечающего на медикаментозное лечение. На момент хирургической операции 9 пациентов принимали стероиды, 2 из которых одновременно получали азатиоприн, а остальных 2 пациентов ранее лечили антителом против TNF- α .

[0213] В качестве контрольной группы проводили взятие биоптатов подвздошной кишки от 5 пациентов, которые были подвергнуты илеоколоноскопии против синдрома раздраженной кишки. Не было обнаружено эндоскопических очагов повреждения у этих пациентов, и слизистая оболочка подвздошной кишки была гистологически нормальной.

[0214] Образцы тканей, полученные от описанных выше пациентов, сохраняли посредством фиксации в формалине с последующей заливкой парафином для дальнейшего применения.

Пример 8В: Оценка экспрессии SMAD7 у пациентов с болезнью Крона

[0215] Проводили иммуногистохимию для оценки экспрессии SMAD7 в слизистой оболочке подвздошной кишки у пациентов с CD в разные фазы заболевания - у пациентов с ранней CD (т.е. послеоперационных пациентов с CD с эндоскопическим рецидивом или без него) и у пациентов с развернутой CD.

[0216] Все реагенты были от Sigma-Aldrich (Milan, Италия) если не уточнено. Фиксированные формалином залитые парафином срезы, как описано в **примере 8А**, депарафинизировали и дегидратировали посредством ксилола и этанола. Демаскировку антигена проводили в цитратном буфере (pH 6,0) в течение 20 минут в условиях микроволнового излучения. Иммуногистохимическое окрашивание проводили с использованием первичного антитела кролика против SMAD7 (orb11386; Biorbyt Ltd, Cambridge, Великобритания), при комнатной температуре в течение 1 часа. Детекцию иммунореактивных клеток проводили с использованием MACH4 Universal HRP-Polymer (Biocare Medical, Concord, CA, США) в комбинации с хромогеном 3,3'-диаминобензидином (DAB) (Dako North America, Carpinteria, CA, США) и гематоксилином в качестве контрастного красителя, в соответствии с протоколами производителя. Срезы, окрашенные с использованием изотипического IgG-антитела (R&D

Systems, Minneapolis, MN, США) в качестве первичного антитела, использовали в качестве контроля. Окрашенные срезы исследовали с использованием микроскопа LEICA DMI4000 B, и SMAD7-экспрессирующие клетки подсчитывали в 5 полях зрения под большим увеличением на предметное стекло микроскопа со срезом.

[0217] Статистические отличия оценивали с использованием статистической программы GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA) для PC. Непараметрические данные анализировали с использованием U-критерия Манна-Уитни для сравнения между двумя группами или критерия Крускала-Уоллиса для множественных сравнений. Значимость корреляции определяли с использованием непараметрической корреляции Спирмана. Статистически значимым считалось значение P менее 0,05.

[0218] Иллюстративные результаты представлены на **фиг.12** и **фиг.13**. SMAD7-положительные клетки были более заметными в слизистой оболочке подвздошной кишки пациента с CD, чем в контрольной группе (**фиг.12B** и **12C**) при иммуногистохимическом окрашивании. В частности, SMAD7 накапливался в цитоплазме и ядре как эпителиальных клеток, так и мононуклеарных клеток собственной пластинки (LPMC) (**фиг.12C**). Таким образом, количества SMAD7-положительных клеток были на значимом уровне более высокими в образцах, полученных из неотерминальной области подвздошной кишки пациентов с ранней CD (т.е. послеоперационных пациентов с CD без эндоскопического рецидива (i0) или с эндоскопическим рецидивом (i4)) и у пациентов с развернутой CD по сравнению с пациентами контрольной группы (**фиг.13**). Более того, количества SMAD7-положительных клеток были более высокими в образцах от пациентов с ранней CD, чем в образцах от пациентов с поздней CD в цельной слизистой оболочке кишечника (**фиг.13A**) и в эпителиальном компартменте (**фиг.13B**).

[0219] На **фиг.14** представлен анализ слизистой оболочки подвздошной кишки послеоперационных пациентов с CD в 2 разных момента времени (т.е. через 6 и 12 месяцев после тонкотолстокишечной резекции), который демонстрирует отсутствие значимых отличий в отношении количества SMAD7-экспрессирующих клеток.

[0220] Данные указывают на то, что экспрессия SMAD7 в слизистой оболочке пациентов с CD является усиленной в ранней фазе заболевания, например, в ходе короткого периода после резекции кишечника, и сохраняется на высоком уровне в ходе заболевания и/или рецидива заболевания. Кроме того, результаты указывают на то, что повышение уровня SMAD7 может быть подходящим маркером рецидива CD и что модулирование активности SMAD7 (например, ингибирование SMAD7) может быть полезным для предупреждения и/или лечения послеоперационного рецидива CD.

Пример 8C: корреляция между экспрессией SMAD7 и экспрессией цитокинов

[0221] Для оценки корреляции между экспрессией SMAD7 и количеством секретирующих цитокины клеток использовали анализ с использованием сортировки флуоресцентно-активированных клеток (FACS).

[0222] Мононуклеарные клетки собственной пластинки (LPMC) выделяли из

биоптатов подвздошной кишки и образцов кишки после резекции от пациентов, отобранных, как описано в **примере 8А**, и суспендировали в среде RPMI 1640, дополненной 10% инактивированной эмбриональной телячьей сывороткой (FBS), пенициллином (P) (100 Е/мл) и стрептомицином (S) (100 мкг/мл) (Life Technologies-GibcoCRL, Milan, Италия).

[0223] Для проточно-цитометрического анализа LPMC высевали в 96-луночные чашки для культивирования с U-образным дном и стимулировали PMA (10 нг/мл), иономицином (1 мкг/мл) и брэфелдином А (10 мкг/мл; eBioscience, San Diego, CA). Через 5 часов клетки окрашивали антителом против CD3 с PerCP (разведение 1:50; BD Biosciences, San Jose, CA) и фиксировали 1% формальдегидом в течение 20 минут. Затем проводили пермеабиллизацию клеток с использованием 0,5% сапонины в буфере для FACS с 1% бычьим сывороточным альбумином (BSA) и окрашивание следующими антителами: антитело против IFN- α с PE (разведение 1:50; BD Biosciences), антитело против IL-17A с APC (разведение 1:50; eBioscience). Во все эксперименты были включены соответствующие совпадающие по изотипу контроли (BD Biosciences). Клетки анализировали с использованием цитометра FACSCalibur и программного обеспечения Cell-QuestPro. Статистические отличия оценивали, как описано в **примере 8В**.

[0224] Иллюстративные результаты представлены на **фиг.15**. Значимую корреляцию наблюдали между количеством экспрессирующих SMAD7 клеток и количеством секретирующих IFN- γ клеток. Не наблюдали значимой корреляции между количеством экспрессирующих SMAD7 клеток и количеством продуцирующих IL-17A клеток.

ЭКВИВАЛЕНТЫ

[0225] Изобретение может быть воплощено в других конкретных формах без отклонения от его неотъемлемых характеристик. Таким образом, вышеуказанные варианты осуществления следует считать иллюстративными, а не ограничивающими, изобретение, описанное в настоящем описании. Объем изобретения определяется прилагаемой формулой изобретения, а не вышеуказанным описанием, и подразумевается, что все изменения, которые попадают в значение и диапазон эквивалентности формулы изобретения, охватываются ей.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Фармацевтическая композиция, содержащая множество диастереомеров антисмыслового олигонуклеотида (ASO) против SMAD7, имеющего последовательность согласно SEQ ID NO: 1 (5'-GTXGCCCTTCTCCCXGCAGC-3'), в котором все межнуклеозидные связи представляют собой O, O-связанные фосфоротиоатные связи и X представляет собой 5-метил 2'-дезокситидин, где множество диастереомеров имеют спектр ядерного магнитного резонанса фосфора-31 (³¹P-ЯМР), причем спектр включает:

а) один или несколько резонансов между 54,8 и 55,5 м.д.; и

б) показатель первого главного компонента (PC1) и показатель второго главного компонента (PC2), где:

(i) показатель PC1 ниже приблизительно -0,20 или выше приблизительно 0,25 и показатель PC2 ниже приблизительно 0,00; или

(ii) показатель PC1 находится за пределами диапазона от -0,32 до 0,30 и/или показатель PC2 находится за пределами диапазона от 0,00 до 0,20.

2. Фармацевтическая композиция по п.1, где спектр 31P-ЯМР включает показатель PC1 ниже приблизительно -0,20 и показатель PC2 ниже приблизительно 0,00.

3. Фармацевтическая композиция по п.1 или 2, где спектр 31P-ЯМР включает показатель PC1 от приблизительно -0,47 до приблизительно -0,20 и показатель PC2 от приблизительно -0,27 до приблизительно 0,00.

4. Фармацевтическая композиция по п.1, где спектр 31P-ЯМР включает показатель PC1 выше приблизительно 0,25 и показатель PC2 ниже приблизительно 0,00.

5. Фармацевтическая композиция по п.1 или 4, где спектр 31P-ЯМР включает показатель PC1 от приблизительно 0,65 до приблизительно 0,9 и показатель PC2 от приблизительно -0,47 до приблизительно 0,00.

6. Фармацевтическая композиция по п.1, где спектр 31P-ЯМР включает показатель PC1, который находится за пределами диапазона от -0,32 до 0,30, когда показатель PC2 выше 0,00 и ниже 0,20.

7. Фармацевтическая композиция по п.1 или 6, где спектр 31P-ЯМР включает показатель PC2 за пределами диапазона от 0,00 до 0,20, когда показатель PC1 выше -0,32 и ниже 0,30.

8. Фармацевтическая композиция по любому из пп.1-7, где спектр 31P-ЯМР включает два или более резонансов между 54,8 и 55,5 м.д.

9. Фармацевтическая композиция по п.8, где два или более резонансов между 54,8 и 55,5 м.д. имеют разную интенсивность.

10. Фармацевтическая композиция по любому из пп.1-9, где спектр 31P-ЯМР независимо включает один или несколько резонансов на уровне приблизительно 54,8 м.д., на уровне приблизительно 54,9 м.д., на уровне приблизительно 55,0 м.д., на уровне приблизительно 55,1 м.д., на уровне приблизительно 55,2 м.д., на уровне приблизительно 55,3 м.д., на уровне приблизительно 55,4 м.д. и/или на уровне приблизительно 55,5 м.д.

11. Фармацевтическая композиция по любому из пп.1-10, где спектр 31P-ЯМР

независимо включает два или более резонансов на уровне приблизительно 54,8 м.д., на уровне приблизительно 54,9 м.д., на уровне приблизительно 55,0 м.д., на уровне приблизительно 55,1 м.д., на уровне приблизительно 55,2 м.д., на уровне приблизительно 55,3 м.д., на уровне приблизительно 55,4 м.д. и/или на уровне приблизительно 55,5 м.д.

12. Фармацевтическая композиция по любому из пп.1-11, содержащая от 100 миллимоль до 5 моль ASO против SMAD7.

13. Фармацевтическая композиция по любому из пп.1-12, содержащая от 100 миллимоль до 2 моль, от 100 миллимоль до 900 миллимоль, от 300 миллимоль до 5 моль, от 300 миллимоль до 2 моль, от 300 миллимоль до 900 миллимоль, от 900 миллимоль до 5 моль или от 900 миллимоль до 2 моль ASO против SMAD7.

14. Фармацевтическая композиция по любому из пп.1-13, содержащая приблизительно 300 миллимоль ASO против SMAD7.

15. Фармацевтическая композиция по любому из пп.1-13, содержащая приблизительно 900 миллимоль ASO против SMAD7.

16. Фармацевтическая композиция по любому из пп.1-13, содержащая приблизительно 2 моль ASO против SMAD7.

17. Фармацевтическая композиция по любому из пп.1-13, содержащая более 300 миллимоль, более 900 миллимоль или более 2 моль ASO против SMAD7.

18. Фармацевтическая композиция по любому из пп.1-17, содержащая:

а) от приблизительно 0,5% до приблизительно 30% по массе ASO против SMAD7;

б) от приблизительно 20% до приблизительно 50% по массе маннита;

с) от приблизительно 10% до приблизительно 30% по массе микрокристаллической целлюлозы; и

д) кишечнорастворимое покрытие, содержащее сополимер этилакрилат-метакриловая кислота.

19. Фармацевтическая композиция по любому из пп.1-18, содержащая:

а) внутригранулярную фазу, содержащую:

i) от приблизительно 5% до приблизительно 10% по массе ASO против SMAD7;

ii) приблизительно 40% по массе маннита;

iii) приблизительно 8% по массе микрокристаллической целлюлозы;

iv) приблизительно 5% по массе гидроксипропилметилцеллюлозы; и

v) приблизительно 2% по массе натрия крахмала гликолята;

б) внегранулярную фазу, содержащую:

i) приблизительно 17% по массе микрокристаллической целлюлозы;

ii) приблизительно 2% по массе натрия крахмала гликолята,

iii) приблизительно 0,4% по массе стеарата магния; и

с) кишечнорастворимое покрытие, содержащее сополимер этилакрилат-метакриловая кислота,

где проценты по массе представляют собой массу ингредиентов относительно общей массы фармацевтической композиции.

20. Фармацевтическая композиция по любому из пп.1-18, содержащая:
- a) от приблизительно 5% до приблизительно 30% по массе ASO против SMAD7;
 - b) от приблизительно 20% до приблизительно 50% по массе маннита;
 - c) от приблизительно 10% до приблизительно 30% по массе микрокристаллической целлюлозы,
 - d) от приблизительно 0,5% до приблизительно 10% по массе гидроксипропилметилцеллюлозы;
 - e) от приблизительно 0,5% до приблизительно 10% по массе натрия крахмала гликолята;
 - f) от приблизительно 0,05% до приблизительно 1% по массе стеарата магния;
 - g) от приблизительно 0,5% до приблизительно 10% по массе Opadry® AMB; и
 - h) от приблизительно 5% до приблизительно 20% по массе Acryl-EZE®.
21. Фармацевтическая композиция по любому из пп.1-18, содержащая:
- a) приблизительно 8,5% по массе ASO против SMAD7;
 - b) приблизительно 40% по массе маннита;
 - c) приблизительно 25% по массе микрокристаллической целлюлозы,
 - d) приблизительно 5% по массе гидроксипропилметилцеллюлозы;
 - e) приблизительно 4% по массе натрия крахмала гликолята;
 - f) приблизительно 0,4% по массе стеарата магния;
 - g) приблизительно 4% по массе Opadry® AMB; и
 - h) от приблизительно 10% до приблизительно 15% по массе Acryl-EZE®.
22. Фармацевтическая композиция по любому из пп.1-18, содержащая:
- a) приблизительно 23% по массе ASO против SMAD7;
 - b) приблизительно 28% по массе маннита;
 - c) приблизительно 25% по массе микрокристаллической целлюлозы,
 - d) приблизительно 5% по массе гидроксипропилметилцеллюлозы;
 - e) приблизительно 4% по массе натрия крахмала гликолята;
 - f) приблизительно 0,4% по массе стеарата магния;
 - g) приблизительно 4% по массе Opadry® AMB; и
 - h) от приблизительно 7% до приблизительно 12% по массе Acryl-EZE®.
23. Фармацевтическая композиция по любому из пп.1-22, где фармацевтическая композиция составлена в качестве таблетки.
24. Фармацевтическая композиция по любому из пп.1-23, где фармацевтическая композиция снижает уровень мРНК и/или белка SMAD7 в клетке.
25. Фармацевтическая композиция по п.24, где снижение экспрессии белка SMAD7 составляет более 40% по сравнению с клеткой в отсутствии лечения.
26. Фармацевтическая композиция по любому из пп.1-25, где фармацевтическая композиция является клинически эффективной для лечения или предупреждения воспалительного заболевания кишечника.
27. Фармацевтическая композиция по п.26, где воспалительное заболевание

кишечника представляет собой болезнь Крона.

28. Фармацевтическая композиция по п.27, где болезнь Крона представляет собой послеоперационный рецидив болезни Крона.

29. Фармацевтическая композиция по любому из пп.1-28 для перорального введения.

30. Фармацевтическая композиция по любому из пп.1-29 для перорального введения, где ASO против SMAD7 вводят индивидууму, нуждающемуся в этом, в дозе приблизительно 40 мг, приблизительно 50 мг, приблизительно 60 мг, приблизительно 70 мг, приблизительно 80 мг, приблизительно 90 мг, приблизительно 100 мг, приблизительно 110 мг, приблизительно 120 мг, приблизительно 130 мг, приблизительно 140 мг, приблизительно 150 мг, приблизительно 160 мг, приблизительно 170 мг, приблизительно 180 мг, приблизительно 190 мг или приблизительно 200 мг.

31. Фармацевтическая композиция по любому из пп.1-30 для перорального введения приблизительно каждые 6 часов, приблизительно каждые 12 часов, приблизительно каждые 24 часа, приблизительно каждые 48 часов, приблизительно каждые 72 часа, каждые сутки, два раза в неделю, один раз в 2 недели или один раз в месяц.

32. Фармацевтическая композиция по любому из пп.1-31 для перорального введения в дозе приблизительно 160 мг в сутки.

33. Способ лечения или предупреждения воспалительного заболевания кишечника у индивидуума, нуждающегося в этом, включающий введение индивидууму фармацевтической композиции по любому из пп.1-32.

34. Применение фармацевтической композиции по любому из пп.1-32 для производства лекарственного средства для лечения воспалительного заболевания кишечника.

35. Фармацевтическая композиция по любому из пп.1-32 для применения в лечении воспалительного заболевания кишечника.

36. Способ по п.33, применение по п.34 или фармацевтическая композиция для применения по п.35, где воспалительное заболевание кишечника представляет собой болезнь Крона.

37. Способ по п.33 или 36, применение по п.34 или 36, или фармацевтическая композиция для применения по п.35 или 36, где болезнь Крона представляет собой послеоперационный рецидив болезни Крона.

38. Способ предупреждения или лечения послеоперационного рецидива болезни Крона (CD) у индивидуума, нуждающегося в этом, включающий ингибирование SMAD7 у индивидуума.

39. Способ по п.38, где по меньшей мере один образец от индивидуума имеет повышенный уровень SMAD7 относительно известного контрольного уровня, где известный контрольный уровень представляет собой уровень SMAD7 в образце, взятом у индивидуума до или в ходе хирургического лечения CD, или уровень SMAD7 в образце,

взятом у здорового индивидуума без CD.

40. Способ предупреждения или лечения послеоперационного рецидива болезни Крона (CD) у индивидуума, нуждающегося в этом, включающий предупреждение показателя индекса активности болезни Крона (CAAI) более 200 у индивидуума или снижение показателя CDAI по меньшей мере на 50 баллов.

41. Способ по п.40, включающий предупреждение показателя CDAI более 150.

42. Способ по п.40, включающий снижение показателя CDAI по меньшей мере на 100 баллов.

43. Способ прогнозирования послеоперационного рецидива болезни Крона (CD) у индивидуума, нуждающегося в этом, включающий определение уровня SMAD7 в первом образце от индивидуума, где повышенный уровень SMAD7 относительно известного контрольного уровня прогнозирует рецидив CD, где известный контрольный уровень представляет собой уровень SMAD7 в образце, взятом от индивидуума до или в ходе хирургического лечения CD, или уровень SMAD7 в образце, полученном от здорового индивидуума без CD.

44. Способ идентификации индивидуума, имеющего риск послеоперационного рецидива болезни Крона (CD), включающий: определение уровня SMAD7 в первом образце от индивидуума, где повышенный уровень SMAD7 относительно известного контрольного уровня идентифицирует индивидуума как имеющего риск рецидива CD, где известный контрольный уровень представляет собой уровень SMAD7 в образце, полученном от индивидуума до или в ходе хирургического лечения CD, или уровень SMAD7 в образце, полученном от здорового индивидуума без CD.

45. Способ по п.43 или 44, включающий:

а) если уровень SMAD7 повышен относительно известного контрольного уровня, тогда введение индивидууму фармацевтической композиции, содержащей ASO против SMAD7; или

б) если уровень SMAD7 не повышен относительно известного контрольного уровня, тогда определение уровня SMAD7 во втором образце от индивидуума.

46. Способ по п.45, где второй образец получают непосредственно после, приблизительно через 1 час, приблизительно через 3 часа, приблизительно через 6 часов, приблизительно через 12 часов, приблизительно через 1 сутки, приблизительно через 3 суток, приблизительно через 1 неделю, приблизительно через 2 недели, приблизительно через 1 месяц, приблизительно через 2 месяца, приблизительно через 3 месяца, приблизительно через 4 месяца, приблизительно через 5 месяцев, приблизительно через 6 месяцев, приблизительно через 7 месяцев, приблизительно через 8 месяцев, приблизительно через 9 месяцев, приблизительно через 10 месяцев, приблизительно через 11 месяцев или приблизительно через 12 месяцев после первого образца.

47. Способ предупреждения или лечения послеоперационного рецидива болезни Крона (CD) у индивидуума, нуждающегося в этом, включающий введение индивидууму фармацевтической композиции, содержащей ASO против SMAD7.

48. Способ по п.38, где ингибирование SMAD7 у индивидуума включает введение индивидууму фармацевтической композиции, содержащей ASO против SMAD7.

49. Способ по п.47 или 48, где ASO против SMAD7 вводят в дозе приблизительно 40 мг, приблизительно 50 мг, приблизительно 60 мг, приблизительно 70 мг, приблизительно 80 мг, приблизительно 90 мг, приблизительно 100 мг, приблизительно 110 мг, приблизительно 120 мг, приблизительно 130 мг, приблизительно 140 мг, приблизительно 150 мг, приблизительно 160 мг, приблизительно 170 мг, приблизительно 180 мг, приблизительно 190 мг или приблизительно 200 мг.

50. Способ по любому из пп.47-49, где ASO против SMAD7 вводят приблизительно каждые 6 часов, приблизительно каждые 12 часов, приблизительно каждые 24 часа, приблизительно каждые 48 часов, приблизительно каждые 72 часа, каждые сутки, два раза в неделю, один раз в 2 недели или один раз в месяц.

51. Способ по любому из пп.47-50, где ASO против SMAD7 вводят в дозе приблизительно 160 мг в сутки.

52. Способ по любому из пп.47-51, где ASO против SMAD7 содержит последовательность, выбранную из любой из SEQ ID NO: 1-6 или их фармацевтически приемлемых солей.

53. Способ по любому из пп.47-52, где ASO против SMAD7 имеет последовательность согласно SEQ ID NO: 1 (5'-GTXGCCCTTCTCCCXGCAGC-3'), в которой все межнуклеозидные связи представляют собой O, O-связанные фосфоротиоатные связи и X представляет собой 5-метил 2'-дезокситидин.

54. Способ по любому из пп.47-53, где фармацевтическая композиция содержит множество диастереомеров ASO против SMAD7, имеющих последовательность согласно SEQ ID NO: 1 (5'-GTXGCCCTTCTCCCXGCAGC-3'), в которой все межнуклеозидные связи представляют собой O, O-связанные фосфоротиоатные связи и X представляет собой 5-метил 2'-дезокситидин,

где множество диастереомеров имеет спектр ^{31}P -ЯМР, включающий:

а) один или несколько резонансов между 54,8 и 55,5 м.д.; и

б) показатель первого главного компонента (PC1) и показатель второго главного компонента (PC2), где:

(i) показатель PC1 ниже приблизительно -0,20 или выше приблизительно 0,25 и показатель PC2 ниже приблизительно 0,00; или

(ii) показатель PC1 находится за пределами диапазона от -0,32 до 0,30 и/или показатель PC2 находится за пределами диапазона от 0,00 до 0,20.

55. Способ по п.54, где спектр ^{31}P -ЯМР включает:

а) показатель PC1 ниже приблизительно -0,20 и показатель PC2 ниже приблизительно 0,00;

б) показатель PC1 выше приблизительно 0,25 и показатель PC2 ниже приблизительно 0,00;

с) показатель PC1 от приблизительно -0,47 до приблизительно -0,20 и показатель

PC2 от приблизительно -0,27 до приблизительно 0,00;

d) показатель PC1 от приблизительно 0,65 до приблизительно 0,9 и показатель PC2 от приблизительно -0,47 до приблизительно 0,00;

e) показатель PC1 за пределами диапазона от -0,32 до 0,30, когда показатель PC2 выше 0,00 и ниже 0,20; и/или

f) показатель PC2 за пределами диапазона от 0,00 до 0,20, когда показатель PC1 выше -0,32 и ниже 0,30.

56. Способ по любому из пп.38-55, где послеоперационный рецидив выбран из группы, состоящей из: эндоскопического рецидива, гистологического рецидива, радиографического рецидива, клинического рецидива и их комбинаций.

57. Способ по любому из пп.38-56, где индивидууму проводилось по меньшей мере одно хирургическое лечение CD.

58. Способ по любому из пп.57, где по меньшей мере одно хирургическое лечение выбрано из группы, состоящей из: резекции кишки, тонкотолстокишечной резекции, колэктомии, проктоколэктомии, пластики стриктуры, илеостомии, анальной фистулотомии и их комбинации.

59. Способ по п.58, где по меньшей мере одно хирургическое лечение представляет собой тонкотолстокишечную резекцию.

60. Способ по любому из пп.38-59, где индивидуум не имеет признаков послеоперационного рецидива.

61. Способ по любому из пп.38-60, где индивидуум имеет по меньшей мере один признак послеоперационного рецидива.

62. Способ по п.61, где индивидуум имеет по меньшей мере один признак эндоскопического рецидива.

63. Способ по п.62, где по меньшей мере один признак представляет собой очаг повреждения слизистой оболочки.

64. Способ по любому из пп.39-63, где образец представляет собой образец слизистой оболочки.

65. Способ по п.39-64, где образец получен непосредственно после, приблизительно через 1 час, приблизительно через 3 часа, приблизительно через 6 часов, приблизительно через 12 часов, приблизительно через 1 сутки, приблизительно через 3 суток, приблизительно через 1 неделю, приблизительно через 2 недели, приблизительно через 1 месяц, приблизительно через 2 месяца, приблизительно через 3 месяца, приблизительно через 4 месяца, приблизительно через 5 месяцев, приблизительно через 6 месяцев, приблизительно через 7 месяцев, приблизительно через 8 месяцев, приблизительно через 9 месяцев, приблизительно через 10 месяцев, приблизительно через 11 месяцев или приблизительно через 12 месяцев после хирургического лечения CD.

66. Способ по любому из пп.39-65, где уровень SMAD7 представляет собой уровень мРНК против SMAD7 или уровень белка против SMAD7.

67. Способ по любому из пп.39-66, где повышенный уровень SMAD7 по меньшей

мере приблизительно на 10%, по меньшей мере приблизительно на 20%, по меньшей мере приблизительно на 30%, по меньшей мере приблизительно на 40%, по меньшей мере приблизительно на 60% или по меньшей мере приблизительно на 80% повышен по сравнению с известным контрольным уровнем.

68. Способ по любому из пп.45-67, где фармацевтическую композицию вводят перорально.

69. Способ по любому из пп.45-68, где фармацевтическую композицию вводят непосредственно после, приблизительно через 1 час, приблизительно через 3 часа, приблизительно через 6 часов, приблизительно через 12 часов, приблизительно через 1 сутки, приблизительно через 3 суток, приблизительно через 1 неделю, приблизительно через 2 недели, приблизительно через 1 месяц, приблизительно через 2 месяца, приблизительно через 3 месяца, приблизительно через 4 месяца, приблизительно через 5 месяцев, приблизительно через 6 месяцев, приблизительно через 7 месяцев, приблизительно через 8 месяцев, приблизительно через 9 месяцев, приблизительно через 10 месяцев, приблизительно через 11 месяцев или приблизительно через 12 месяцев после хирургического лечения CD.

70. Фармацевтическая композиция, содержащая множество диастереомеров антисмыслового олигонуклеотида (ASO) против SMAD7, являющихся фармакологически и/или клинически эффективными, которая получена способом, включающим:

а) подтверждение спектра ^{31}P -ЯМР для множества диастереомеров, имеющего один или несколько резонансов между 54,8 и 55,5 м.д.; и

б) подтверждение, что спектр ^{31}P -ЯМР имеет:

(i) показатель первого главного компонента (PC1) ниже приблизительно -0,20 или выше приблизительно 0,25 и показатель второго главного компонента (PC2) ниже приблизительно 0,00, или

(ii) показатель PC1, который находится за пределами диапазона от -0,32 до 0,30, и/или показатель PC2, который находится за пределами диапазона от 0,00 до 0,20, при определении посредством анализа главных компонент (PCA).

71. Способ производства фармацевтической композиции, содержащей множество диастереомеров антисмыслового олигонуклеотида (ASO) против SMAD7, причем способ включает:

а) подтверждение того, что спектр ^{31}P -ЯМР для множества диастереомеров имеет один или несколько резонансов между 54,8 и 55,5 м.д.; и

б) подтверждение того, что спектр ^{31}P -ЯМР имеет:

(i) показатель первого главного компонента (PC1) ниже приблизительно -0,20 или выше приблизительно 0,25 и показатель второго главного компонента (PC2) ниже приблизительно 0,00, или

(ii) показатель PC1, который находится за пределами диапазона от -0,32 до 0,30, и/или показатель PC2, который находится за пределами диапазона от 0,00 до 0,20, при определении посредством анализа главных компонент (PCA).

72. Фармацевтическая композиция по п.70 или способ по п.71, где способ включает подтверждение того, что:

a) показатель PC1 ниже приблизительно $-0,20$ и показатель PC2 ниже приблизительно $0,00$;

b) показатель PC1 выше приблизительно $0,25$ и показатель PC2 ниже приблизительно $0,00$;

c) показатель PC1 составляет от приблизительно $-0,47$ до приблизительно $-0,20$ и показатель PC2 составляет от приблизительно $-0,27$ до приблизительно $0,00$;

d) показатель PC1 составляет от приблизительно $0,65$ до приблизительно $0,9$ и показатель PC2 составляет от приблизительно $-0,47$ до приблизительно $0,00$;

e) показатель PC1 находится за пределами диапазона от $-0,32$ до $0,30$, когда показатель PC2 выше $0,00$ и ниже $0,20$; и/или

f) показатель PC2 находится за пределами диапазона от $0,00$ до $0,20$, когда показатель PC1 выше $-0,32$ и ниже $0,30$.

73. Фармацевтическая композиция по п.70 или 72 или способ по п.71 или 72, где способ включает подтверждение того, что:

a) спектр $31P$ -ЯМР имеет один или два резонансов между $54,8$ и $55,5$ м.д.;

b) спектр $31P$ -ЯМР имеет один или несколько резонансов на уровне приблизительно $54,8$ м.д.;

c) спектр $31P$ -ЯМР имеет два или более резонансов на уровне приблизительно $54,8$ м.д.;

d) спектр $31P$ -ЯМР имеет один или несколько резонансов на уровне приблизительно $54,9$ м.д.;

e) спектр $31P$ -ЯМР имеет два или более резонансов на уровне приблизительно $54,9$ м.д.;

f) спектр $31P$ -ЯМР имеет один или несколько резонансов на уровне приблизительно $55,0$ м.д.;

g) спектр $31P$ -ЯМР имеет два или более резонансов на уровне приблизительно $55,0$ м.д.;

h) спектр $31P$ -ЯМР имеет один или несколько резонансов на уровне приблизительно $55,1$ м.д.;

i) спектр $31P$ -ЯМР имеет два или более резонансов на уровне приблизительно $55,1$ м.д.;

j) спектр $31P$ -ЯМР имеет один или несколько резонансов на уровне приблизительно $55,2$ м.д.;

k) спектр $31P$ -ЯМР имеет два или более резонансов на уровне приблизительно $55,2$ м.д.;

l) спектр $31P$ -ЯМР имеет один или несколько резонансов на уровне приблизительно $55,3$ м.д.;

m) спектр $31P$ -ЯМР имеет два или более резонансов на уровне приблизительно $55,3$

м.д.;

п) спектр ^{31}P -ЯМР имеет один или несколько резонансов на уровне приблизительно 55,4 м.д.;

о) спектр ^{31}P -ЯМР имеет два или более резонансов на уровне приблизительно 55,4 м.д.;

р) спектр ^{31}P -ЯМР имеет один или несколько резонансов на уровне приблизительно 55,5 м.д.;

q) спектр ^{31}P -ЯМР имеет два или более резонансов на уровне приблизительно 55,5 м.д.; и/или

г) спектр ^{31}P -ЯМР имеет два или более резонансов между 54,8 с 55,5 с разной интенсивностью.

74. Способ прогнозирования фармакологической и/или клинической эффективности композиции-кандидата, содержащей множество диастереомеров антисмыслового олигонуклеотида (ASO) против SMAD7, причем способ включает проведение для спектра ^{31}P -ЯМР для множества диастереомеров анализа главных компонент (PCA) с получением первого главного компонента (PC1) и второго главного компонента (PC2), где:

а) показатель PC1 ниже приблизительно -0,20 или выше приблизительно 0,25 и показатель PC2 ниже приблизительно 0,00 прогнозирует фармакологическую и/или клиническую эффективность, или

б) показатель PC1, который находится за пределами диапазона от -0,32 до 0,30, и/или показатель PC2, который находится за пределами диапазона от 0,00 до 0,20, прогнозирует фармакологическую и/или клиническую эффективность.

75. Способ по п.74, где:

а) показатель PC1 ниже приблизительно -0,20 и показатель PC2 ниже приблизительно 0,00;

б) показатель PC1 выше приблизительно 0,25 и показатель PC2 ниже приблизительно 0,00;

с) показатель PC1 от приблизительно -0,47 до приблизительно -0,20 и показатель PC2 от приблизительно -0,27 до приблизительно 0,00;

д) показатель PC1 от приблизительно 0,65 до приблизительно 0,9 и показатель PC2 от приблизительно -0,47 до приблизительно 0,00;

е) показатель PC1 за пределами диапазона от -0,32 до 0,30, когда показатель PC2 выше 0,00 и ниже 0,20; и/или

ф) показатель PC2 за пределами диапазона от 0,00 до 0,20, когда показатель PC1 выше -0,32 и ниже 0,30,

прогнозирует фармакологическую и/или клиническую эффективность.

76. Фармацевтическая композиция по п.70 или 72 или способ по любому из пп.71-75, где PCA включает выбор главных компонент с использованием моделирующего набора данных.

77. Фармацевтическая композиция по п.76 или способ по п.76, где моделирующий набор данных включает пять, шесть, семь, восемь, девять, десять или вплоть до двадцати семи спектров ^{31}P -ЯМР, выбранных из спектров ^{31}P -ЯМР, как показано на фиг.5С-5СС.

78. Фармацевтическая композиция по п.76 или 77 или способ по п.76 или 77, где моделирующий набор данных включает спектры ^{31}P -ЯМР, как показано на фиг.5С, 5L, 5Х, 5Н, 5Р, 5I, 5М, 5Т, 5S и 5ВВ.

79. Фармацевтическая композиция по любому из пп.70 и 71-78 или способ по любому из пп.71-78, где главные компоненты выбирают так, чтобы они охватывали более 90% дисперсии моделирующего набора данных.

80. Фармацевтическая композиция по любому из пп.70 и 71-79 или способ по любому из пп.71-79, где ^{31}P -ЯМР проводят в растворе при приблизительно 14,1 Т.

81. Фармацевтическая композиция по любому из пп.70 и 71-80 или способ по любому из пп.71-80, где ASO против SMAD7 содержит последовательность, выбранную из любой из SEQ ID NO: 1-6 или их фармацевтически приемлемых солей.

82. Фармацевтическая композиция по любому из пп.70 и 71-81 или способ по любому из пп.71-81, где межнуклеодитные связи ASO против SMAD7 представляют собой О, О-связанные фосфоротиоаты.

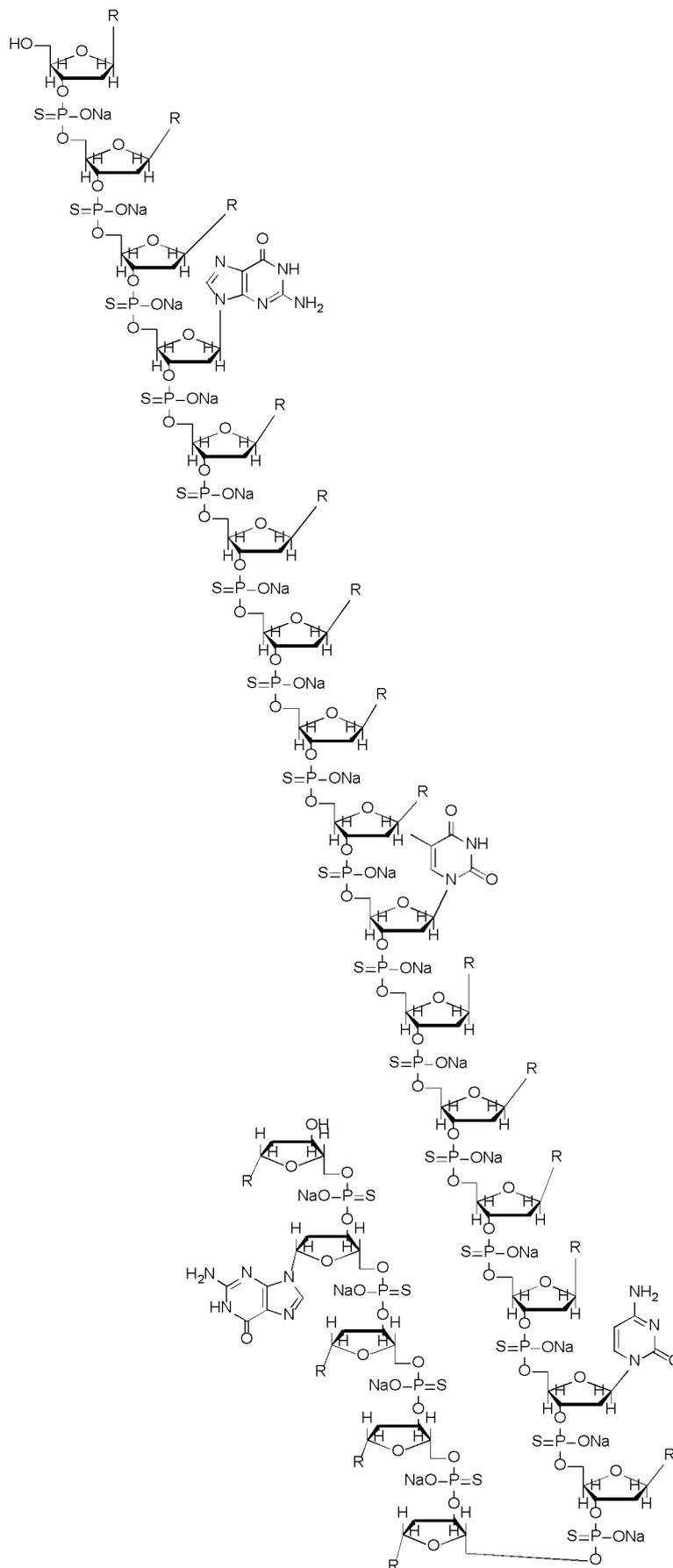
83. Фармацевтическая композиция по любому из пп.70 и 71-82 или способ по любому из пп.71-82, где ASO против SMAD7 имеет последовательность согласно SEQ ID NO: 1 (5'-GTXGCCCTTCTCCCXGCAGC-3'), в которой все межнуклеозидные связи представляют собой О, О-связанные фосфоротиоатные связи и X представляет собой 5-метил 2'-дезокситидин.

84. Способ лечения воспалительного заболевания кишечника у индивидуума, нуждающегося в этом, включающий введение индивидууму фармацевтической композиции по любому из пп.70 и 71-83, ASO против SMAD7, произведенного по любому из пп.71-73 и 76-83, или ASO против SMAD7, для которого спрогнозировано, что он будет фармакологически и/или клинически эффективным, по любому из пп.74-83.

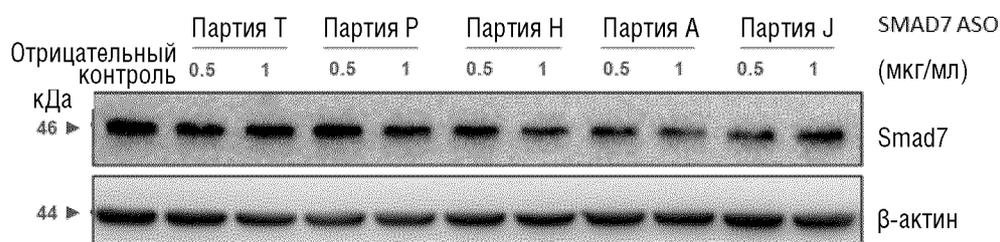
85. Способ по п.84, где воспалительное заболевание кишечника представляет собой болезнь Крона.

86. Способ по п.85, где болезнь Крона представляет собой послеоперационную болезнь Крона.

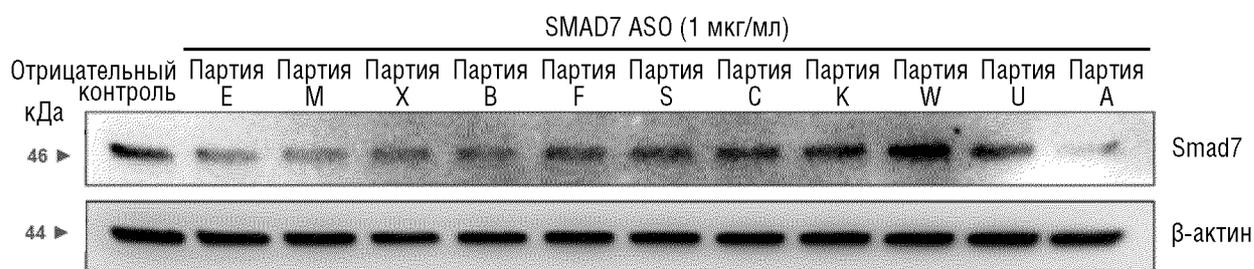
ФИГ.1



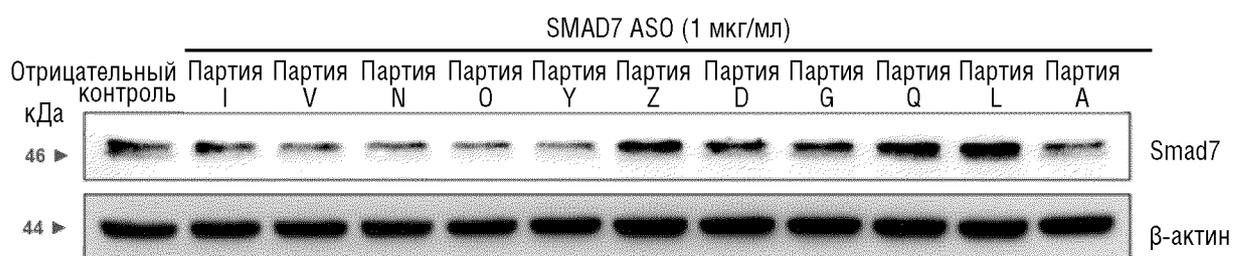
ФИГ.2А



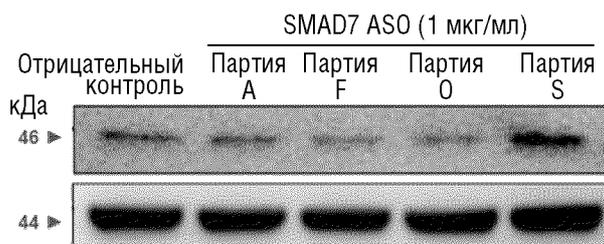
ФИГ.2В



ФИГ.2С



ФИГ.2D



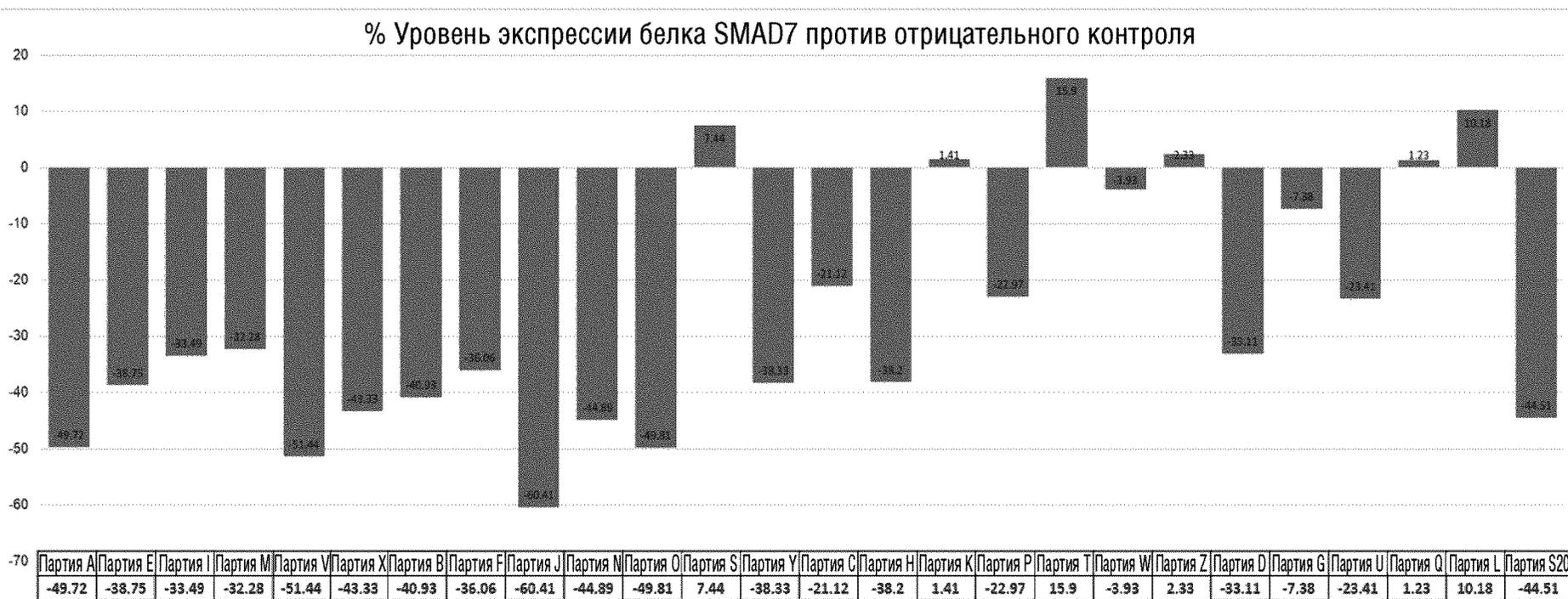
ФИГ.2Е



ФИГ.3А

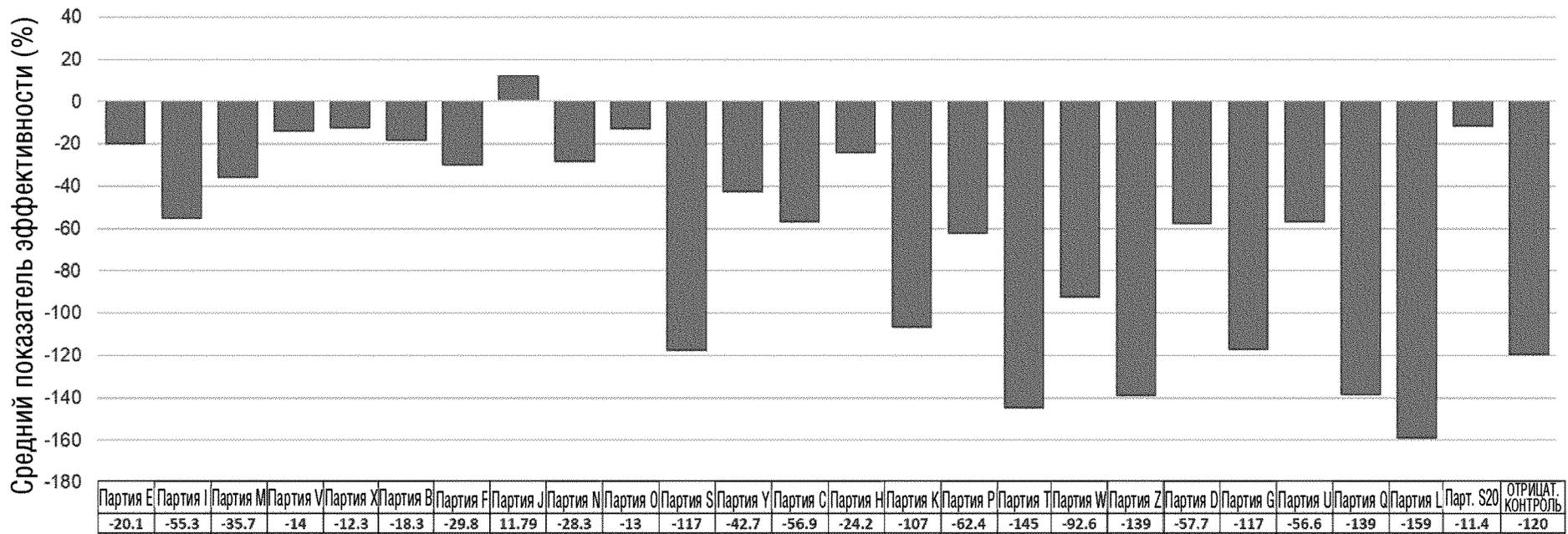
% Уровень экспрессии белка SMAD7 против отрицательного контроля

% Уровень экспрессии белка SMAD7 против отрицательного контроля

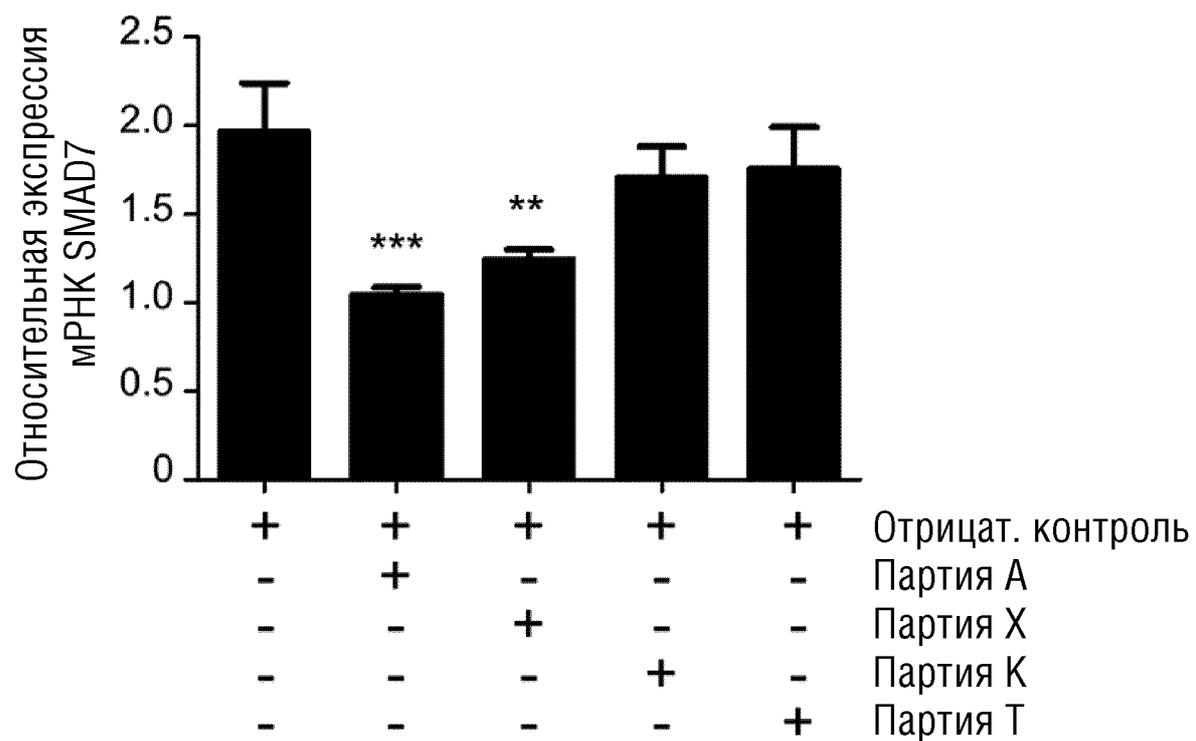


ФИГ.3В

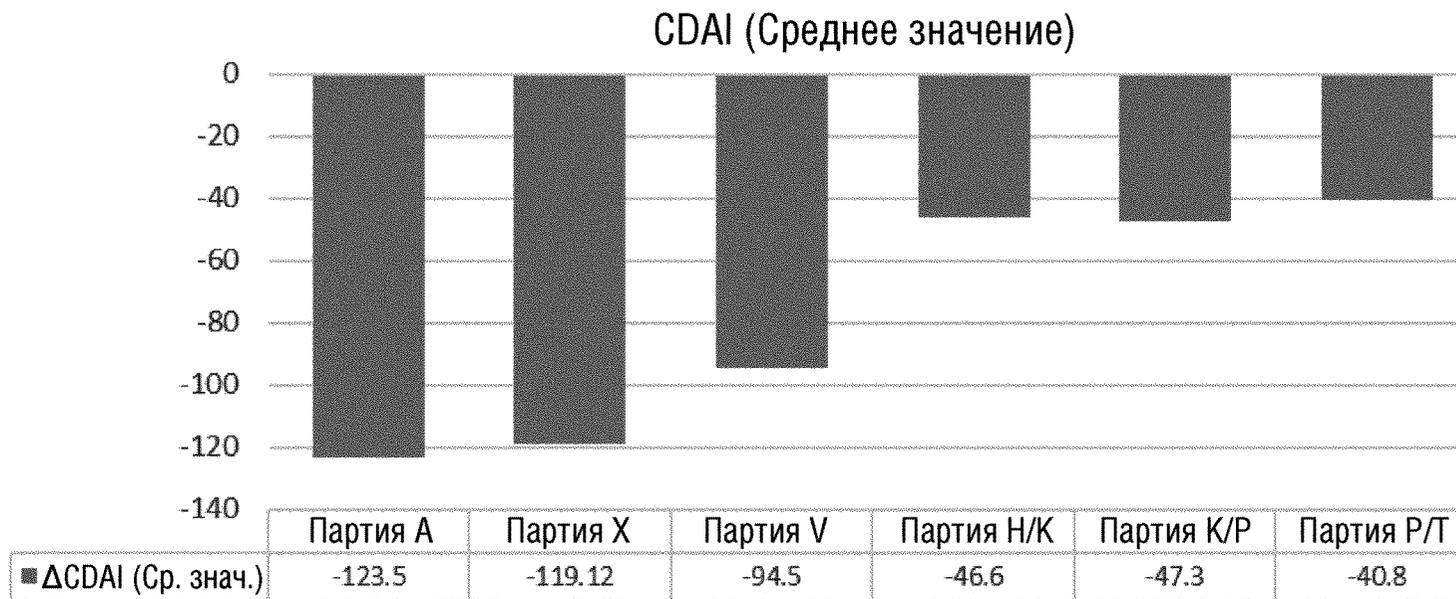
Активность in vitro (эффективность относительно партии А)



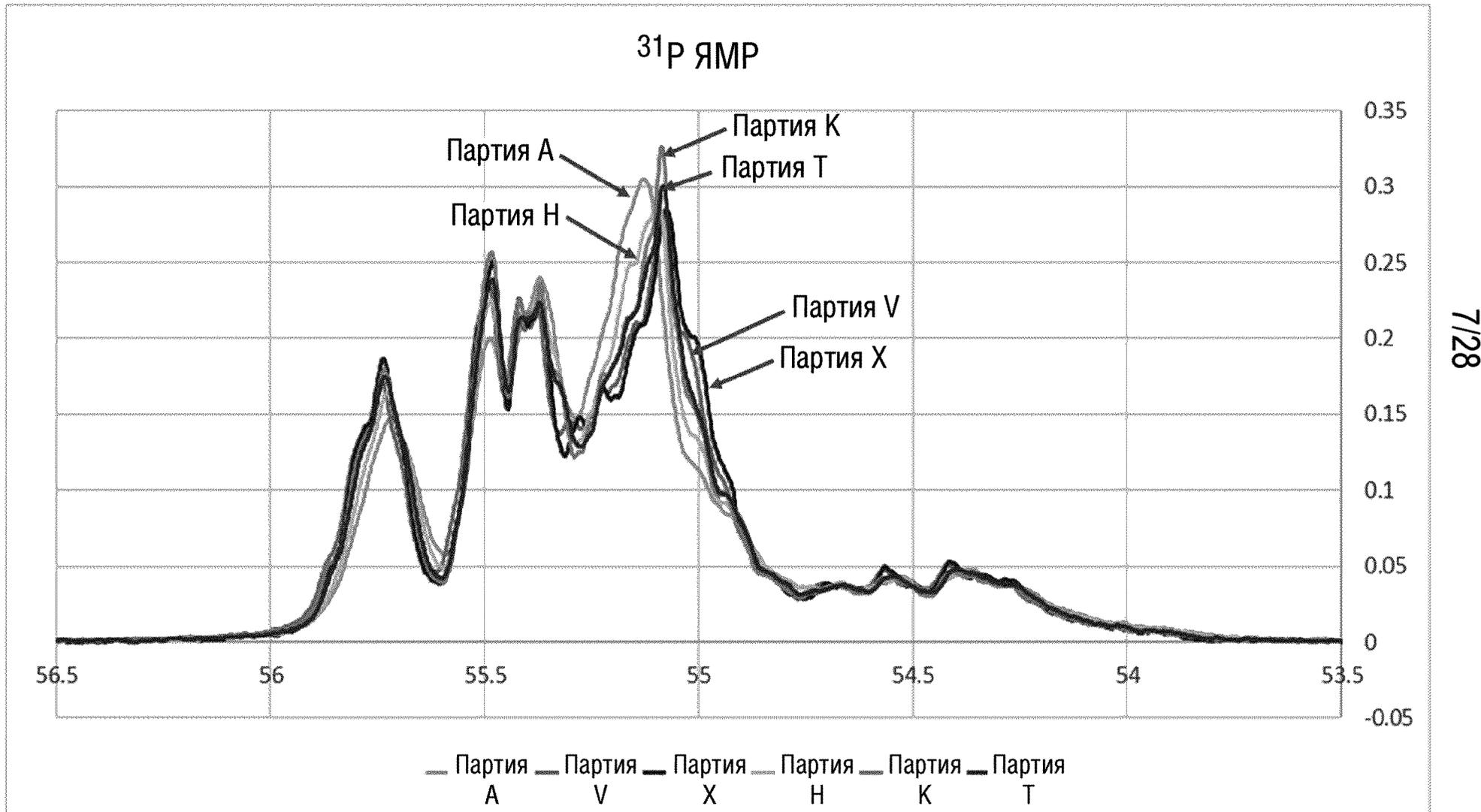
ФИГ.3С



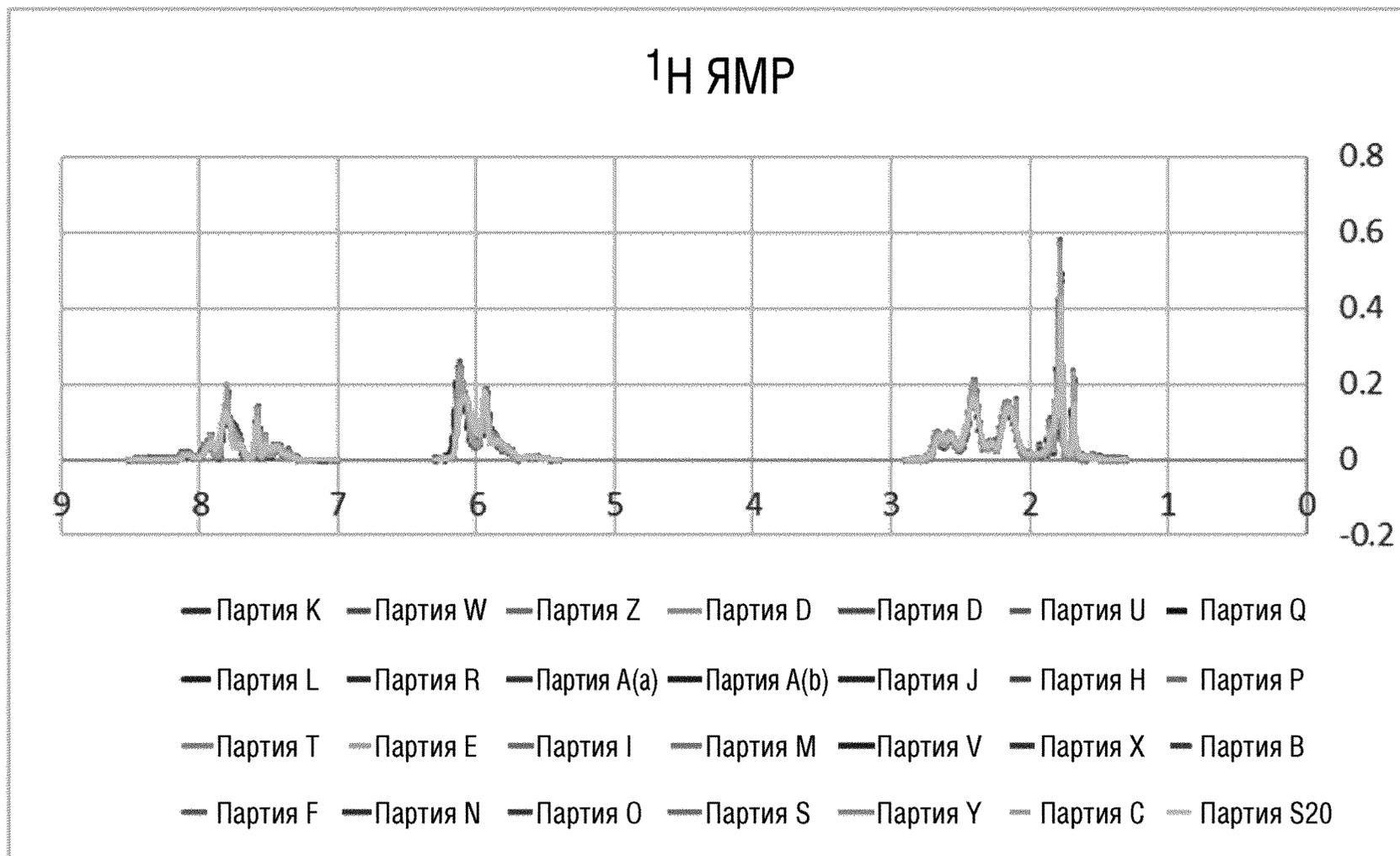
ФИГ.4А



ФИГ.4В

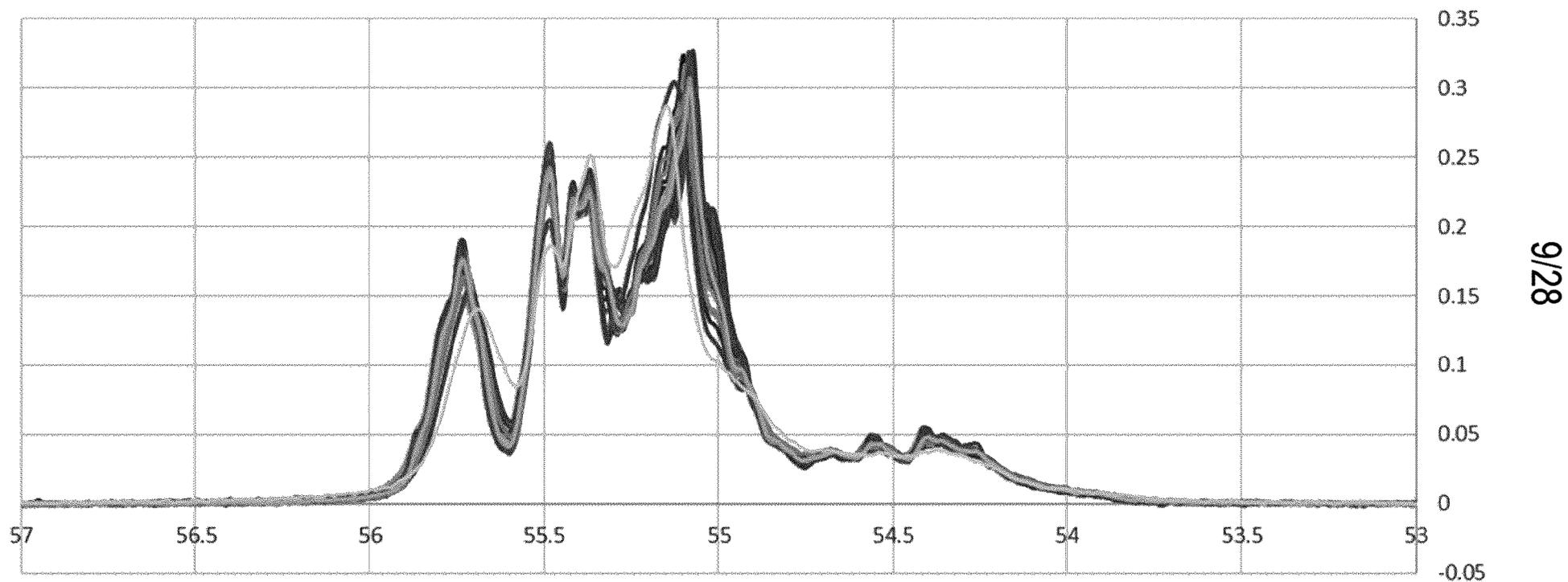


ФИГ.5А



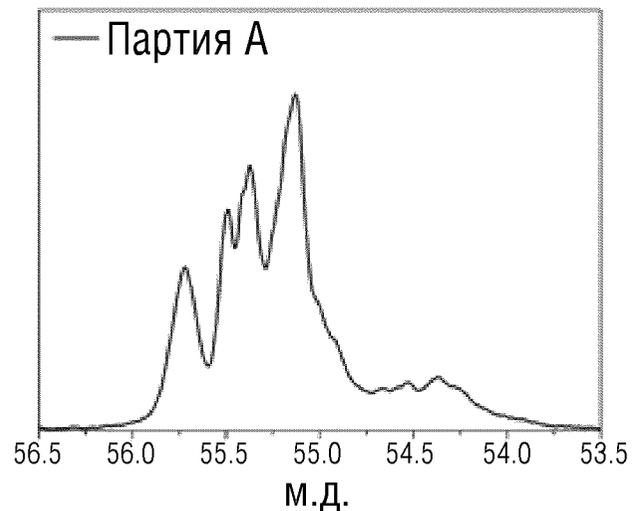
ФИГ.5В

31P ЯМР

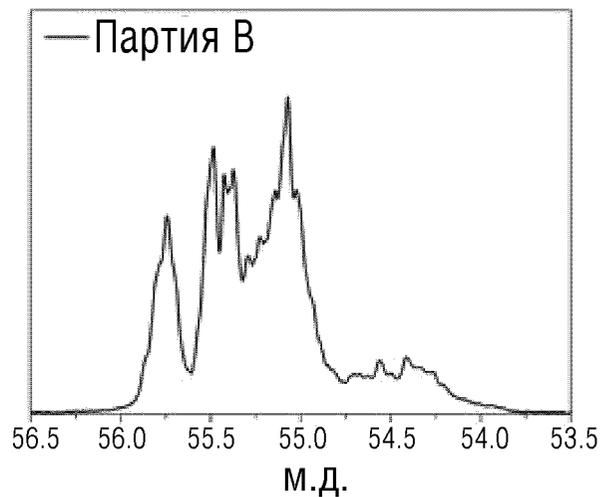


- Партия E — Партия I — Партия M — Партия V — Партия X — Партия B — Партия F
- Партия N — Партия O — Партия S — Партия Y — Партия C — Партия K — Партия W
- Партия Z — Партия D — Партия G — Партия U — Партия Q — Партия L — Партия R
- Партия A(a) — Партия A(b) — Партия J — Партия H — Партия P — Партия T — Партия S20

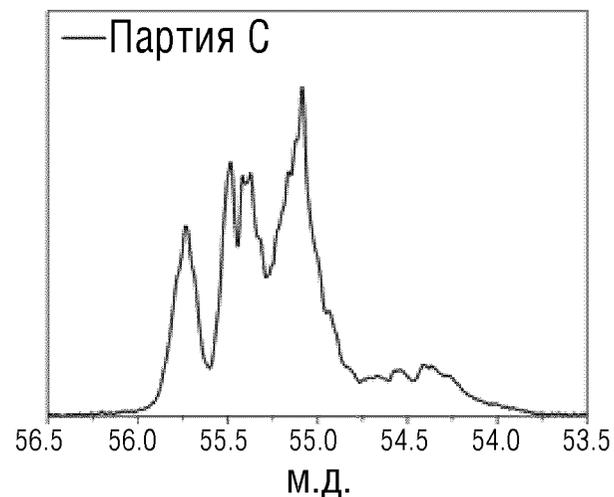
ФИГ.5С



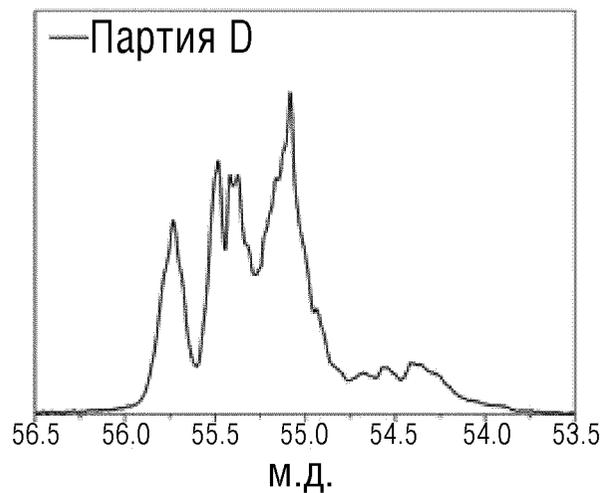
ФИГ.5D



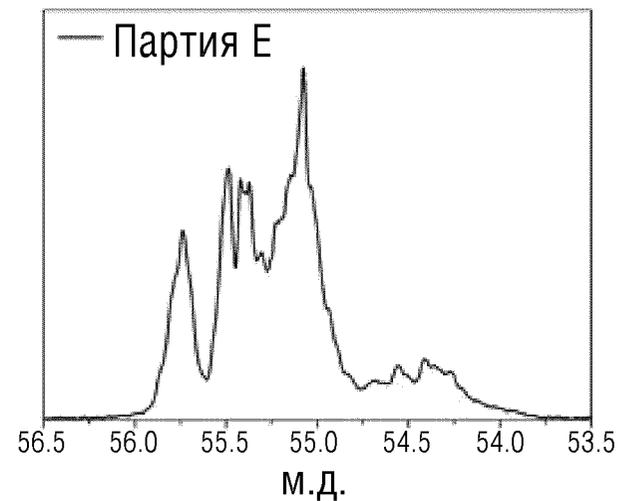
ФИГ.5Е



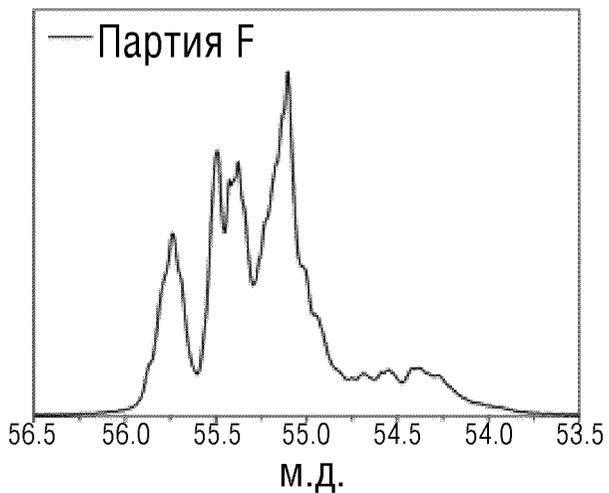
ФИГ.5F



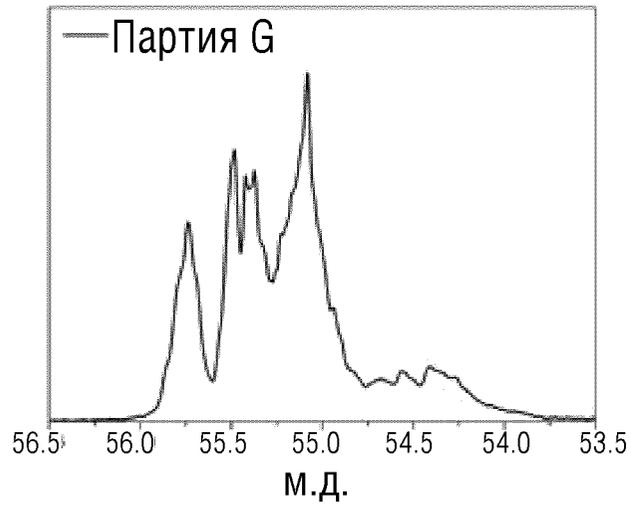
ФИГ.5G



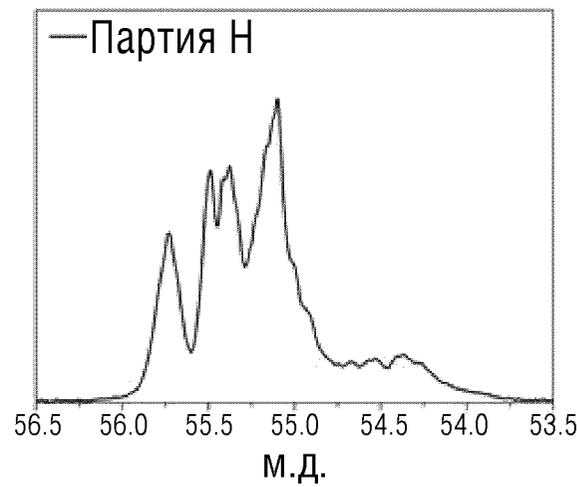
ФИГ.5H



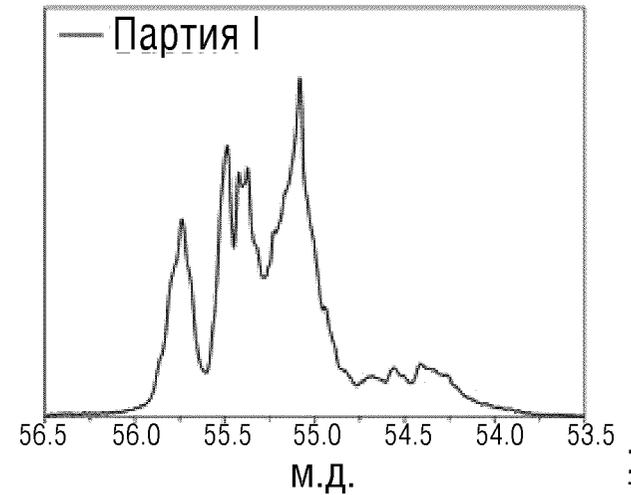
ФИГ.5I



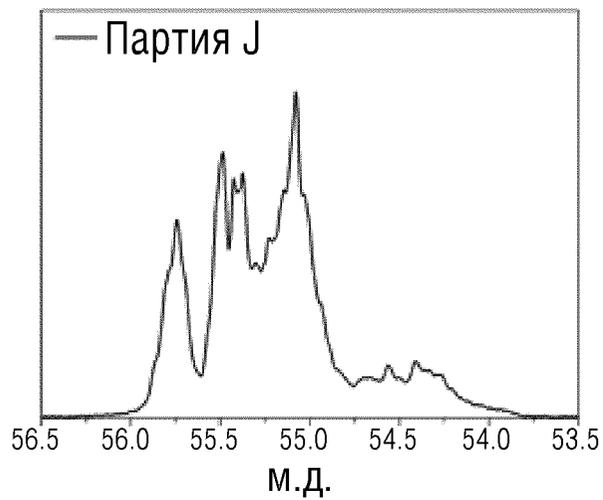
ФИГ.5J



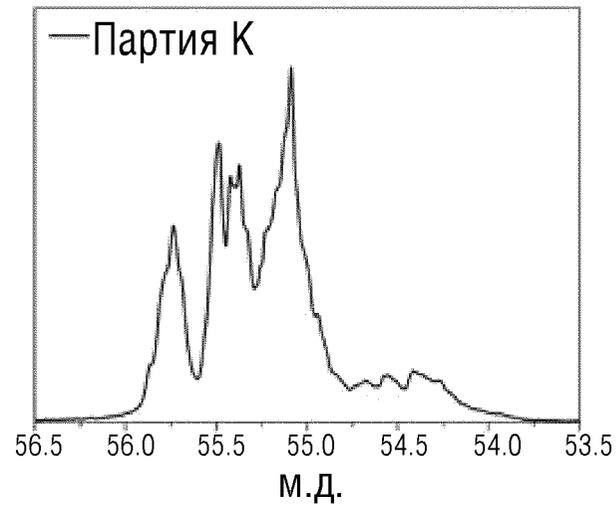
ФИГ.5K



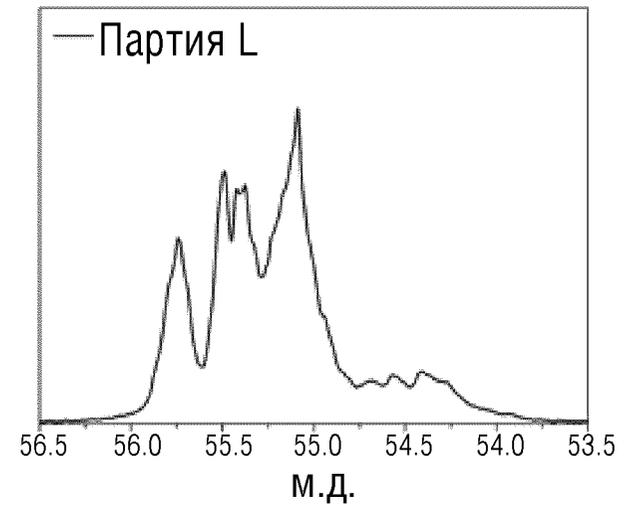
ФИГ.5L



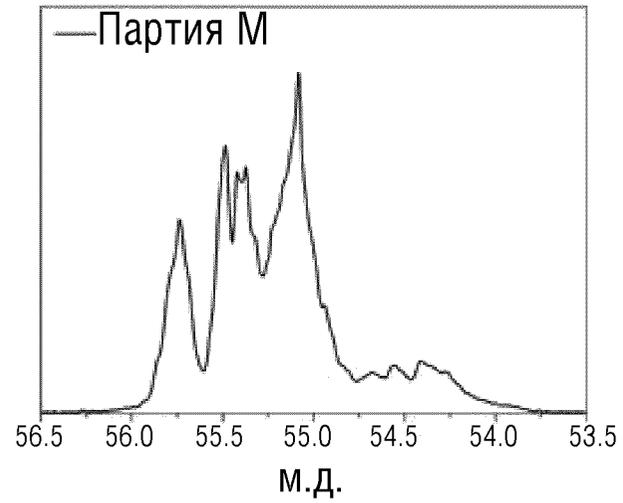
ФИГ.5M



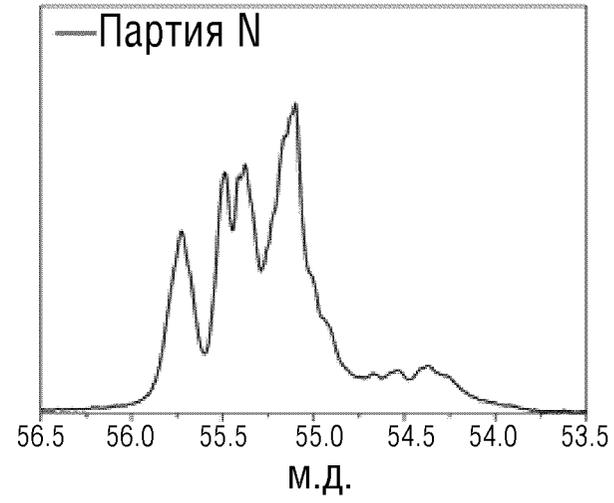
ФИГ.5N



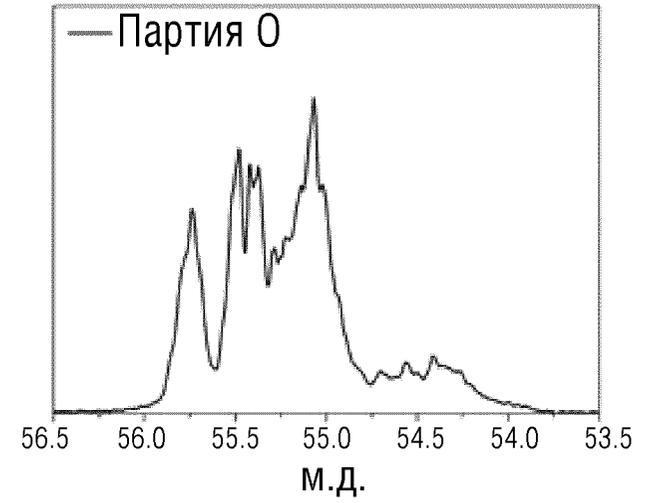
ФИГ.50



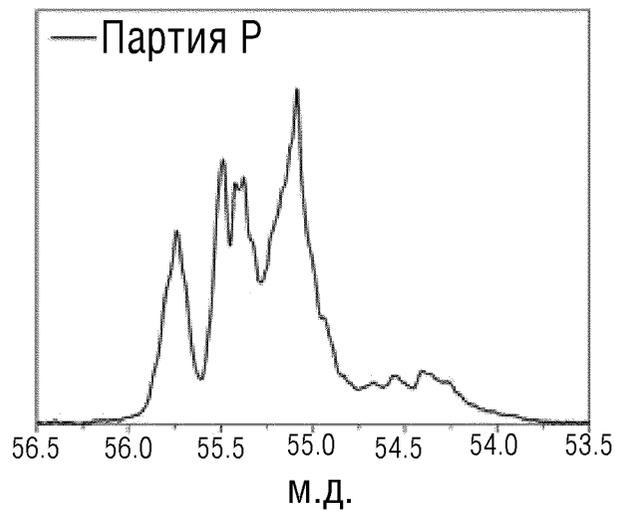
ФИГ.5Р



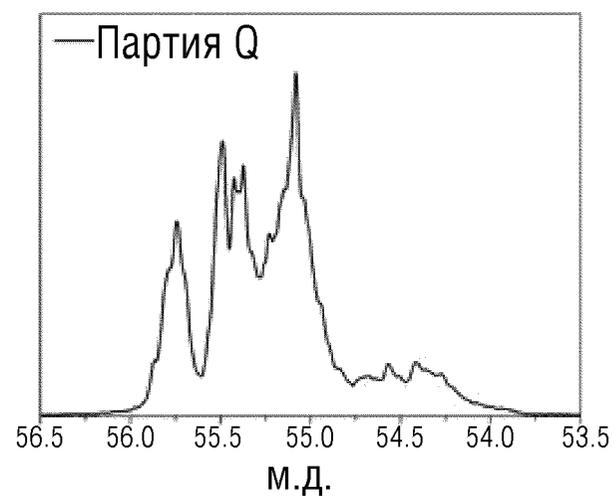
ФИГ.5Q



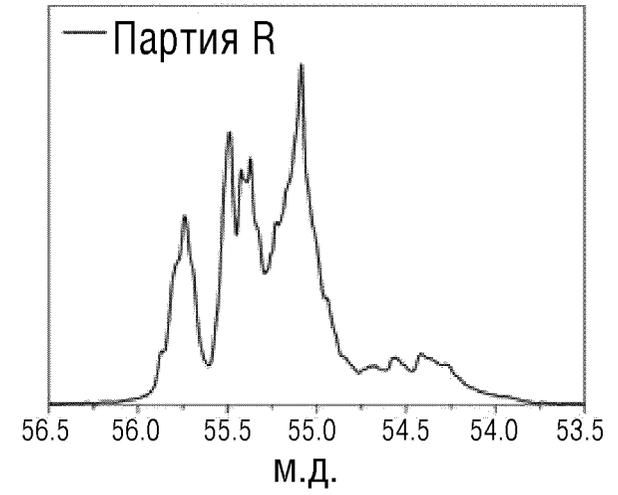
ФИГ.5R



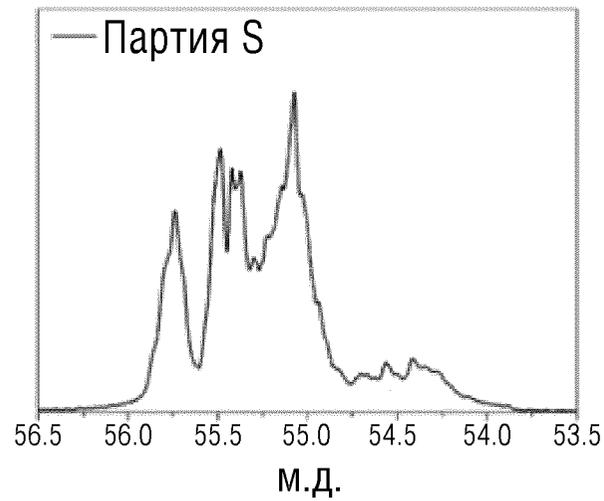
ФИГ.5S



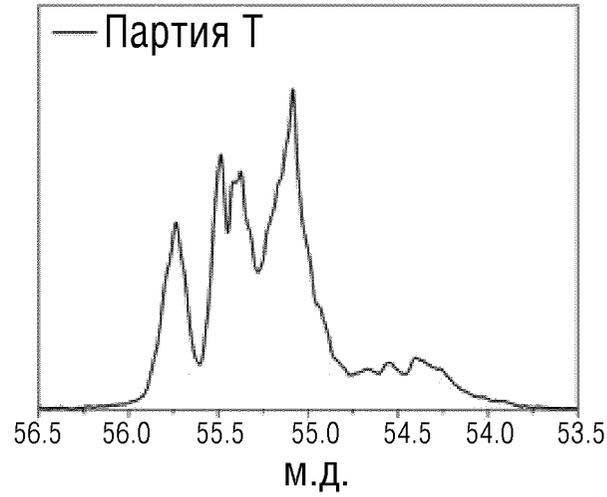
ФИГ.5T



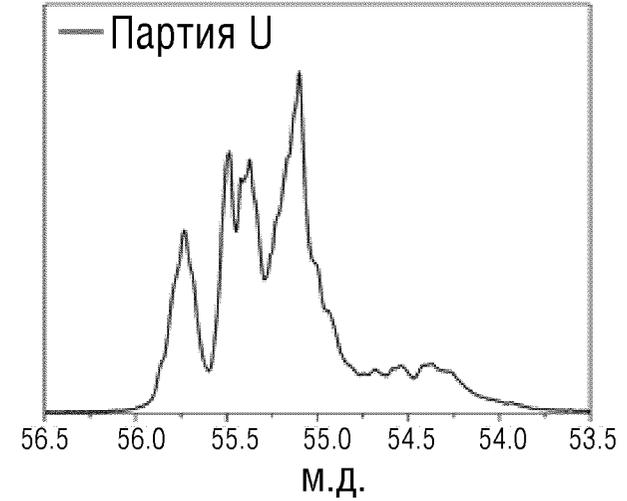
ФИГ.5U



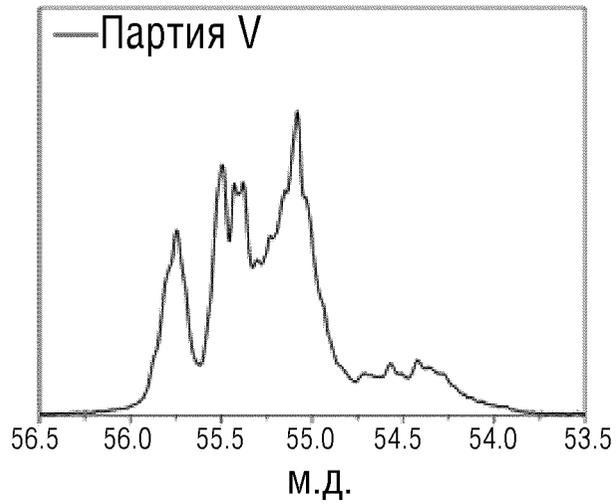
ФИГ.5V



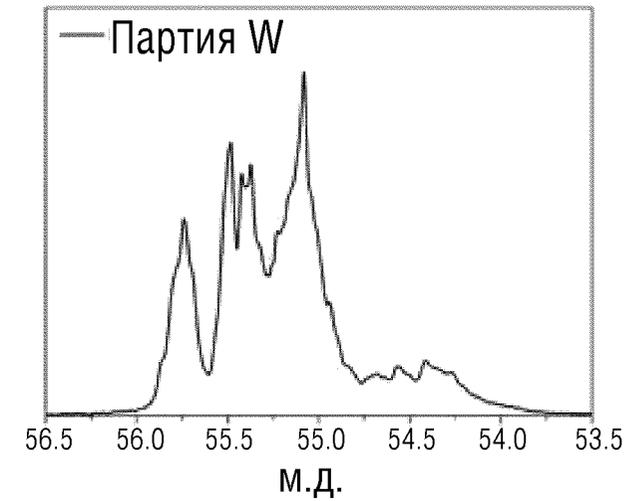
ФИГ.5W



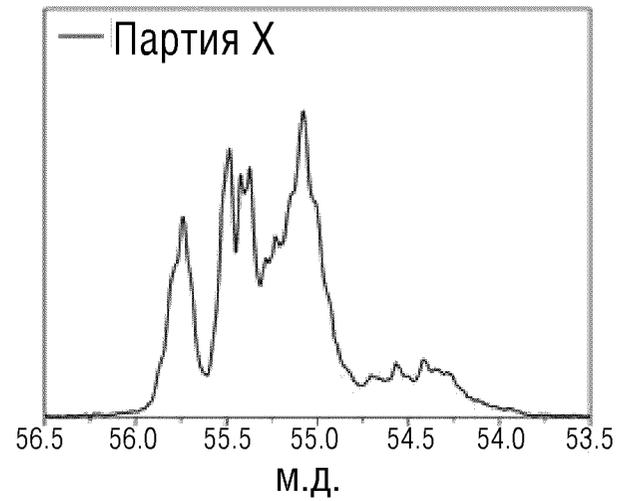
ФИГ.5X



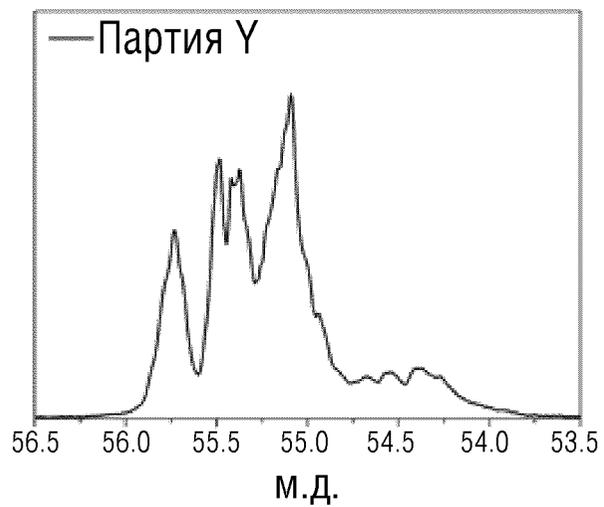
ФИГ.5Y



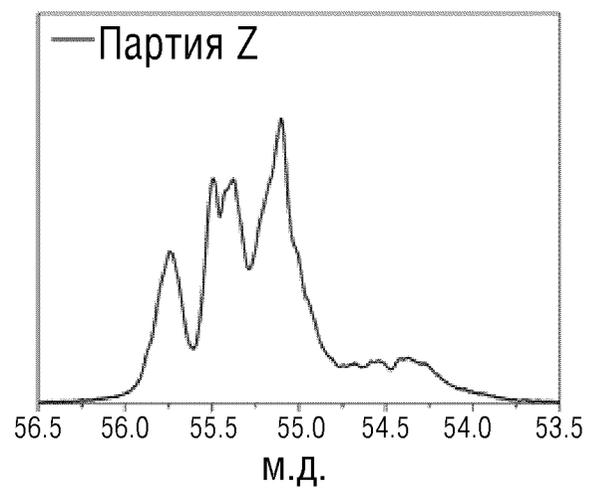
ФИГ.5Z



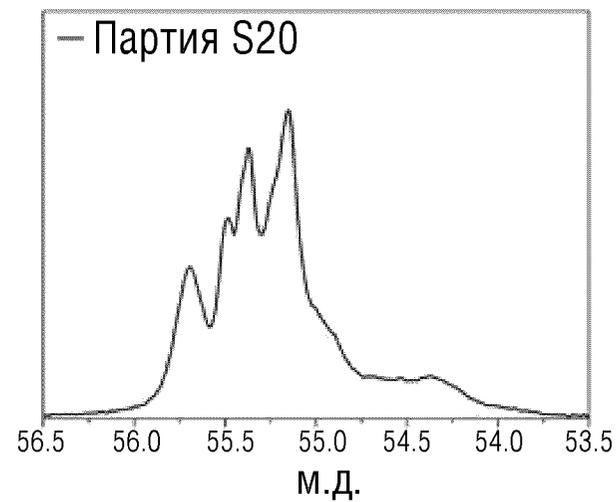
ФИГ.5АА



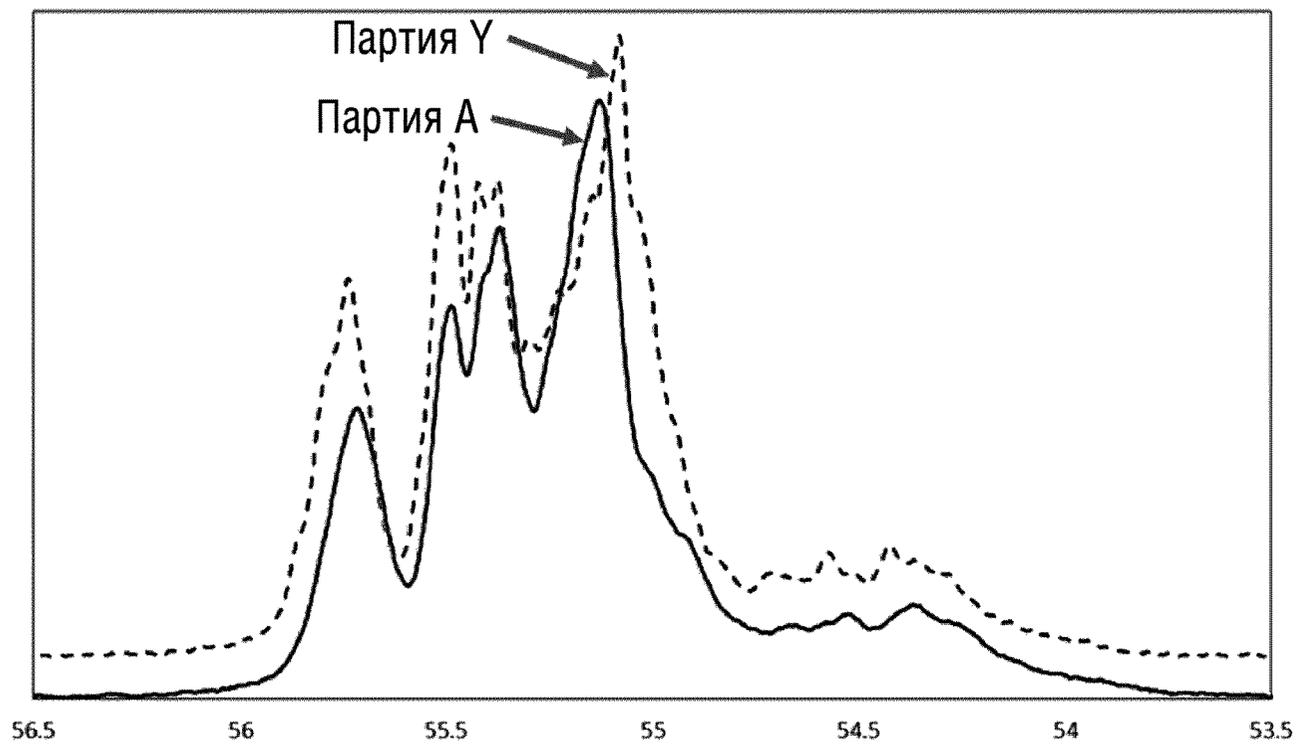
ФИГ.5ВВ



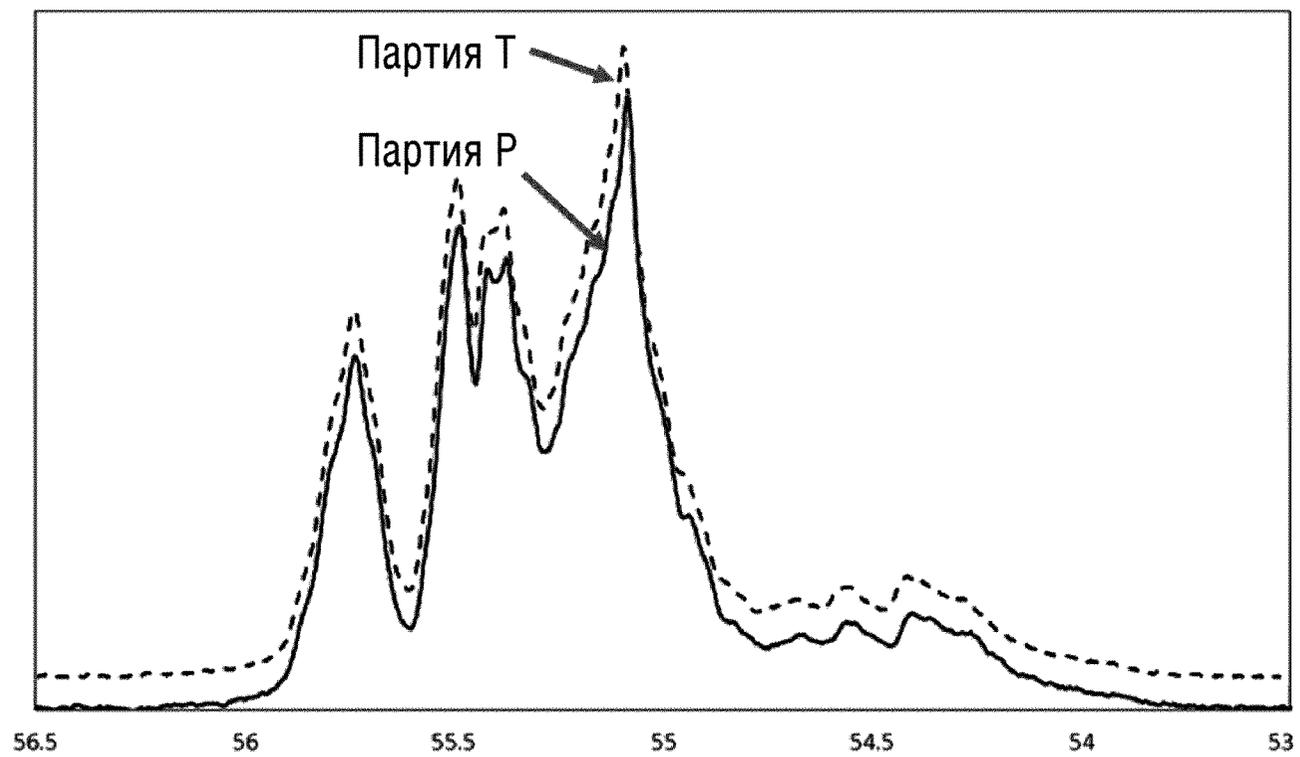
ФИГ.5СС



ФИГ.5DD

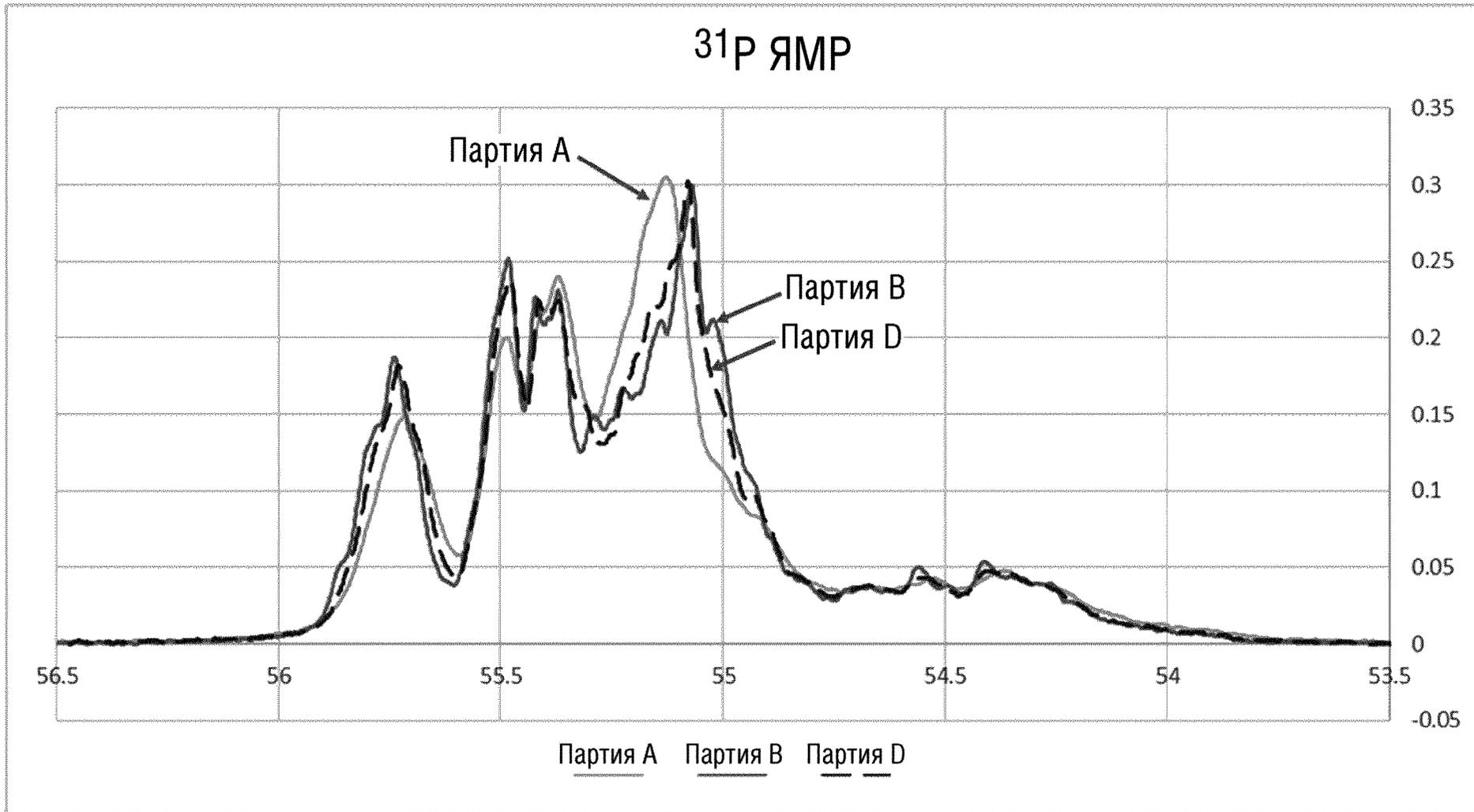


ФИГ.5ЕЕ

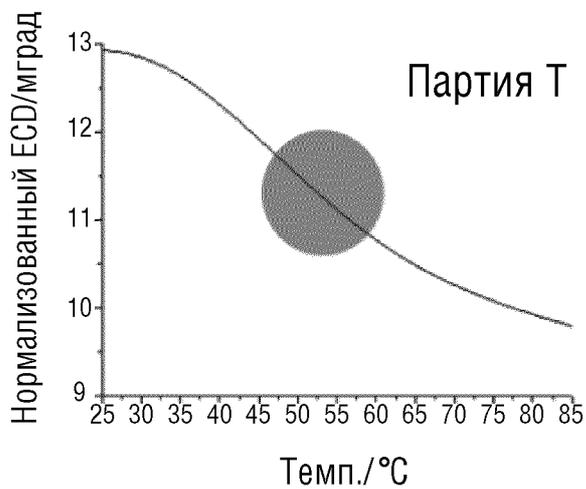
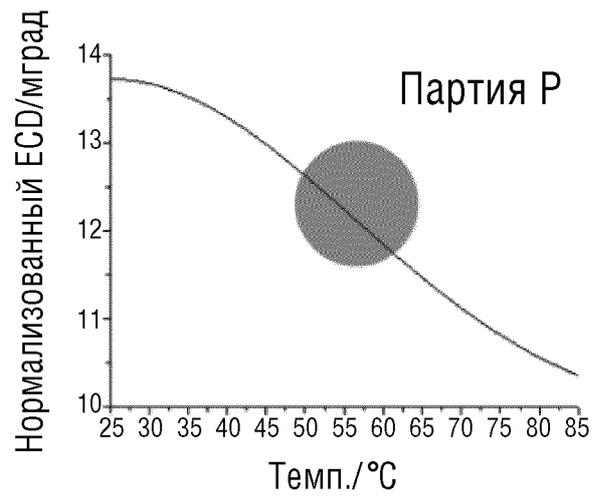
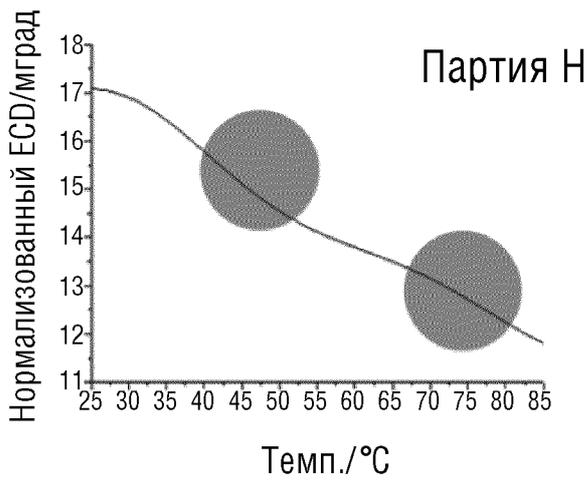
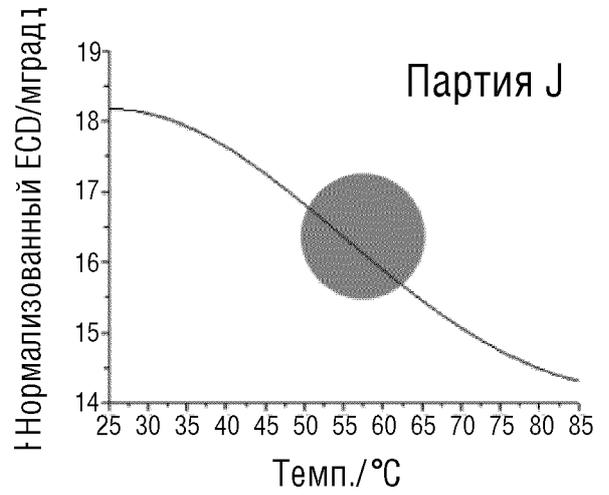
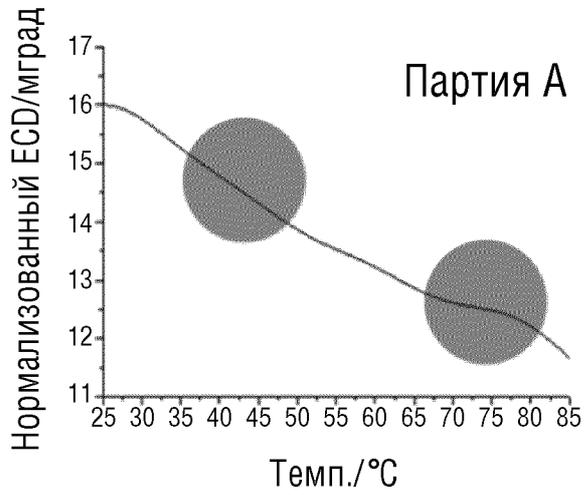


ФИГ.5FF

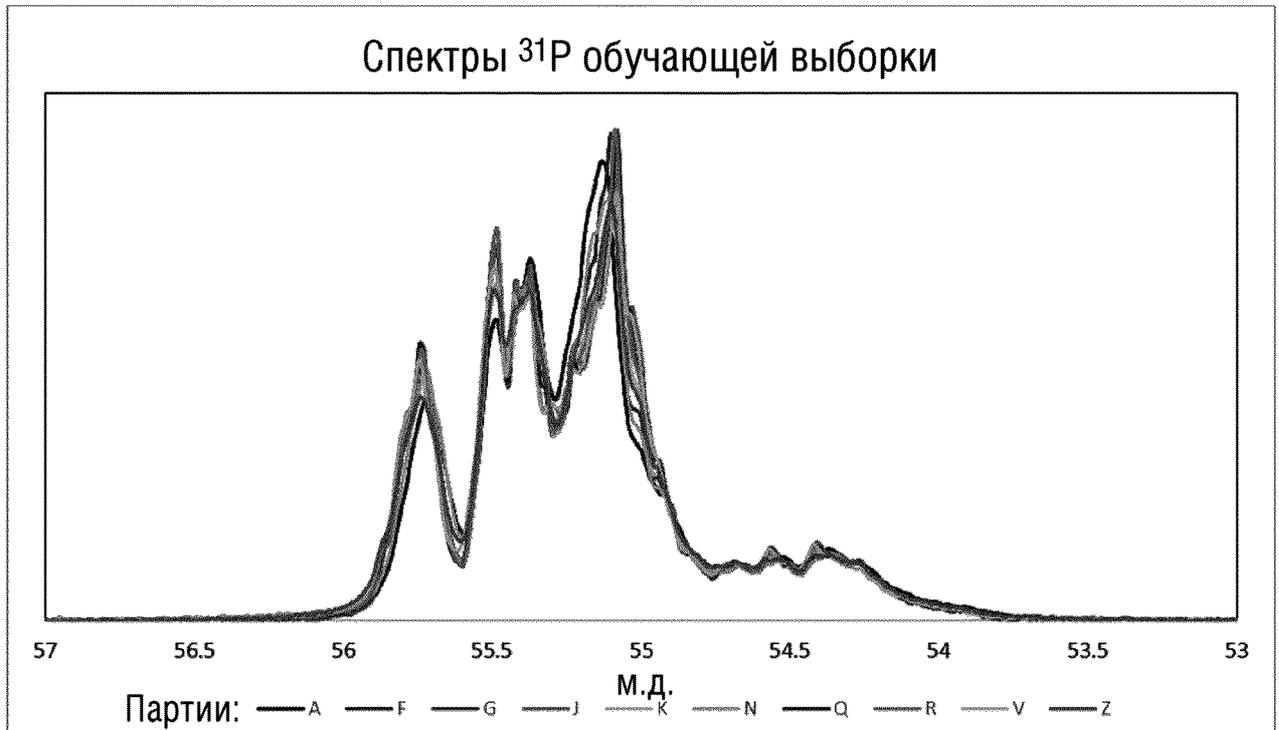
31P ЯМР



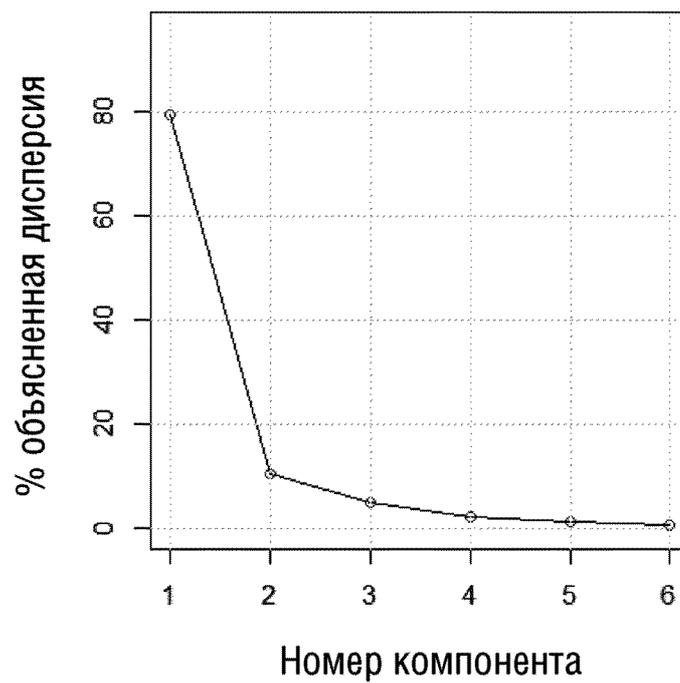
ФИГ.6



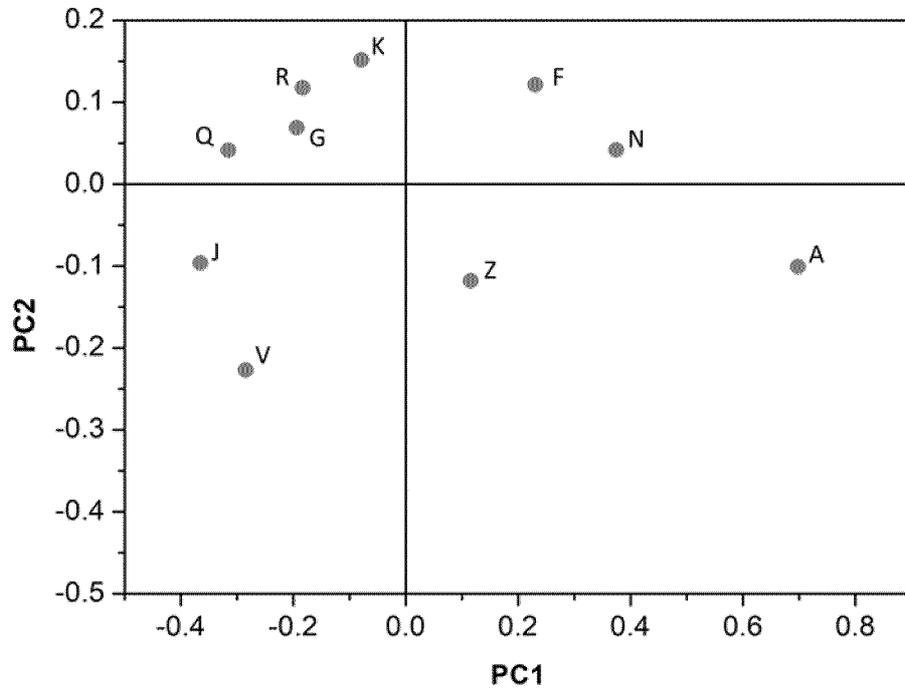
ФИГ.7А



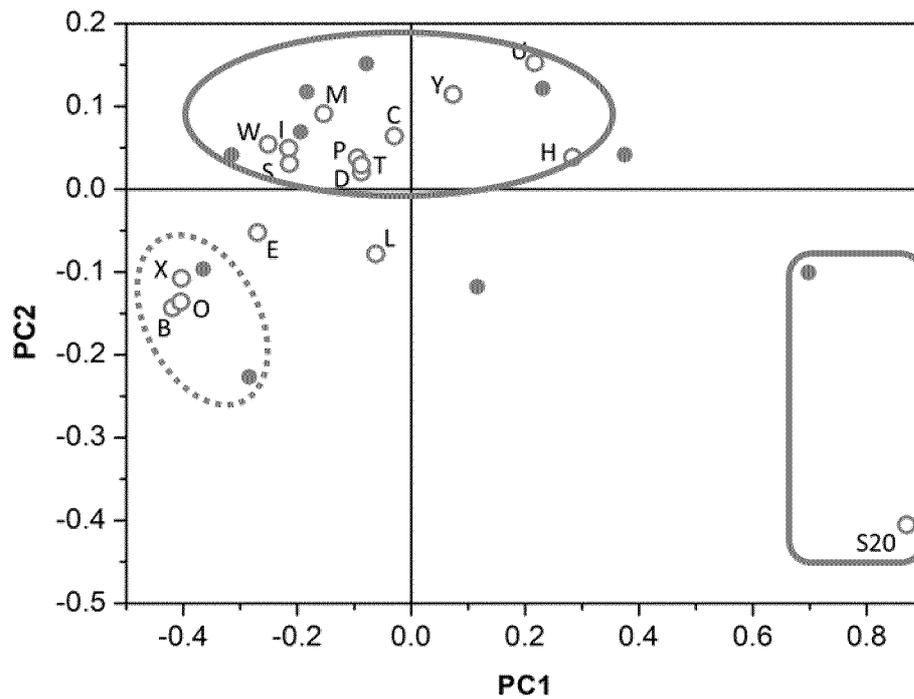
ФИГ.7В



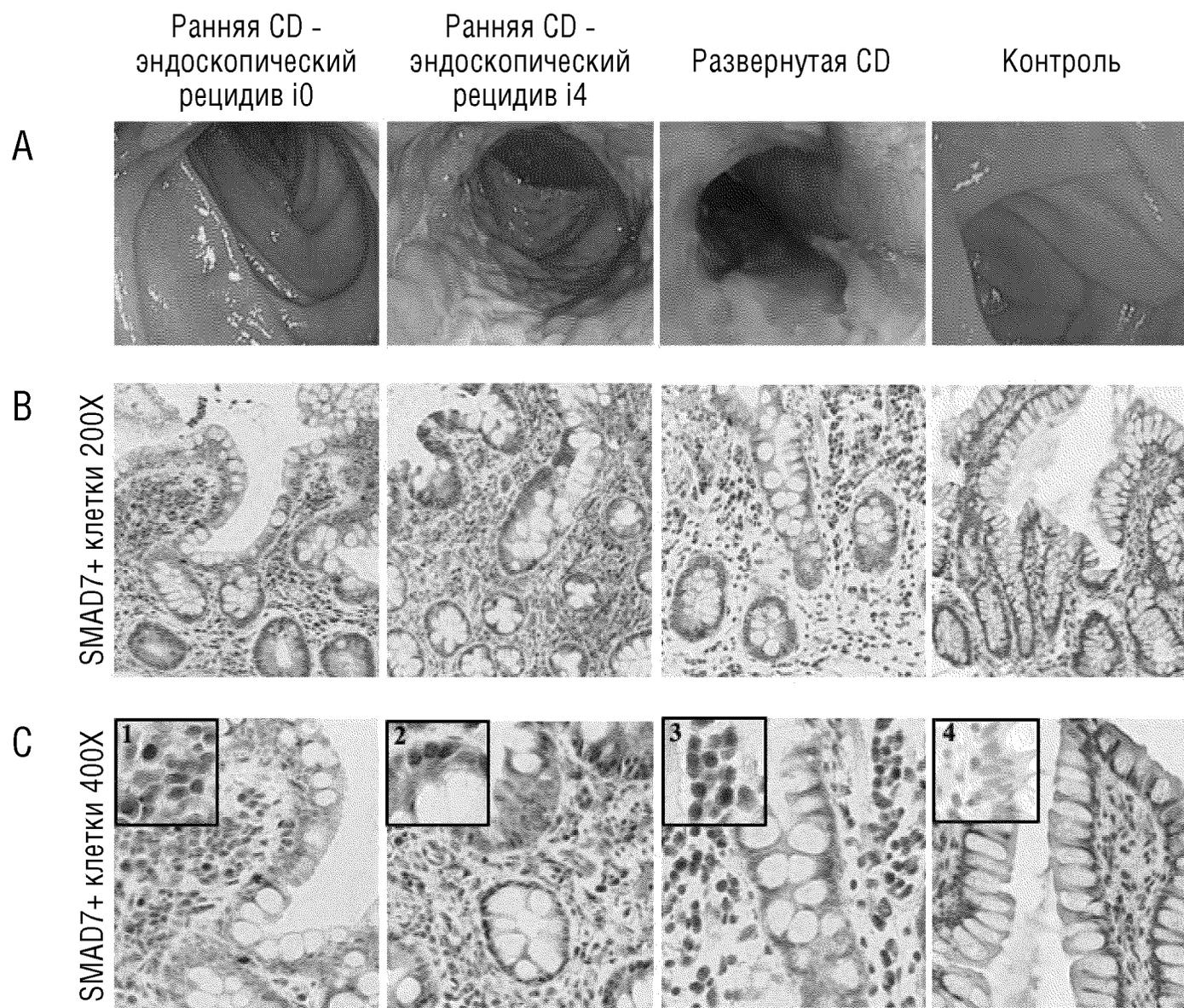
ФИГ.7С



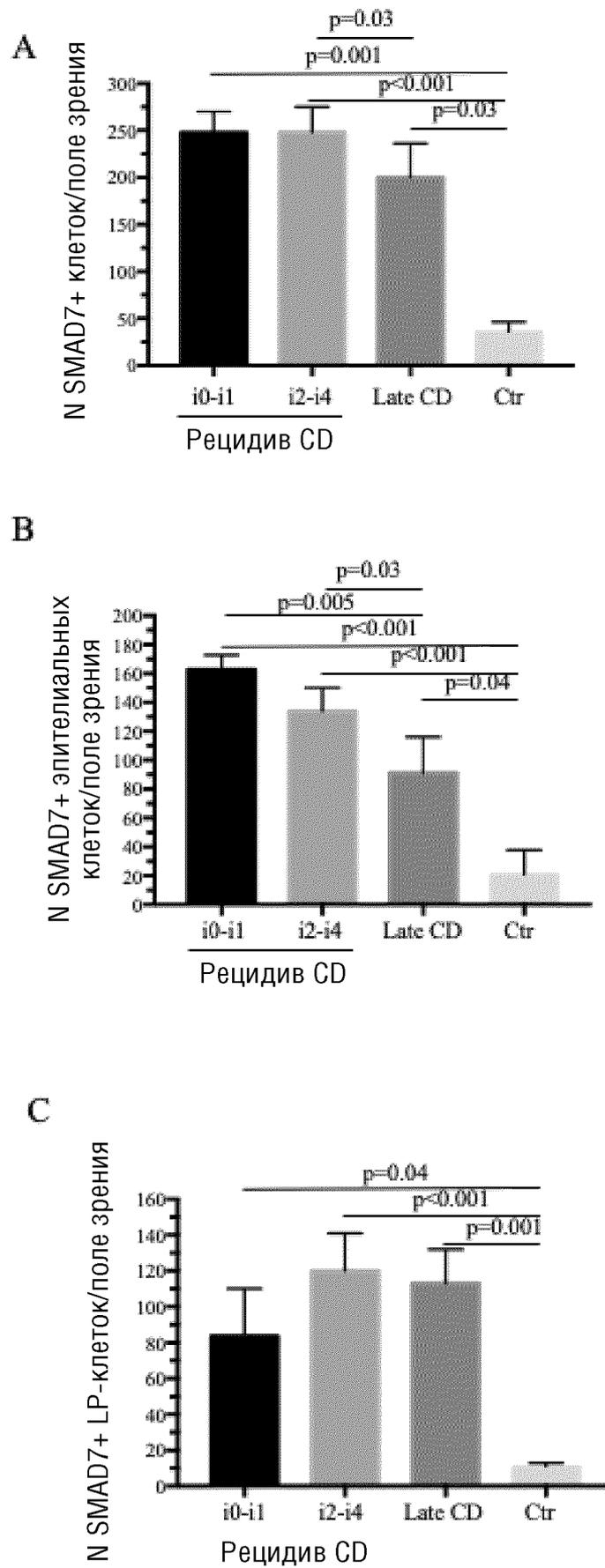
ФИГ.7D



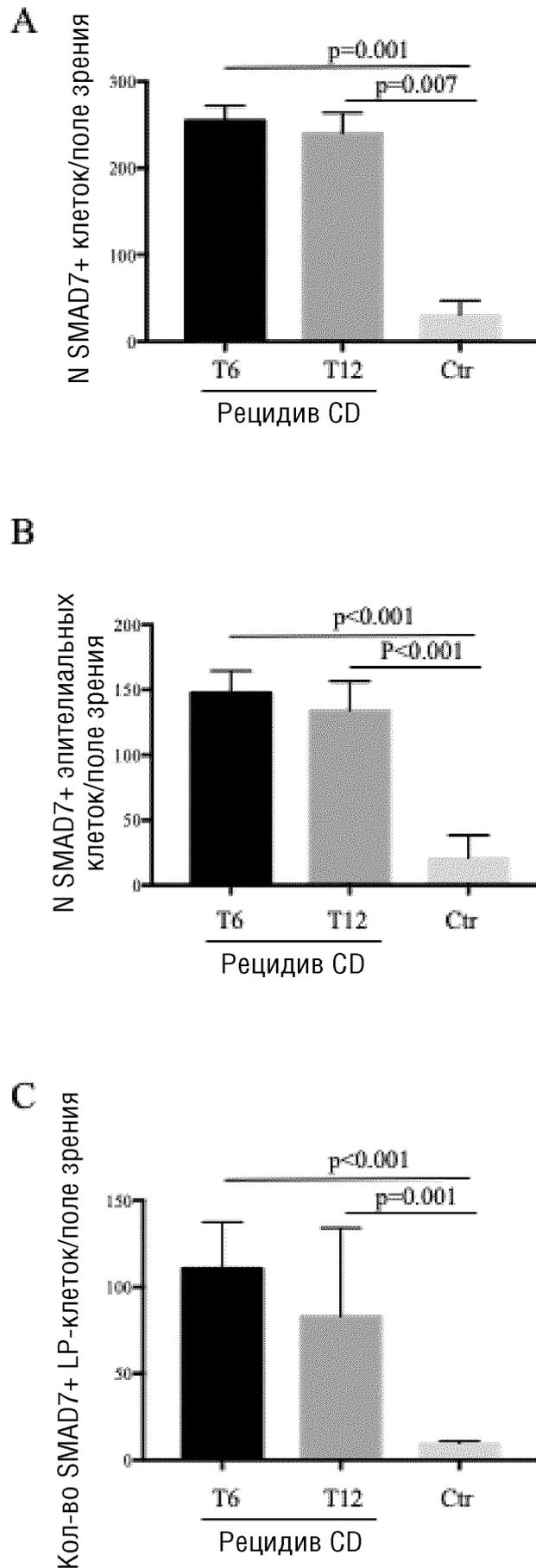
ФИГ.8



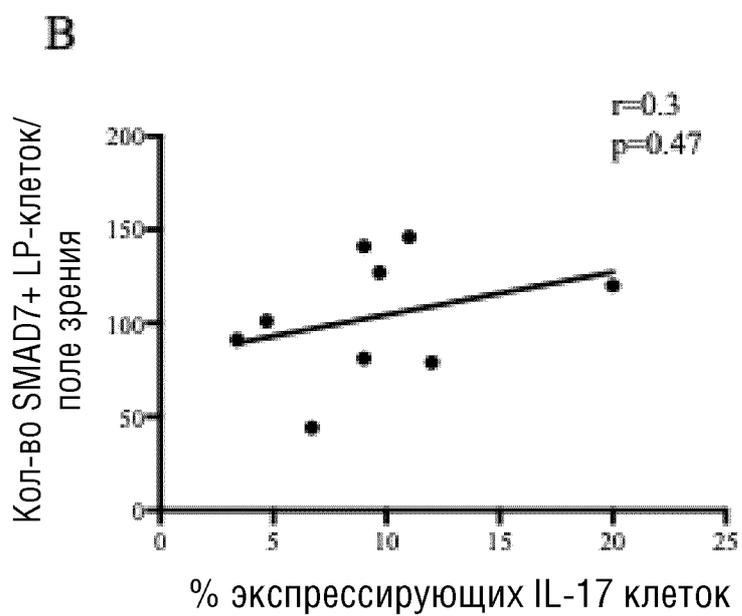
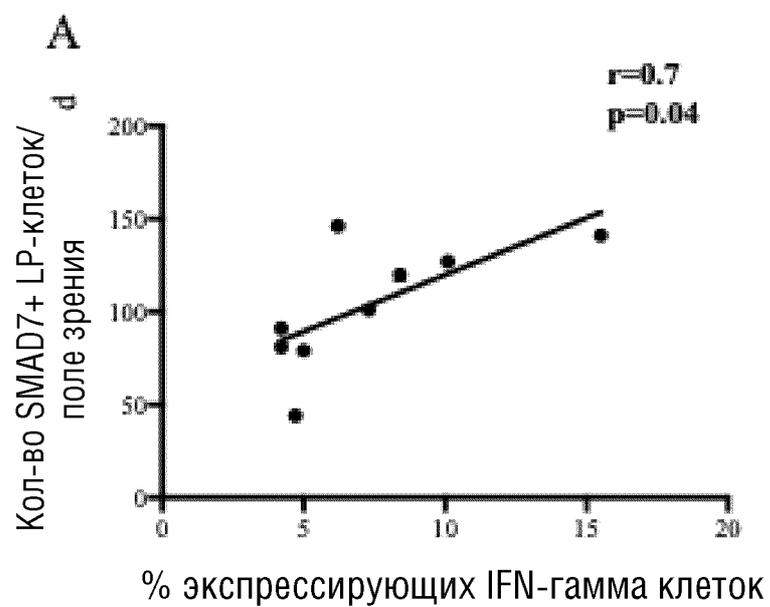
ФИГ.9



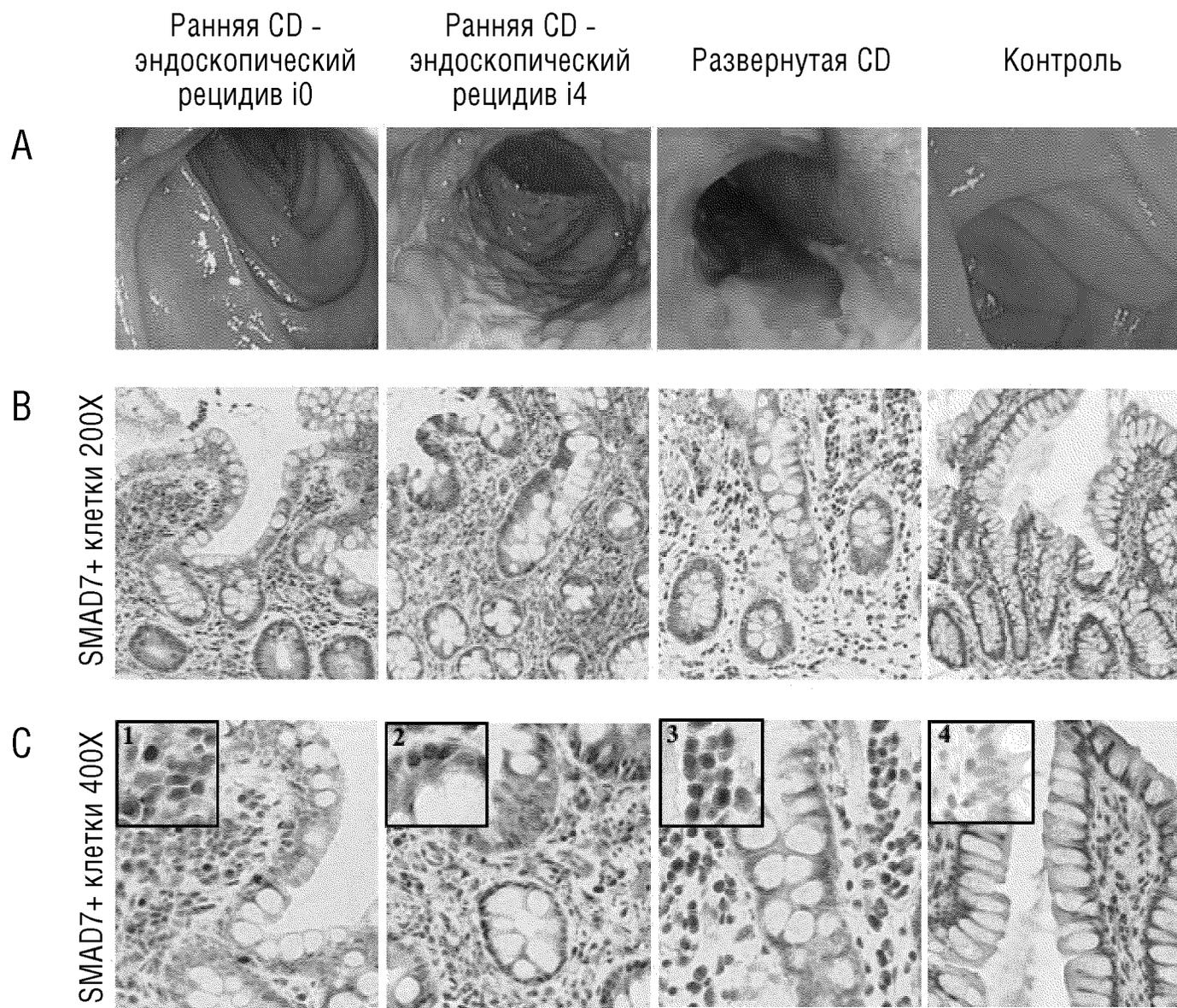
ФИГ.10



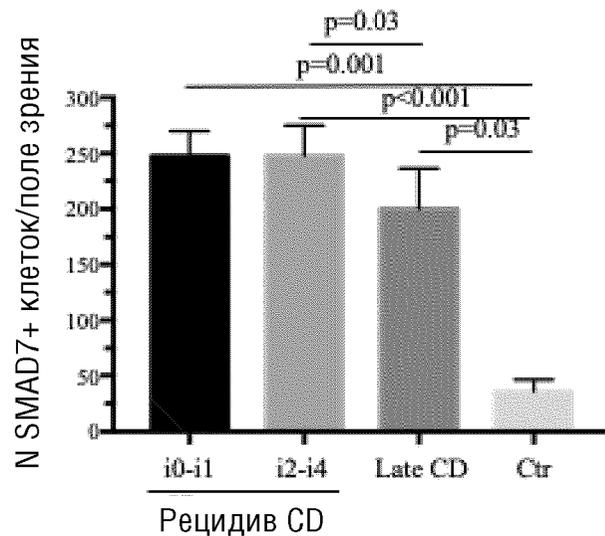
ФИГ.11



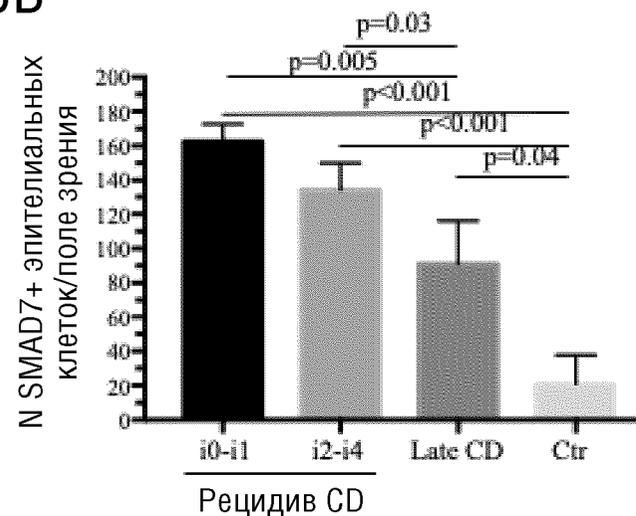
ФИГ.12



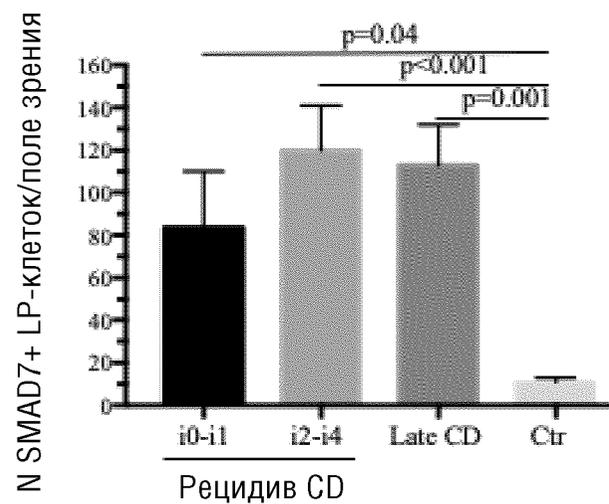
ФИГ.13А



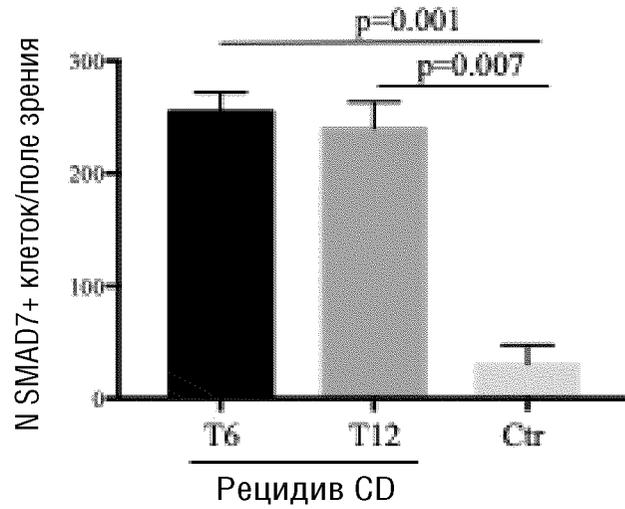
ФИГ.13В



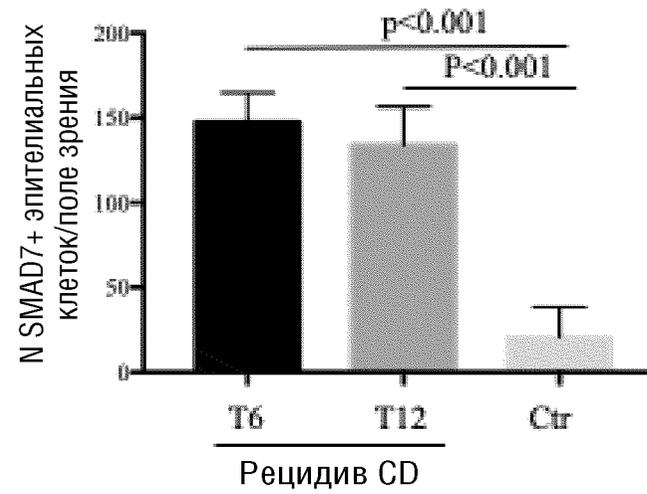
ФИГ.13С



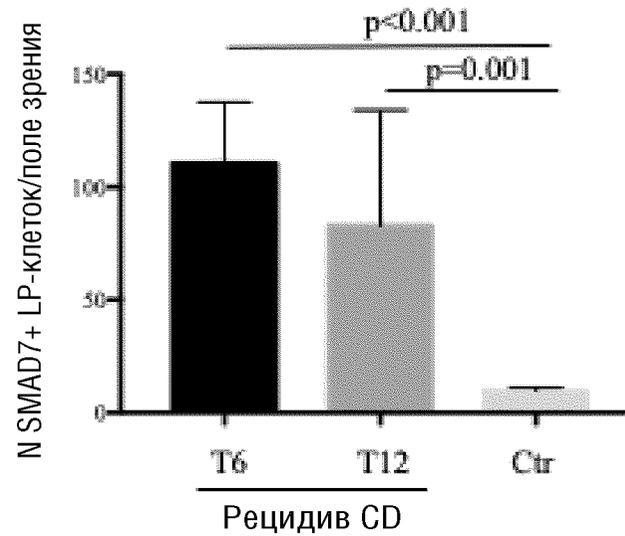
ФИГ.14А



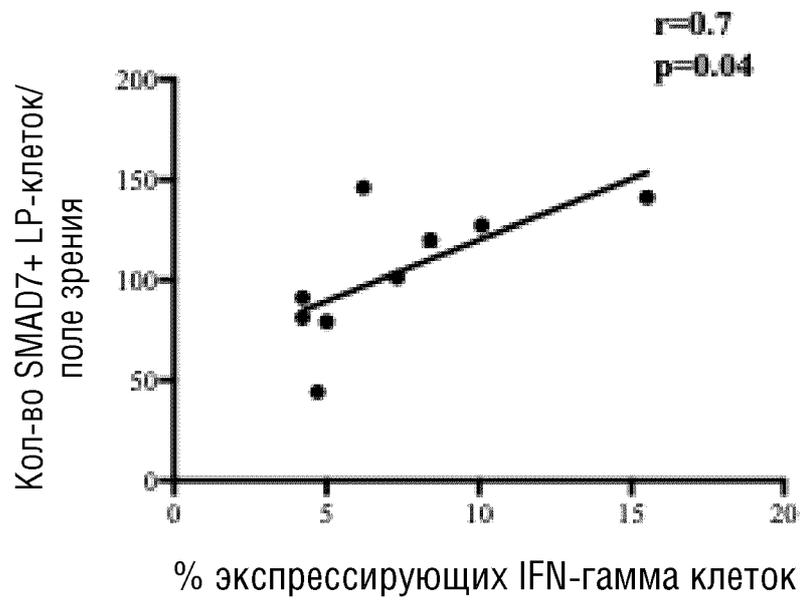
ФИГ.14В



ФИГ.14С



ФИГ.15А



ФИГ.15В

