

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 046703

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента

2024.04.11

(21) Номер заявки

202090859

(22) Дата подачи заявки

2018.10.05

(51) Int. Cl. *A61K 31/00* (2006.01)
A61K 31/416 (2006.01)
A61K 31/437 (2006.01)
A61K 31/4418 (2006.01)
A61K 31/4439 (2006.01)
A61K 31/496 (2006.01)
A61K 31/519 (2006.01)
A61K 31/53 (2006.01)
A61K 31/5377 (2006.01)
A61P 21/00 (2006.01)
G01N 33/15 (2006.01)

(54) ИНГИБИТОРЫ КИНАЗЫ P38 СНИЖАЮТ ЭКСПРЕССИЮ DUX4 И ПОСЛЕДУЮЩИХ ГЕНОВ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ FSHD

(31) 62/568,673; 62/568,754; 62/682,565;
62/682,563(32) 2017.10.05; 2017.10.05; 2018.06.08;
2018.06.08

(33) US

(43) 2021.11.25

(86) PCT/US2018/054642

(87) WO 2019/071147 2019.04.11

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ФУЛКРАМ ТЕРАПЬЮТИКС, ИНК.
(US)

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

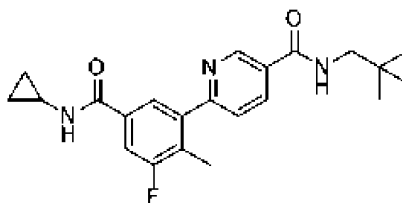
(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) WO-A1-2016114655
WO-A1-03068747
RABI TAWIL ET AL.: "Facioscapulohumeral
dystrophy: the path to consensus on pathophysiology",
SKELETAL MUSCLE, BIOMED CENTRAL LTD,
LONDON, UK, vol. 4, no. 1, 10 June 2014
(2014-06-10), page 12, XP021188739, ISSN:
2044-5040, DOI: 10.1186/2044-5040-4-12, the whole
document

WISSING ERIN R ET AL.: "P38[alpha]
MAPK underlies muscular dystrophy and myofiber
death through a Bax-dependent mechanism.",
HUMAN MOLECULAR GENETICS 15 OCT 2014,
vol. 23, no. 20, 15 October 2014 (2014-10-15),
pages 5452-5463, XP002787914, ISSN: 1460-2083,
the whole document

WO-A1-2017136480

(57) Настоящее изобретение относится к способу лечения плече-лопаточно-лицевой мышечной дистрофии (FSHD), включающему введение нуждающемуся в этом субъекту эффективного количества ингибитора киназы p38 или его фармацевтически приемлемой соли, где ингибитор киназы p38 характеризуется формулой (V').



(V')

B1

046703

046703 B1

Родственные заявки

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

Включение перечня последовательностей

Содержание текстового файла "FULC-02602WO_SeqList", созданного 5 октября 2018 г., и имеющего размер 3 Кб, полностью включено в настоящий документ посредством ссылки.

Область техники

Настоящее изобретение относится к способам ингибирования киназы p38 для снижения уровней экспрессии DUX4 и/или экспрессии последующих генов и белков и лечения заболеваний, ассоциированных с DUX4.

Уровень техники

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

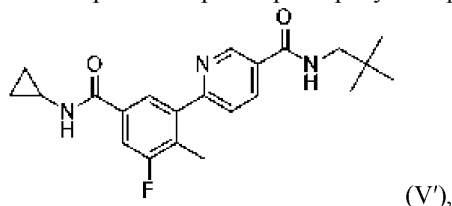
Плече-лопаточно-лицевая мышечная дистрофия (FSHD) представляет собой третью по распространенности форму мышечной дистрофии и поражает приблизительно 1 из 15 000 человек по всему миру. FSHD вызывают генетические мутации, которые приводят к эпигенетической дерепрессии гена DUX4, что делает указанное заболевание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

Генетические мутации, ассоциированные с FSHD, приводят к частичному разуплотнению структуры хроматина D4Z4 и, в результате, к отсутствию репрессии DUX4, транскрипционного фактора, кодируемого единицей D4Z4, в скелетных мышцах. FSHD1, составляющая приблизительно 95% описанных случаев FSHD, ассоциирована с делециями макросателлитных повторов D4Z4 в субтеломерной области хромосомы 4q35, где остается 1-10 повторов D4Z4 (описание приведено в источнике: Tawil et. al., 2014). FSHD2 вызывают мутации в гене содержащего гибкий шарнирный домен белка поддержания структуры хромосом 1 ("Structural Maintenance of Chromosomes Flexible Hinge Domain Containing", SMCHD1) на хромосоме 18 (описание приведено в источнике: van der Maarel et. al., 2007). Обе мутации, FSHD1 и FSHD2, приводят к утрате репрессии в массиве повторов D4Z4q35, что позволяет aberrантную транскрипцию в мышцах мРНК полноразмерной формы "двойного гомеобокса 4" DUX4 (DUX4-fl), которая кодирует транскрипционный фактор "двойной гомеобокс 4" (DUX4) (Tawil et. al., 2014). Изоформы РНК DUX4-fl, которые, как было обнаружено, ассоциированы с FSHD, варьируют только в 3' нетранслируемой области и не имеют идентифицированных функциональных различий.

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

Краткое описание изобретения

Согласно одному аспекту предложен способ лечения плече-лопаточно-лицевой мышечной дистрофии (FSHD), включающий введение нуждающемуся в этом субъекту эффективного количества ингибитора киназы p38, где указанный ингибитор киназы p38 характеризуется формулой (V):



или его фармацевтически приемлемой соли.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1А и 1В показана экспрессия РНК и белка DUX4 в пораженных FSHD мышечных трубочках. Фиг. 1А включает микрофотографии пораженных FSHD мышечных трубочек, окрашенных с применением антитела, которое связывает белок DUX4 и/или DAPI (для детекции ядер). Зрелые пораженные FSHD мышечные трубочки демонстрировали активную исчерченность в культуре (не показано) и экс-

прессировали белок DUX4 в дискретных наборах ядер, содержащихся в дифференцированной мышечной трубочке (фиг. 1А). На фиг. 1В приведен график, отражающий относительную экспрессию мРНК DUX4 в пораженных FSHD мышечных трубочках и мышечных трубочках от изогенного контроля дикого типа (здоровых).

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

На фиг. 3А-С показано снижение уровня мРНК MBD3L2 в пораженных FSHD мышечных трубочках, обработанных DUX4-нацеленными АСО. MBD3L2 нормировали по мРНК POLR2A по результатам измерений с применением кПЦР. На фиг. 3А приведен график, отражающий сгруппированные по планшетам данные контроля качества со сравнением экспрессии MBD3L2 в пораженных FSHD мышечных трубочках, обработанных контролем - ДМСО или 1 мкМ DUX4-нацеленных АСО, и нормальных здоровых изогенных мышечных трубочках дикого типа (WT). На фиг. 3В приведен график, отражающий дозозависимое снижение экспрессии мРНК MBD3L2 в пораженных FSHD мышечных трубочках, обработанных DUX4-нацеленным АСО (FTX-2) в разных разведениях. На фиг. 3С приведена статистика анализа на планшетах со сравнением сигнала MBD3L2 в пораженных FSHD мышечных трубочках, обработанных ДМСО или DUX4-нацеленными АСО, или мышечных трубочках дикого типа, обработанных ДМСО.

На фиг. 4А-Д приведены графики, отражающие уровни экспрессии мРНК MBD3L2 и мРНК MYOG в пораженных FSHD мышечных трубочках, обработанных заданными ингибиторами p38 α / β , по сравнению с обработкой контролем - ДМСО. Ингибиторы p38 α / β включали SB 239063 (фиг. 4А), VX-702 (фиг. 4В), памапимод (фиг. 4С) и TAK-715 (фиг. 4Д). Также приведены структуры ингибиторов.

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

На фиг. 6А-С приведены графики, отражающие уровни мРНК MAPK14 (фиг. 6А) и MBD3L2 (фиг. 6В и фиг. 6С) в пораженных FSHD мышечных трубочках, обработанных миРНК, нацеленными на p38a MAPK14 (siMAPK14 85 и siMAPK14 86; фиг. 6А и фиг. 6В) или обработанных Cas9/or РНК РНП для киназы p38a (MAPK 14 и DUX4 pLAM) (фиг. 6С), по сравнению с нанацеливающим контролем (NT CTRL). На фиг. 6С, для каждой обработки, приведенные в направлении слева направо результаты соответствуют MBD3L2 и MYOG, соответственно.

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

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

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

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

жающая регуляция которых происходит при обработке FTX-1821, в клетках дикого типа, обработанных контролем - основой ДМСО, в пораженных FSHD клетках, обработанных ДМСО, или пораженных FSHD клетках, обработанных FTX-1821.

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

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

На фиг. 13 приведена таблица с перечислением различных линий клеток, используемых в "клиническом испытании в сосуде" ("CSID"), отражающая разнообразие генотипов и включающая как первичные, так и immortalized линии, а также линии, полученные от пациентов с FSHD1 и FSHD2.

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

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

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

На фиг. 17 приведен график, отражающий отношение фосфорилированной/общей МС2 в трапециевидных мышцах мышей после обработки контролем - основой или ингибитором киназы p38, FTX-2865.

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

Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение основано отчасти на открытии того, что ингибирование киназы p38, например, p38- α , приводит к снижению экспрессии DUX4 и последующих генов, регулируемых DUX4. Соответственно, настоящее изобретение включает способы и композиции, связанные с применением ингибитора p38, например, p38- α (по отдельности или в комбинации с другим агентом) для снижения уровней экспрессии и/или активности DUX4 и/или любого из его последующих целевых генов, например, при лечении или предотвращении заболеваний, ассоциированных с aberrантной экспрессией DUX4, таких как FSHD, типа мышечной дистрофии.

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

Например, два распространенных вида мышечной дистрофии - мышечная дистрофия Дюшенна (DMD) и плече-лопаточно-лицевая дистрофия (FSHD) - считают уникальными заболеваниями с некоторыми общими характеристиками. Сходство DMD и FSHD включает то, что оба заболевания являются генетическими, а симптомы включают дистрофию мышечной ткани при мышечной слабости, ведущей к инвалидности (соответственно, и DMD, и FSHD относят к большой категории мышечных дистрофий, которые подразумевают дегенерацию мышц). Однако DMD и FSHD сильно различаются в отношении этиологии и диагностики заболевания (утрата дистрофина при DMD и экспрессия DUX4-миотоксина при FSHD). Например, при DMD мутации в гене DMD (известно более 2000 мутаций) приводят к дисфункции или отсутствию дистрофина. При FSHD заболевание обусловлено избыточной экспрессией гена DUX4 в мышечной ткани; это не связано с точечными мутациями в гене (белок DUX4 экспрессируется, если число повторов D4Z4 в гене DUX4 составляет от 1 до 8, или если утрачена репрессия в D4Z4 за счет

мутаций других механизмов сайленсинга). Другие различия включают то, что в FSHD вовлечены только скелетные мышцы, тогда как при DMD поражаются и скелетные мышцы, и сердечная мышца; диафрагма вовлечена в DMD, но не в FSHD; начало DMD, как правило, приходится на детский возраст, а начало FSHD - на взрослый и подростковый возраст; DMD свойственно начало с вовлечением двигательной функции, а FSHD - с вовлечением лица и проксимальной части предплечья/плеч. Другое важное различие заключается в том, что на стероиды есть ответ при DMD, но не при FSHD. Кроме того, одобренное лечение DMD (Экзондис-51 в США; Аталурен в ЕС) не оказывает никакого действия при FSHD. Наконец, DMD страдают только мужчины, тогда как FSHD в равной степени затрагивает оба пола.

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

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

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

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

DUX4 в настоящее время признан причиной патологии при FSHD, поскольку активация его целевых генов является главной молекулярной сигнатурой в мышцах, пораженных FSHD (Описание приведено в источнике: Tawil et al., 2014; Himeda et al., 2015).

Основные последующие целевые гены являются представителями семейств высокоомологичных генов, которые пространственно кластеризованы на хромосомах, в том числе семейств PRAMEF (преимущественно экспрессируются в меланоме), TRIM (содержащие трехчастный мотив), MBDL (подобный метил-СрG-связывающему белку), ZSCAN (содержащий домен с цинковыми пальцами и SCAN) и RFPL ("Ret Finger Protein-Like") (Geng et al., 2012; Yao et al., 2014; Shadle et al., 2017; Ehrlich and Lacey, 2012; Tawil et al., 2014; van der Maarel et al., 2007). Различить пораженные FSHD и контрольные скелетные мышцы можно с использованием ZSCAN4, LEUTX, PRAMEF2, TRIM43, MBD3L2, KHDC1L, RFPL2, CCNA1, SLC34A2, TPRX1, PRAMEF20, TRIM49, PRAMEF4, PRAME6, PRAMEF 15, ZNF280A и т.п. (см. описания, например, но не ограничиваясь перечисленными, в источниках: Yao et al., 2014; Shadle et al.,

2017; Ehrlich and Lacey, 2012).

Проводился скрининг аннотированных химических зондов на наличие модифицирующих заболевание низкомолекулярных целевых лекарственных средств, которые снижают экспрессию DUX4 в пораженных FSHD мышечных трубочках. Указанный мониторинг идентифицировал несколько химических скаффолдов, которые ингибируют митоген-активируемую протеинкиназу p38 альфа (MAPK14, или p38- α). Как описано в приведенных примерах, было показано, что нокадаун гена MAPK14 с применением технологии малых интерферирующих РНК (миРНК) или опосредованного CRISPR редактирования генома со специфическими гидовыми РНК (гРНК), которые селективно нацелены на альфа-изоформу киназы p38, также снижает экспрессию DUX4 и связанных с DUX4 последующих генов в пораженных FSHD мышечных трубочках. Было также обнаружено, что селективные ингибиторы киназ p38 α и β специфическим образом снижали уровни DUX4 и последующих генов в пораженных FSHD мышечных трубочках, таким образом оказывая воздействие на патофизиологическое ядро болезненного процесса при FSHD (примеры данных приведены в настоящем документе). В ходе тех же экспериментов обнаружено, что ингибиторы киназ p38 α и β не влияют на экспрессию миогенина или других миогенных факторов, а также на пролиферацию миобластов или дифференцировку миобластов, на что указывает миогенное слияние в пораженных FSHD мышечных трубочках. Указанные низкомолекулярные ингибиторы киназы p38 снижают экспрессию DUX4 и связанных с ним последующих генов, влияя таким образом на патофизиологию болезненного процесса при FSHD, в том числе снижая уровень апоптотической смерти клеток. Опосредованное p38 снижение уровня DUX4 предположительно влияет на последующие воспалительная жировая инфильтрация и фиброзные процессы при FSHD.

Представители семейства p38 MAPK, состоящие из α , β , γ и δ изоформ, закодированы отдельными генами, которые играют важнейшую роль в клеточных ответах, необходимых для адаптации к стрессу и выживанию (описание приведено в источнике: Whitmarsh 2010; Martin et al., 2014; Krementsov et al., 2013). При многих воспалительных заболеваниях, в том числе заболеваниях сердечно-сосудистой системы и других хронических заболеваниях, те же самые стресс-индуцированные сигналы MAPK p38 могут запускать неадекватные адаптивные ответы, которые усугубляют, а не облегчают заболевание (описание приведено в источнике: Whitmarsh 2010; Martin et al., 2014). Так, в скелетных мышцах различные клеточные стрессы, в том числе хронические физические нагрузки, воздействие инсулина и измененные эндокринные состояния, дифференцировка миобластов в миоциты, активные формы кислорода, а также апоптоз - все эти стрессы, как было показано, индуцируют путь киназы p38 (Keren, et al., 2006; Zarubin et al., 2006). Фактически, путь киназы p38 может быть активирован рядом внешних стимулов, в том числе провоспалительными цитокинами и клеточным стрессом, что приводит к активации MAPK-киназ с двойной специфичностью MKK3 и MKK6. Активация MKK3 и MKK6, которые, в свою очередь, фосфорилируют p38 в петле активации, запускает последующие события фосфорилирования. Они включают фосфорилирование HSP27, MAPKAPK2 (MK2) и различных транскрипционных факторов, что заканчивается транскрипционными изменениями в ядре. Было идентифицировано умеренное число p38-регулируемых транскриптов и значительное число последующих эффекторных киназ p38 (описание приведено в источнике: Cuenda et al., 2007 и Kyriakis et al., 2001, Viemann et al. 2004).

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

Известно, что MAPK p38 α играет критически важные роли в биологии скелетных мышц, в частности, в подавлении дифференцировки пролиферирующих миобластов с последующим слиянием с образованием содержащих много ядер мышечных трубочек. Лечение пациентов с мышечной дистрофией, у которых постоянно идут процессы дегенерации и регенерации, ингибиторами p38 α , не является тривиальным. Полный нокадаун (КО) p38 α летален на стадии эмбриона. "Спасение" экспрессии у эмбрионов обеспечивает выживание детенышей в течение нескольких дней после рождения и позволяет выделить спутниковые клетки для изучения миогенных предшественников с отсутствующей p38 α . В миоблестах, в которых полностью отсутствует p38 α , значимо ниже экспрессия критически важных для дифференцировки генов и наблюдаются тяжелые дефекты слияния. Гистологическое исследование у P2-детенышей выявляет значимо повышенные уровни циклирующих спутниковых клеток и распределение волокон со сдвигом влево (Perdiguer et al., 2007). Важно отметить, что при КО p38 α в зрелых мышцах (Cre, управляемая промотором Myl1) не наблюдается дефектов в точках времени раннего периода, где у мышей, дефицитных по p38 α , в возрасте 6 месяцев наблюдается значимо более высокий уровень регенерации и волокон типа I, а также менее выраженное распределение волокон по сравнению с контролями (Wissing et al., 2014). Указанные данные предполагают, что ингибирование p38 α запускает регенерацию скелет-

ных мышц при заболеваниях, связанных с недостаточностью регенерации, наряду с FSHD, за счет механизма, независимого от регуляции экспрессии DUX4.

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

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

Определения

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

В настоящем описании термин "и/или" используют в качестве "и" или "или", если не указано иное.

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

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

"Введение" относится в настоящем документе к введению агента или композиции субъекту или приведение в контакт агента или композиции с клеткой и/или тканью.

"Лечить" или "лечение" заболевания включает: (1) предотвращение указанного заболевания, т.е. предотвращение развития клинических симптомов заболевания у млекопитающего, которое может быть подвержено или предрасположено к заболеванию, но еще не испытывает симптомов заболевания или они не проявляются; (2) ингибирование указанного заболевания, т.е. остановку или снижение развития заболевания или его клинических симптомов; или (3) облегчение заболевания, т.е. обеспечение регрессии заболевания или его клинических симптомов.

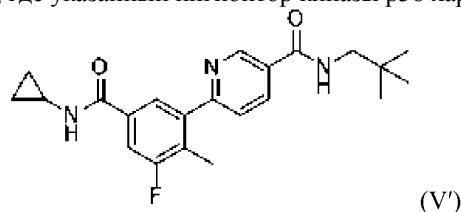
"Терапевтически эффективное количество" означает количество соединения, которое при введении млекопитающему для лечения заболевания является достаточным для реализации такого лечения указанного заболевания. "Терапевтически эффективное количество" варьирует в зависимости от соединения, заболевания и его тяжести, а также возраста, массы тела и т.п., подлежащего лечению млекопитающего.

"Фармацевтически приемлемая соль" представляет собой соль, сохраняющую биологическую эффективность свободных кислот и оснований указанного соединения, и не являющуюся биологически или по иным причинам нежелательной. Соединение согласно настоящему изобретению может содержать подходящую кислотную, подходящую основную или обе функциональные группы, и, соответственно, вступать в реакцию с любыми из ряда неорганических или органических оснований, а также неорганических или органических кислот с образованием фармацевтически приемлемой соли. Примеры фармацевтически приемлемых солей включают соли, полученные с использованием реакции соединений согласно настоящему изобретению с минеральной или органической кислотой или неорганическим основанием. Например, соли согласно настоящему изобретению включают, не ограничиваясь перечисленными: сульфаты, пиросульфаты, бисульфаты, сульфиты, бисульфиты, фосфаты, моногидрофосфаты, дигидрофосфаты, метафосфаты, пирофосфаты, хлориды, бромиды, йодиды, ацетаты, пропионаты, деканоаты, каприла-

ты, акрилаты, форматы, изобутираты, капроаты, гептаноаты, пропиолаты, оксалаты, малонаты, сукцилаты, субераты, себацаты, fumarаты, малеаты, бутин-1,4-диоаты, гексин-1,6-диоаты, бензоаты, хлорбензоаты, метилбензоаты, динитробензоаты, гидроксibenзоаты, метоксибензоаты, фталаты, сульфонаты, хиленсульфонаты, фенилацетаты, фенилпропионаты, фенилбутираты, цитраты, лактаты, угидроксибутираты, гликоляты, тартраты, метансульфонаты, пропансульфонаты, нафталин-1-сульфонаты, нафталин-2-сульфонаты и манделаты. Например, соли согласно настоящему изобретению включают, не ограничиваясь перечисленными: ацетат, бензенсульфонат, бензоат, бикарбонат, бисульфат, битартрат, борат, бромид, кальция эдетат, камсилат, карбонат, хлорид, клавуланат, цитрат, дигидрохлорид, эдетат, эдисилат, эстолат, эсилат, фумарат, глюцептат, глюконат, глутамат, гликолиларсанилат, гексилрезорцинат, гидрабамин, гидробромид, гидрохлорид, гидроксинафтоат, йодид, изетионат, лактат, лактобионат, лаурат, малат, малеат, манделат, мезилат, метилбромид, метилнитрат, метилсульфат, однозамещенный калия малеат, мукат, напсилат, нитрат, н-метилглюкамин, оксалат, памоат (эмбонат), пальмитат, пантотенат, фосфат/дифосфат, полигалактуронат, соли калия, салицилат, соли натрия, стеарат, субацетат, сукцинат, таннат, тартрат, теоклат, тозилат, триэтиодид, триметиламмоний и валерат. Например, соли согласно настоящему изобретению включают, не ограничиваясь перечисленными: соли соляной, серной, фосфорной, дифосфорной, бромистоводородной и азотной или соли органических кислот, таких как муравьиная, лимонная, яблочная, малеиновая, фумаровая, винная, янтарная, уксусная, молочная, метансульфоновая, п-толуолсульфоновая, 2-гидроксиэтилсульфоновая, салициловая и стеариновая. Аналогичным образом, фармацевтически приемлемые катионы включают, не ограничиваясь перечисленными, катионы натрия, калия, кальция, алюминия, лития и аммония. Например, соли согласно настоящему изобретению включают, не ограничиваясь перечисленными: соли щелочных металлов: натриевую соль, калиевую соль и т.п.; соль щелочно-земельного металла: кальциевую соль, магниевую соль, бариевую соль и т.п.; алюминиевую соль и т.п. Подходящими примерами соли с органическим основанием, например, являются соли с триметиламином, триэтиламином, пиридином, пиколином, 2,6-лютидином, этаноламином, диэтаноламином, триэтаноламином, циклогексиламином, дициклогексиламином, N,N'-дибензилэтилендиамином и т.п. Подходящими примерами соли с неорганической кислотой, например, являются соли с соляной кислотой, бромистоводородной кислотой, азотной кислотой, серной кислотой, фосфорной кислотой и т.п. Подходящими примерами соли с органической кислотой, например, являются соли с муравьиной кислотой, уксусной кислотой, трифторуксусной кислотой, фталевой кислотой, фумаровой кислотой, щавелевой кислотой, винной кислотой, малеиновой кислотой, лимонной кислотой, янтарной кислотой, яблочной кислотой, метансульфоновой кислотой, бензенсульфоновой кислотой, п-толуолсульфоновой кислотой и т.п. Подходящими примерами соли с основной аминокислотой, например, являются соли с альгиномом, лизином, орнитином и т.п. Подходящими примерами соли с кислотной аминокислотой, например, являются соли с аспарагиновой кислотой, глутаминовой кислотой и т.п.

Способы применения

Согласно варианту реализации изобретения предложен способ лечения плече-лопаточно-лицевой мышечной дистрофии (FSHD), включающий введение нуждающемуся в этом субъекту эффективного количества ингибитора киназы p38, где указанный ингибитор киназы p38 характеризуется формулой (V):



или его фармацевтически приемлемой соли.

Согласно варианту реализации изобретения указанное соединение формулы V' или его фармацевтически приемлемую соль вводят в дозе 7,5 мг или 15 мг; и где необязательно:

(a) указанное соединение формулы V' или его фармацевтически приемлемую соль вводят в дозе 7,5 мг,

(b) указанное соединение формулы V' или его фармацевтически приемлемую соль вводят в дозе 15 мг,

или

(c) указанное соединение формулы V' или его фармацевтически приемлемую соль вводят два раза в сутки.

Согласно варианту реализации изобретения введение указанного ингибитора киназы p38 снижает уровни экспрессии полипептида DUX4 и/или полипептида, кодируемого геном DUX4, в мышечных клетках указанного субъекта.

Согласно варианту реализации изобретения последующий относительно DUX4 ген выбран из группы, состоящей из: ZSCAN4, LEUTX, PRAMEF2, TRIM43, MBD3L2, KHDC1L, RFPL2, CCNA1, SLC34A2, TPRX1, PRAMEF20, TRIM49, PRAMEF4, PRAME6, PRAMEF15 и ZNF280A.

Согласно варианту реализации изобретения указанные мышечные клетки:

(a) являются терминально дифференцированными мышечными клетками,

(b) содержат разрегулированный массив D4Z4 на хромосоме 4q35, или

(с) содержат по меньшей мере один неделетированный аллель 4qA.

Согласно варианту реализации изобретения указанная плече-лопаточно-лицевая мышечная дистрофия представляет собой

(а) FSHD типа 1 (FSHD1), необязательно где указанные мышечные клетки содержат делецию одного или более макросателлитных повторов D4Z4 в субтеломерной области хромосомы 4q35, дополнительно необязательно менее 11 макросателлитных повторов D4Z4 в субтеломерной области хромосомы 4q35, или

(b) FSHD типа 2 (FSHD2), необязательно где указанные мышечные клетки содержат одну или более мутаций в гене содержащего гибкий шарнирный домен белка поддержания структуры хромосом 1 (SMCHD1).

Согласно варианту реализации изобретения указанное введение вызывает уменьшение мышечной дегенерации у субъекта или снижение апоптоза мышечных клеток у субъекта. Согласно одному варианту реализации указанные мышечные клетки являются терминально дифференцированными.

Согласно варианту реализации изобретения указанное соединение или его фармацевтически приемлемую соль вводят указанному субъекту парентерально, перорально или путем ингаляции.

Согласно некоторым вариантам реализации указанное введение может быть скомбинировано с клиническим ведением, включающим физическую терапию, аэробные упражнения, респираторную терапию, ортопедические вмешательства.

Согласно некоторым вариантам реализации указанное введение включает введение ингибитора киназы p38 с другим фармацевтическим агентом для лечения FSHD.

Согласно некоторым вариантам реализации указанное расстройство ассоциировано с экспрессией гена DUX4, и указанная экспрессия гена DUX4 может быть обусловлена наличием у субъекта менее 10 повторов D4Z4 в субтеломерной области хромосомы 4q35. Согласно некоторым вариантам реализации указанные клетки могут включать делецию одного или более макросателлитных повторов D4Z4 в субтеломерной области хромосомы 4q35. Согласно другим вариантам реализации указанные клетки могут включать менее 7 макросателлитных повторов D4Z4 в субтеломерной области хромосомы 4q35.

Согласно некоторым вариантам реализации указанные клетки могут включать разрегулированный массив D4Z4 на хромосоме 4q35 перед введением ингибитора киназы p38. Согласно одному варианту реализации указанные клетки могут включать разрегулированный массив D4Z4, включающий менее 11 единиц повтора. Согласно некоторым вариантам реализации указанный разрегулированный массив D4Z4 может включать менее 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, или 2 единиц повтора.

Согласно некоторым вариантам реализации указанные клетки представляют собой мышечные клетки, и указанные клетки могут включать разрегулированный массив D4Z4 на хромосоме 4q35 перед введением ингибитора киназы p38. Согласно одному варианту реализации указанные мышечные клетки могут включать разрегулированный массив D4Z4, включающий менее 11 единиц повтора. Согласно некоторым вариантам реализации указанный разрегулированный массив D4Z4 может включать менее 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, или 2 единиц повтора.

Согласно некоторым вариантам реализации указанное расстройство представляет собой FSHD. FSHD может включать что-либо одно или более из FSHD1 и FSHD2. Согласно одному варианту реализации указанное расстройство представляет собой FSHD1. Согласно другому варианту реализации указанное расстройство представляет собой FSHD2. Согласно одному варианту реализации указанное расстройство представляет собой FSHD1 и FSHD2.

Фармацевтические композиции

Настоящим изобретением охвачены фармацевтические композиции, содержащие соединение согласно настоящему изобретению и фармацевтические вспомогательные вещества, а также другие стандартные фармацевтически неактивные агенты. Любое инертное вспомогательное вещество, обычно используемое в качестве носителя или разбавителя, может быть использовано в композициях согласно настоящему изобретению, например, сахара, многоатомные спирты, растворимые полимеры, соли и липиды. Подходящие для применения сахара и многоатомные спирты включают, без ограничения, лактозу, сахарозу, маннит и сорбит. Иллюстративными примерами подходящих для применения растворимых полимеров являются полиоксидэтилен, полоксамеры, поливинилпирролидон и декстран. Подходящие соли включают, без ограничения, хлорид натрия, хлорид магния и хлорид кальция. Подходящие для применения липиды включают, без ограничения, жирные кислоты, сложные эфиры жирных кислот и глицерина, гликолипиды и фосфолипиды.

Кроме того, указанные фармацевтические композиции могут дополнительно содержать связующие вещества (например, аравийскую камедь, кукурузный крахмал, желатин, карбомер, этилцеллюлозу, гуаровую камедь, гидроксипропилцеллюлозу, гидроксипропилметилцеллюлозу, повидон), агенты для улучшения распадаемости (например, кукурузный крахмал, картофельный крахмал, альгиновую кислоту, диоксид кремния, кроскармеллозу натрия, кросповидон, гуаровую камедь, натрия крахмал гликолят, примогель), буферы (например, трис-HCl, ацетатный, фосфатный) с различными значениями pH и ионной силы, добавки, такие как альбумин или желатин для предотвращения абсорбции на поверхностях, детергенты (например, Tween 20, Tween 80, Pluronic F68, соли желчных кислот), ингибиторы протеазы,

поверхностно-активные вещества (например, лаурилсульфат натрия), усилители проницаемости, солюбилизующие агенты (например, глицерин, полиэтилен глицерина, циклодекстрины), скользящее вещество (например, коллоидный диоксид кремния), антиоксиданты (например, аскорбиновую кислоту, метабисульфит натрия, бутилированный гидроксианизол), стабилизаторы (например, гидроксипропилцеллюлозу, гидроксипропилметилцеллюлозу), увеличивающие вязкость агенты (например, карбомер, коллоидный диоксид кремния, этилцеллюлозу, гуаровую камедь), подсластители (например, сахарозу, аспартам, лимонную кислоту), вкусоароматические агенты (например, перечную мяту, метилсалицилат или апельсиновый ароматизатор), консерванты (например, тимеросал, бензиловый спирт, парабены), смазывающие вещества (например, стеариновую кислоту, стеарат магния, полиэтиленгликоль, лаурилсульфат натрия), агенты для увеличения текучести (например, коллоидный диоксид кремния), пластификаторы (например, диэтилфталат, триэтилцитрат), эмульгаторы (например, карбомер, гидроксипропилцеллюлозу, лаурилсульфат натрия, метилцеллюлозу, гидроксипропилцеллюлозу, карбоксиметилцеллюлозу натрия), полимерные покрытия (например, полоксамеры или полоксамины), образующие покрытия и пленки агенты (например, этилцеллюлозу, акрилаты, полиметакрилаты) и/или адьюванты.

Согласно одному варианту реализации указанные фармацевтические композиции получают с носителями, защищающими указанное соединение от быстрой элиминации из организма, например, в виде состава для контролируемого высвобождения, в том числе имплантатов и микроинкапсулированных систем доставки. Могут быть использованы биоразлагаемые, биосовместимые полимеры, такие как этиленвинилацетат, полиангидриды, полигликолевая кислота, коллаген, полиортоэфир и полимолочная кислота. Способы получения таких составов очевидны специалистам в данной области техники. Указанные материалы могут также быть приобретены у Alza Corporation и Nova Pharmaceuticals, Inc. Липосомальные суспензии (в том числе, нацеленные на инфицированные клетки липосомы с моноклональными антителами к вирусным антигенами) могут также применяться в качестве фармацевтически приемлемых носителей. Они могут быть получены в соответствии со способами, известными специалистам в данной области техники, например, согласно описанию в патенте США №4522811.

Кроме того, настоящим изобретением охвачены фармацевтические композиции, содержащие любую твердую или жидкую физическую форму соединения согласно настоящему изобретению. Например, указанные соединения могут находиться в кристаллической форме, в аморфной форме, и содержать частицы любого размера. Частицы могут быть микронизированы, или могут быть агломерированы, представлены дисперсными гранулами, порошками, маслами, масляными суспензиями или любой другой твердой или жидкой физической формой.

В тех случаях, когда соединения в соответствии с настоящим изобретением проявляют недостаточную растворимость, могут быть использованы способы солюбилизации указанных соединений. Такие способы известны специалистам в указанной области техники и включают, не ограничиваясь перечисленными, коррекцию pH и получение солей с применением коррасторителей, таких как этанол, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль (ПЭГ) 300, ПЭГ 400, ДМА (10-30%), ДМСО (10-20%), NMP (10-20%), с применением поверхностно-активные вещества, такие как полисорбат 80, полисорбат 20 (1-10%), кремофор EL, кремофор RH40, кремофор RH60 (5-10%), плуроник F68/полоксамер 188 (20-50%), соллотол HS15 (20-50%), витамин E TPGS и d-α-токоферил ПЭГ 1000 сукцинат (20-50%), а также применение передовых подходов, например, мицелл, добавление полимера, суспензии наночастиц и получение липосом.

В сочетании с соединениями согласно настоящему изобретению может быть использован широкий спектр способов введения. Соединения согласно настоящему изобретению могут быть введены или совместно введены местно, перорально, внутривенно, внутримышечно, ректально, трансбуккально, интраназально, липосомально, путем ингаляции, вагинально, интраокулярно, путем локальной доставки (например, с помощью катетера или стента), подкожно, интраадипозно, внутрисуставно, интратекально, трансмукозально, в легкие или парентерально, например, путем инъекции, в том числе подкожной, внутривенной, внутримышечной, внутримышечной, внутривенной, внутривенной, внутрисердечной, интратекальной, интраспинальной, интракапсулярной, субкапсулярной, интраорбитальной, внутривенной, внутритрахеальной, внутривенной, внутрисуставной, субарахноидальной и интратеральной; путем имплантации депо или резервуара, например, подкожно или внутримышечно. Например, введение может быть скомбинировано с введением ингибиторов миостатина, противовоспалительных агентов и генной терапией для снижения продуцирования патогенного белка DUX4 при FSHD путем контроля метилирования D4Z4, супрессии мРНК DUX4 и ингибирования путей DUX4. Например, введение может быть скомбинировано с применением малой интерферирующей РНК (миРНК), малой шпилечной РНК (мшРНК), микроРНК, редактированием генома с использованием CRISPR и антисмысловых олигонуклеотидов, направленных на DUX4 и последующие транскрипты.

Соединения в соответствии с настоящим изобретением могут также быть введены или совместно введены в лекарственных формах для медленного высвобождения. Соединения могут быть представлены в газообразной, жидкой, полужидкой или твердой форме, в составе, подходящем для предполагаемого маршрута введения. В случае перорального введения подходящие для применения твердые составы включают таблетки, капсулы, пилюли, гранулы, пеллеты, саше и шипучие формы, порошки и т.п. Под-

ходящие жидкие составы для перорального применения включают растворы, суспензии, дисперсии, сиропы, эмульсии, масла и т.п. В случае парентерального введения, как правило, проводят восстановление лиофилизированного порошка.

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

Согласно варианту реализации изобретения соединение или его фармацевтически приемлемую соль вводят в дозе 7,5 мг дважды в сутки.

Согласно варианту реализации изобретения соединение или его фармацевтически приемлемую соль вводят в дозе 15 мг дважды в сутки.

Согласно некоторым вариантам реализации соединения, описанное в настоящем документе, или его фармацевтически приемлемая соль могут быть введены парентерально, перорально или путем ингаляции.

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

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

АСО - антисмысловые олигонуклеотиды;
 DAPI - 4',6-диамидино-2-фенилиндо́л (дигидрохлорид);
 ДМСО - диметилсульфоксид;
 DUX4 - двойной гомеобокс 4;
 DUX4-fl - двойной гомеобокс 4, полноразмерный;
 FSHD - плече-лопаточно-лицевая мышечная дистрофия;
 гРНК - гидовая РНК;
 MBD3L2 - метил-СrG связывающий домен белок 3-подобный 2;
 МНС - тяжелая цепь миозина;
 МРАК 14 - митоген-активируемая протеинкиназа 14;
 мРНК - матричная РНК;
 MYOG - миогенин (миогенный фактор 4);
 р HSP27 - фосфорилированный белок теплового шока 27;
 ПЦР - полимеразная цепная реакция;
 рLAM - последовательность сигнала полиаденилирования;
 POLR2A - субъединица А РНК-полимеразы II;
 кПЦР - количественная полимеразная цепная реакция;
 РНК - рибонуклеиновая кислота;
 огРНК - одиночная гидовая РНК;
 миРНК - малая интерферирующая РНК.

Примеры

Предложенное изобретение дополнительно проиллюстрировано приведенными ниже примерами, которые не должны быть истолкованы как ограничивающие объем или сущность раскрытого изобретения конкретными процедурами, описанными в настоящем документе. Следует понимать, что приведенные примеры предназначены для иллюстрации определенных вариантов реализации и не предусматривают каких-либо ограничений объема настоящего изобретения. Следует также понимать, что можно прибегнуть к различным другим вариантам реализации, их модификациям и эквивалентам, которые смогут предложить специалисты в данной области техники, без отступления от существа настоящего изобретения.

Материалы и способы

Материалы.

Миобласты скелетных мышц человека.

FTCE-00016-01 (линия иммортализованных пораженных FSDH миобластов, 6,3 повтора) и изогенные линии A4 нормальных здоровых контрольных и C12 пораженных FSDH миобластов использовали

для всех исследований (согласно описанию в источниках: Mamchaoui et al., 2011; Thorley et al., 2016). Четыре отдельных линии миобластов от пациентов, FTCE-016, -020, -197, -196, были предоставлены R. Tawil. Было показано, что пораженные FSDH миобласты экспрессируют aberrантный DUX4 за счет деметилирования D4Z4 на хромосоме 4q35.

Компоненты среды и материалы для культур тканей.

Ростовая среда для скелетных мышц (PromoCell, C-23160) с добавлением 15% ФБС (Hyclone, SH30071) и Pen/Strep (Gibco, 15140148). Среда для дифференцировки клеток скелетных мышц (PromoCell, C-23061) с добавлением 20% заменителя сыворотки крови KnockOut (Gibco, 10828010) и Pen/Strep (Среда для дифференцировки). 0,1% раствор желатина EmbryoMax (EMDmillipore ES-006-B). ФБС (Gibco, 10010023), 96-луночный микропланшет, обработанный для культивирования тканей (Corning, CLS3595), обработанный для культивирования тканей многолуночный планшет для культур клеток (Falcon, 353046).

Реагенты и наборы для ПЦР в реальном времени.

Буфер для лизиса - готовый буфер для лизиса Roche Realtime Ready Lysis Buffer, 19,5 мкл (для 20 мкл) (Roche, 07248431001), ДНКазы I (Ambion, AM2222), 0,25 мкл, защитный ингибитор РНКазы (Roche, 3335402001), 0,25 мкл. Набор RNeasy Micro Kit (Qiagen, 74004), мастер-миксы Taqman Preamp Master Mix (ThermoFisher Scientific, 4391128), Taqman Multiplex Master Mix (ThermoFisher Scientific, 4484262), наборы для анализа ZSCAN4 Taqman Assay (ThermoFisher Scientific, Hs00537549_ml, FAM-MGB), MYOG Taqman Assay (ThermoFisher Scientific, Hs01072232_ml, JUN-QSY), RPLP0 Taqman Assay (ThermoFisher Scientific, Hs99999902_ml), LEUTX Taqman Assay (ThermoFisher Scientific, Hs00418470_ml).

Антисмысловые олигонуклеотиды (АСО).

АСО приобретали у Exiqon: FTSE-000001

(АСО DUX4 от Exiqon, CAGCGTCGGAAGGTGG (SEQ ID NO: 1), 300610)),

ненацеливающий АСО

(Exiqon, AACACGTCTATACGC (SEQ ID NO: 2), 300610).

Покрытие сосудов для культур тканей желатином.

За три дня до обработки готовили 0,1% раствор желатина, соединяя 1 г желатина (например, Sigma G9391) и 1 л воды подходящего для культуры тканей качества; обрабатывали в автоклаве в течение 30 мин для растворения и стерилизации. Использовали достаточное количество 0,1% желатина для покрытия с применением стерильной пипетки, удаляя раствор аспирацией, до тех пор, пока полностью не были покрыты все сосуды. Высушивали на воздухе и хранили в оригинальной упаковке при комнатной температуре.

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

Обработка антисмысловыми олигонуклеотидами и соединениями.

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

Дифференцировка мышечных трубочек скелетных мышц.

На 0 день среду заменяют на среду для дифференцировки. Планшеты извлекают из инкубатора и удаляют ростовую среду путем аспирации. Однократно промывают ФБС, используя 100 мкл для 96-луночного планшета и 1 мл для 6-луночного планшета. Добавляют 100 мкл или 2 мл среды для дифференцировки на лунку 96-луночного или 6-луночного планшета, соответственно. Добавляют антисмысловые олигонуклеотиды или лекарственное средство в требуемой концентрации и убирают обратно в инкубатор. Слияние должно начинаться в течение 1-2 дней. Инкубируют в течение 3-4 дней.

Получение РНК.

Клетки извлекали из инкубатора и удаляли среду путем аспирации. Быстро лизировали, следуя одному из следующих протоколов: Для лизиса в 96-луночных планшетах использовали прямой лизис и одноэтапный протокол кПЦР с преамплификацией в реальном времени, описанный ниже. Для каждого 96-луночного планшета готовят смесь, содержащую: 19,5 мкл готового буфера для лизиса Roche Realtime Ready Lysis Buffer, 0,25 мкл ингибитора РНКазы, 0,25 мкл ДНКазы I (от Thermo, не включена в набор). По 20 мкл указанной смеси добавляли в каждую лунку, 5-кратно перемешивали и инкубировали 5 мин при 37°C или, как вариант, интенсивно встряхивали в течение 15 мин. Лизис наблюдали под микроскопом. Образцы замораживали при -80°C по меньшей мере в течение 15 мин.

Одноэтапная кПЦР.

Для проведения кПЦР разводят 1:10 и используют 2 мкл для 10 мкл 1-этапной реакции РВ-кПЦР. Для детекции GAPDH, RPLP0, TBP, MYOG, FRG1, MYH3, ACTN2 и т.п.). На объем реакции 10 мкл: РНК (разведение в лизате 1:10), 2 мкл, мастер-микс Fast Advanced Taqman Master Mix (2X) 5 мкл, смесь ферментов RT Enzyme Mix (40X), 0,25 мкл, набор зондов Taqman (20X), 0,5 мкл, H₂O 2,25 мкл. На QuantStudio 7 проводили реакцию по следующему протоколу: 48°C в течение 15 мин, 50°C в течение 2 минут, 95°C в течение 30 секунд, 40х, 95°C в течение 5 секунд, 60°C в течение 30 секунд, после чего считывали планшеты, следуя указаниям производителя (Thermo). Одноэтапную РВ-преамплификацию использовали для детекции последующих относительно DUX4 генов, т.е. MBD3L2, ZSCAN4, LEUTX, TRIM43, KHDC1L. POL2RA-VIC использовали в качестве эндогенного контроля). На реакцию объемом

10 мкл: РНК (разведение в лизате 1:10), 2,25 мкл, мастер-микс для преамплификации Taqman Pre-Amp Master Mix (2X), 5 мкл, смесь ферментов RT Enzyme Mix (40X) 0,25 мкл, набор зондов Taqman (0,2X)*, 2,5 мкл, * Объединение наборов для анализа TaqMan: комбинировали равные объемы каждого из наборов для анализа генной экспрессии TaqMan® в концентрации 20×, используя до 100 наборов. Например, для объединения 50 наборов для анализа TaqMan по 10 мкл каждого набора комбинировали в микроцентрифужной пробирке. Объединенные наборы для анализа TaqMan разводили с использованием 1× ТЕ-буфера до конечной концентрации каждого набора 0,2×. В описанном выше примере в объединенные наборы для анализа TaqMan добавляют 500 мкл 1× ТЕ-буфера, доводя общий итоговый объем до 1 мл. Использовали протокол QuantStudio7, 48°C в течение 15 мин, 95°C в течение 10 мин, 10 циклов: 95°C в течение 15 секунд, 60°C в течение 4 мин, 4°C без ограничения. Затем образцы разводили до 50 мкл и переходили к этапу кПЦР. На реакцию объемом 10 мкл: разведение смеси для преамплификации, 2 мкл, мастер-микс Fast Advanced Taqman Master Mix (2X), 5 мкл, набор зондов Taqman (20X), 0,5 мкл, H₂O, 2,5 мкл. При мультиплексировании объем доводили до общего объема 10 мкл). На QuantStudio7 выполняли следующую программу: 50°C в течение 2 минут, 95°C в течение 30 секунд, 40×, 95°C в течение 5 секунд, 60°C в течение 30 секунд; планшеты считывали в соответствии с инструкциями производителя (Thermo).

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

В 6-луночный планшет добавляли 450 мкл буфера RLT Plus. Лизат гомогенизировали путем переноса на спин-колонку для элиминации гДНК, помещенную в пробирку для сбора объемом 2 мл (в комплекте), центрифугировали в течение 30 с при ≥8000×g (≥10 000 об/мин) и утилизировали колонку, сохраняя проточную фракцию. Затем в проточную фракцию добавляли 250 мкл этанола (итоговое содержание 35%) и тщательно перемешивали путем пипетирования, без центрифугирования. Затем образцы переносили, вместе с любым осадком, который может образовываться, на спин-колонку RNeasy MinElute, помещенную в пробирку для сбора объемом 2 мл (в комплекте). Затем центрифугировали в течение 15 с при ≥8000×g. Проточную фракцию утилизировали или собирали для осаждения белка. 700 мкл буфера RW1 добавляли на спин-колонку RNeasy MinElute, после чего центрифугировали в течение 15 с при ≥8000×g и утилизировали проточную фракцию. Проводили обработку ДНКазой путем осторожного перемешивания 10 мкл ДНКазы I с 70 мкл буфера RDD, добавляли непосредственно на колонку и инкубировали при комнатной температуре в течение 20 минут. Затем добавляли 700 мкл буфера RW1 (следуя инструкции производителя) на спин-колонку RNeasy MinElute, центрифугировали в течение 15 с при ≥8000×g, и проточную фракцию утилизировали. 500 мкл буфера RPE добавляли на спин-колонку RNeasy MinElute, центрифугировали в течение 15 с при ≥8000×g и утилизировали проточную фракцию. 500 мкл 80% этанола добавляли на спин-колонку RNeasy MinElute, центрифугировали в течение 2 минут при ≥8000×g для промывания мембраны спин-колонки, и пробирка для сбора с проточной фракцией утилизировали. Спин-колонку RNeasy MinElute помещали в новую пробирку для сбора объемом 2 мл (в комплекте), центрифугировали на полной скорости в течение 5 мин для высушивания мембраны, и пробирку для сбора с проточной фракцией утилизировали. Спин-колонку RNeasy MinElute помещали в новую пробирку для сбора объемом 1,5 мл (в комплекте). 14 мкл не содержащей РНКазы воды добавляли непосредственно в центр мембраны спин-колонки и центрифугировали в течение 1 минут на полной скорости для элюирования РНК. Должно получиться примерно 12 мкл элюированной РНК.

Детекция DUX4-fl с применением способа, описанного Himeda с соавторами в 2015 г.

Получение кДНК. На реакцию объемом 10 мкл: РНК (1 мкг), 1 мкл, Олиго(dT), 0,5 мкл, 10 мМ дНТФ, 0,5 мкл, H₂O, 4,5 мкл. Образцы инкубировали при 65°C в течение 2 минут, быстро переносили на лед и выдерживали по меньшей мере 1 минуту перед добавлением смеси ферментов, 5× буфера для синтеза первой цепи, 2 мкл, 0,1М ДТТ, 0,5 мкл, ингибитора РНКаз, 0,5 мкл, обратной транскриптазы SSIV RT, 0,5 мкл; образцы инкубировали при 55°C в течение 20 минут и 80°C в течение 10 мин, с охлаждением до 4 °С. Проводили преамплификацию DUX4: на реакцию объемом 10 мкл - 1 мкл смеси для ОТ-реакции, 2 мкл 5X GC-буфера, 0,8 мкл ДМСО, 0,2 мкл 10 мМ дНТФ, 0,2 мкл 10 мМ TJ38F, 0,2 мкл 10 мМ TJ40R, 0,1 мкл ДНК-полимеразы Phusion II, 5,5 мкл H₂O. Выполняли следующий протокол на QuantStudio 7: 98°C в течение 2 мин, 10 циклов по 98°C в течение 15 секунд, 64°C в течение 20 секунд, 72°C в течение 15 секунд, 4°C без ограничения. кПЦР DUX4 с вложенными праймерами: на реакцию объемом 10 мкл - 1 мкл преамплифицированной ДНК DUX4, 5 мкл 2X смеси IQ SYBR Mix, 0,4 мкл 10 мМ TJ38F, 0,4 мкл 10 мМ TJ41R, 3,2 мкл H₂O. Выполняли следующий протокол на QuantStudio 7: 95°C в течение 3 мин, 40 циклов по, 95°C в течение 10 секунд, 64°C в течение 15 секунд, 72°C в течение 20 секунд, 86°C в течение 10 секунд, после чего считывали планшет на QuantStudio 7, следуя инструкциям производителя (Thermo). Значения Ct получали с использованием программного обеспечения для ПЦР в реальном времени QuantStudio Realtime PCR; Genedata применяли для вычисления относительных уровней экспрессии с использованием POLR2A в качестве "гена домашнего хозяйства".

Иммуноцитохимическое исследование пораженных FSHD мышечных трубочек.

Вкратце, клетки фиксировали в 4% параформальдегиде и пермеабилizировали в 4% параформальдегид (ПФА) в течение 10 мин при комнатной температуре. Клетки пермеабилizировали с применением

ФСБ-Т (PBST) (1× раствор ФСБ с 0,1% Triton X-100), после чего блокировали 10% нормальной сывороткой осла (NDS) или 3% БСА (NDS) в PBST. Затем клетки инкубировали с разведенными надлежащим образом первичными антителами в PBST с 5% NDS в течение 1 часа при комнатной температуре или 12 ч при 4 °С, троекратно промывали PBST при комнатной температуре и затем инкубировали с требуемыми вторичными антителами в TBST с 5% NDS и DAPI для контр-окрашивания ядер. DUX4 детектировали путем иммуноцитохимического исследования с применением антитела E5-5 в дифференцированных пораженных FSHD мышечных трубочках. Активированную каспазу-3 детектировали с применением антитела от Cell Signaling Technology, которое авторы использовали для ICC, Asp175 (<https://www.cellsignal.com/products/primary-antibodies/cleaved-caspase-3-asp175-antibody/9661>).

Способы РНК-секвенирования (RNAseq).

Односторонние риды размером 40 п.о. от Illumina обладали хорошим качеством по оценке с использованием FastQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>).

Риды картировали на hg19 с применением TopHat v2.1.1. Генную модель для TopHat создавали путем объединения известного гена в формате gtf с таблицей kgXref. И известный ген, и kgXref загружали из табличного браузера UCSC в сборке hg19. Подсчет ридов осуществляли с использованием функции featureCounts из пакета Subread со значением опции 'strandness' -г 2. Риды нормировали с использованием DESeq2. Биологические повторности в образцах нейронов, обработанных в разные периоды времени, демонстрируют групповой эффект, на что указывает анализ главных компонентов. Соответственно, использовали Combat для уменьшения указанного группового эффекта. Вычисляли стандартные значения экспрессии в RPKM. Общая генная сигнатура очень незначительна и определена с использованием стандартных статистических значений отсечения: 86/19 799 мРНК-генов. Сигнатура DUX4-регулируемых генов составляет большую часть от общей сигнатуры: 77/86 мРНК-генов=90%. Не регулируемые DUX4 гены составляют меньшинство от общей сигнатуры с умеренной кратностью различия: 9/86 мРНК-генов=10%; 2-2,7X logFC.

Способы трансдукции миРНК и РНП Cas9/ог РНК пораженных FSHD мышечных трубочек.

Синтетические crRNA (CRISPR-РНК) приобретали у Thermo Fisher Scientific и отжигали с tracrRNA (транс-активирующими crRNA) в соответствии с техническими условиями. Вкратце, crRNA и tracrRNA ресуспендировали в ТЕ-буфере до концентрации 100 мкМ, перемешивали и разводили 5-кратно в буфере для отжига. Отжиг проводили в ПНР-системе ProFlex, следуя рекомендациям производителя. 100 нг собранной crRNA:tracrRNA инкубировали с 500 нг TrueCut Cas9 (ThermoFisher, #A36497) в буфере для ресуспензии, поставляемом с набором Neon Transfection System (ThermoFisher, #MPK10096). После 15 мин инкубации реакционную смесь использовали для трансфекции 50 000 миобластов в соответствии с описанными способами. Последовательности, используемые для нацеливания на MAPK14 (3 огРНК) и область рLAM (последовательность полиаденилирования

DUX4, 4 гРНК): NT-CTRL, GTATTACTGATATTGGTGGG (SEQ ID NO: 3);

MAPK14, GCTGAACAAGACAATCTGGG (SEQ ID NO: 4),

CTGCTTTTGACACAAAAACG (SEQ ID NO: 5),

СТТАТСТАССАААТТСТССГ (SEQ ID NO: 6);

рLAM, AGAATTTACGGAAGAACA (SEQ ID NO: 7),

CAGGTTTGCCTAGACAGCGT (SEQ ID NO: 12),

АТТААААТГСССССТСССТГ (SEQ ID NO: 8),

ААТСТТСТАТАГГАТССАСА (SEQ ID NO: 9).

миРНК MAPK14, антисмысловая:

UAGAUUACUAGGUUUUAGGTC (SEQ ID NO: 10),

CCUAAAACCUAGUAAUCUATT (SEQ ID NO: 11).

Эксперименты.

Пример 1.

Репрессия DUX4 с применением направленного на последовательность антисмыслового олигонуклеотида уменьшает экспрессию последующих целевых генов.

Мышечные трубочки дикого типа обрабатывали контролем - основой ДМСО, а зрелые полученные от пациентов пораженные FSHD мышечные трубочки, которые экспрессируют белок DUX4, обрабатывали контролем - основой ДМСО или 1 мкМ направленного на последовательность DUX4 антисмыслового олигонуклеотида (ACO; FTX-2), приобретенного у Exiqon. После обработки мышечные трубочки лизировали в 19,5 мкл буфера для лизиса Roche Real Time Ready Lysis Buffer, 0,25 мкл ДНКазы 1 (Ambion, AM2222), 0,25 мкл защитного ингибитора РНКаз (Roche, 3335402001), и собирали РНК в мастермикс RNeasy Micro Kit Master Mix. Уровни экспрессии DUX4-регулируемых последующих генов (ZSCAN4, TRIM43, MBD3L2, LEUTX, и KHDC1L) определяли с применением ПЦР в реальном времени (ThermoFisher Scientific, 4484262), наборов для анализа ZSCAN4 Taqman Assay (ThermoFisher Scientific, Hs00537549_m1, FAM-MGB), MYOG Taqman Assay (ThermoFisher Scientific, Hs01072232_m1, JUN-QSY), RPLP0 Taqman Assay (ThermoFisher Scientific, Hs99999902_m1) и/или LEUTX Taqman Assay (ThermoFisher Scientific, Hs00418470_m1). Значения Ct получали с использованием программного обеспечения для ПЦР в реальном времени QuantStudio Realtime PCR, и Genedata применяли для вычисления относи-

тельных уровней экспрессии с использованием POLR2A в качестве "гена домашнего хозяйства".

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

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

Пример 2.

Низкомолекулярные ингибиторы p38 снижают экспрессию мРНК MBD3L2.

Мышечные трубочки дикого типа и зрелые полученные от пациентов пораженные FSHD мышечные трубочки, которые экспрессируют белок DUX4, обрабатывали контролем - основой ДМСО или различными ингибиторами p38 α/β в нескольких концентрациях с разными диапазонами селективности по изоформам и киному, в том числе SB239063 (фиг. 4А; IC₅₀=15 нМ), VX-702 (фиг. 4В), памапимодом (фиг. 4С) и ТАК-715 (фиг. 4Д). После обработки контрольные и обработанные клетки подготавливали для количественного определения с помощью ПЦР в реальном времени экспрессии мРНК MBD3L2 (последующего относительно DUX4 гена) и мРНК миогенина (MYOG) (контроль).

Указанные ингибиторы p38 α/β продемонстрировали мощное (IC₅₀ приблизительно <10 нМ, фиг. 4А-Д) снижение экспрессии мРНК MBD3L2 в отсутствие нарушений экспрессии мРНК MYOG в пораженных FSHD мышечных трубочках.

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

Пример 3.

Снижение уровней мРНК p38 MAPK14 и мРНК MBD3L2 путем нокдауна миРНК.

миРНК p38 α MAPK14 85 и p38 α MAPK14 86 трансфицировали пораженные FSHD мышечные трубочки пациентов согласно описанию в разделе "Материалы и способы". Все миРНК, миРНК p38 α MAPK14 85 и миРНК p38 α MAPK14 86 (в меньшей степени), снижали экспрессию p38 MAPK14, как показано на фиг. 6А, а также экспрессию мРНК MBD3L2 (целевой ген DUX4), как показано на фиг. 6В, по сравнению с нецелевым контролем миРНК (NT CTRL 1 и NT CTRL 2). Данные показывают, что геномное снижение уровня p38 α MAPK14 >50% специфическим образом снижало уровни DUX4 и последующих целевых генов, как показано на примере MBD3L2.

Пример 4.

Снижение уровней мРНК MBD3L2 при применении Cas9/огРНК РНП для киназы p38 α .

Нацеливание CRISPR-гРНК на MAPK14 или pLAM (последовательность сигнала полиаденилирования DUX4) осуществляли согласно описанию в разделе "Материалы и способы". CRISPR-гРНК, нацеленная на MAPK14 или pLAM (последовательность сигнала полиаденилирования DUX4), обеспечивала снижение экспрессии MBD3L2, но не MYOG. Данные показывают, что геномное снижение уровня p38 α MAPK14 специфическим образом снижало уровни DUX4 и последующих целевых генов, как показано на примере MBD3L2.

Пример 5.

FTX-1821 Понижающе регулирует белок DUX4 и мРНК MBD3L2.

Полученные от пациентов пораженные FSHD мышечные трубочки (с 6 повторами в массивах D4Z4) обрабатывали контролем - основой ДМСО и FTX-1821 в разных концентрациях, и определяли уровни белка DUX4 и мРНК MBD3L2 согласно описанию в разделе "Способы и материалы". Для DUX4 и MBD3L2 анализировали по четыре биологических повторности. Кроме того, определяли уровни pHSP27. Для количественного определения pHSP27 получали по три повторности в двух независимых экспериментах.

Обработка полученных от пациента с FSHD мышечных трубочек FTX 1821 приводила к зависимо-

му от концентрации снижению уровня белка DUX4 ($IC_{50}=25$ нМ) и MBD3L2 мРНК ($IC_{50}=25$ нМ), которое коррелировало с наблюдаемыми изменениями уровней фосфо-HSP27 ($IC_{50}=10$ нМ) что свидетельствует о вовлечении мишени (фиг. 7). Результаты указывают на зависимое от концентрации снижение белка DUX4 ($IC_{50}=25$ нМ) и MBD3L2 мРНК ($IC_{50}=10$ нМ). Снижение уровней белка DUX4 и мРНК MBD3L2 коррелировало с наблюдаемыми изменениями уровней р-HSP27 ($IC_{50}=10$ нМ), что свидетельствует о вовлечении мишени. Результаты показывают, что ингибирование пути р38α FTX-1821 приводит к мощной понижающей регуляции белка DUX4 и мРНК MBD3L2.

Пример 6.

FTX-1821 Не влияет на образование мышечных трубочек.

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

Пример 7.

FTX-1821 снижает апоптоз в пораженных FSHD мышечных трубочках.

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

Пример 8.

FTX-1821 снижает экспрессию патологической транскрипционной программы Dux4.

Проводили исследования согласно описанию в разделе "Способы и материалы" для идентификации генов пути DUX4, понижающая регуляция экспрессии которых происходит в пораженных FSHD мышечных трубочках, обработанных FTX-1821, по сравнению с пораженными FSHD мышечными трубочками, обработанными контролем - основой ДМСО. Кроме того, также определяли генную экспрессию в мышечных трубочках дикого типа, обработанных ДМСО. Анализировали по три повторности для каждого условия с применением РНК-секвенирования и кластеризовали гены по направлению и интенсивности изменения.

Как показано на тепловой карте на фиг. 10А, ряд дифференциально экспрессируемых генов идентифицировали путем профилирования с применением РНК-секвенирования. Планкой обозначены наблюдаемые нормированные различия, например, генами, понижающую регуляцию которых обеспечивал FTX-1821, обогащены образцы, обработанные только ДМСО. Экспрессию указанных генов нормировали после обработки FTX-1821 (1 мкМ), и она была ближе к наблюдениям в клетках дикого типа. Вычисленная с применением стандартных значений экспрессии в RPKM общая генная сигнатура была очень незначительной и была определена с использованием стандартных статистических значений отсека: 86/19 799 мРНК-генов. Сигнатура DUX4-регулируемых генов составляла большую часть от общей сигнатуры; указанные гены перечислены на фиг. 10А. Не регулируемые DUX4 гены составляют меньшинство от общей сигнатуры с умеренной кратностью различия: 9/86 мРНК-генов=10%; $2-2,7 \times \log FC$. На фиг. 10В показаны нормированные ряды, согласно описанию в разделе "Материалы и способы", целевых генов DUX4, понижающая регуляция которых происходит при обработке FTX-1821. Анализировали по три независимых повторности на группу.

Пример 9.

Снижение уровня мРНК MBD3L2 при различных генотипах и фенотипах FSHD1.

Способность ингибиторов киназы р38 снижать экспрессию целевых генов DUX4 в клетках, полученных от пациентов, с различными генотипами FSHD1 исследовали согласно описанию в разделе "Способы и материалы". Четыре отдельных линии миобластов от пациентов с FSHD, т.е. FTCE-016, -020, -197 и -196 (любезно предоставленные Rabi Tawil) обрабатывали FTX-1821 (1 мкМ) или FTX-839 (1 мкМ), и после обработки определяли уровни мРНК целевого гена DUX4, MBD3L2.

Уровни экспрессии MBD3L2 были понижены во всех линиях FSHD, что приводило к уровням, аналогичным измеренным у здоровых контролей, FTCE-396 и FTCE-014 (фиг. 11). Это свидетельствует о снижении уровня целевого для DUX4 гена при применении ингибиторов киназы р38 во всех мышечных трубочках, происходящих из FSHD1 разнообразных генотипов и фенотипов (аналогичные результаты наблюдались для FSHD2, данные не показаны).

Пример 10.

Снижение уровня мРНК MBD3L2 при генотипах и фенотипах FSHD1 и FSHD2.

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

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

Пример 11.

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

Фармакокинетические свойства FTX-1821 исследовали в модели на животных, самцов крыс Спрег-Дуули перорально дозировали натошак или не натошак FTX-1821 (N=6 животных на точку времени и группу лечения), и определяли уровни фосфо-p38 α и общие уровни p38 α . Фармакодинамический анализ вовлечения мишени в системе p38 в мышечной ткани проводили путем измерения изменения отношения уровня фосфо-активированной MAP-киназы протеинкиназы 2 (MK2) и общего уровня MK2 до и после лечения лекарственным средством. Все используемые способы описаны в разделе "Материалы и способы".

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

Фармакодинамический анализ продемонстрировал, что однократная пероральная доза FTX-1821 (0,3 мг/кг) обеспечивала клинически релевантные концентрации в плазме (Barbour et al., 2012) и значительно снижала отношение уровня фосфо-MK2 и общего уровня MK2 в трапециевидных мышцах крыс в пределах 1 часа после лечения лекарственным средством (фиг. 15). Вовлечение мишени в системе p38 сохранялось по меньшей мере в течение 12 ч после введения однократной дозы FTX-1821 (фиг. 15). Вовлечение мишени в системе p38 в трапециевидных мышцах была максимальной при концентрациях FTX-1821 в плазме и мышцах, превышающих 20 нг/мл или нг/г и снижалось в точках времени, когда снижалась экспозиция. Концентрации в мышцах FTX-1821, полученные в исследовании на крысах, по прогнозам, будут приводить к >70% снижению при C_{max} уровней DUX4-зависимых целевых генов в биоптатах мышц от пациента с FSHD на основании данных, полученных *in vitro* на пораженных FSHD мышечных трубочках (выше).

Указанный фармакокинетический и фармакодинамический анализ показал, что максимальное ингибирование системы p38 в мышцах достигалось при концентрациях FTX-1821 в плазме выше 20 нг/мл, и что значимое ингибирование пути p38 в мышцах человека ожидается при введении клинических доз по 7,5 или 15 мг два раза в сутки (Barbour et al., 2012).

Пример 12.

Ингибирование геномной программы DUX4 у мышей с ксенотрансплантатами FSHD после обработки мощным селективным ингибитором киназы p38.

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

pMK2 и MK2 оценивали с применением количественного MSD-анализа.

Анализ ТА-ткани с помощью кПЦР от животных с приживляемыми в течение 4-6 недель тканями миобластов А4 или С6 продемонстрировал значимое ($p < 0,05$) и >10 -кратное увеличение уровня MBD3L2 и других Dux4-зависимых генов (не показано) в ТА-мышцах с ксенотрансплантатами FSHD (С6) или контрольными ксенотрансплантатами (А4) (фиг. 16). N=8 образцов ТА на группу.

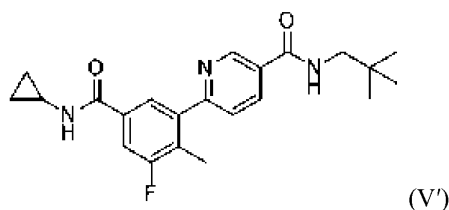
Лечение животных с ксенотрансплантатами FSHD мощным и селективным ингибитором киназы p38, FTX-2865, обеспечивало вовлечение мишени в системе p38, на основании изменения отношения уровня фосфо-активированной MAP-киназы протеинкиназы 2 (MK2) и общего уровня MK2 $>50\%$ в ТА-и трапециевидных мышцах мышей дикого типа после многократного введения дважды в сутки дозы 10 мг/кг, вводимой посредством внутривенных (в/в) инъекций (данные не показаны). Лечение FTX-2865 значимо ($p < 0,05$) снижало отношение уровня фосфо-MK2 и общего уровня MK2 в трапециевидных мышцах мышей, что указывает на значимое вовлечение системы p38, а также указывает на достаточные концентрации лекарственного средства в скелетных мышцах животных для ингибирования системы p38 на $>80\%$ (фиг. 17; N=8 образцов трапециевидной мышцы на группу). Кроме того, лечение FTX-286 значимо ($p < 0,05$) снижало экспрессию MBD3L2 в ТА-мышцах с ксенотрансплантатами FSHD по сравнению с получавшими лечение основной животными, что указывает на супрессию патологической программы гена DUX4 за счет ингибирования p38 (фиг. 18; N=5-7 образцов ТА на группу).

Эквиваленты.

Хотя настоящее изобретение было описано в комбинации со специфическими вариантами реализации, представленными выше, для специалистов в данной области техники очевидны многие их альтернативы, модификации и другие варианты. Все такие альтернативы, модификации и варианты соответствуют сути и включены в объем настоящего изобретения.

Кроме того, предполагается, что любой описанный в настоящем документе способ может быть переведен в формат "швейцарского типа" для применения любого ингибитора киназы p38 или агента, описанных в настоящем документе, для получения медикамента, для лечения любого из расстройств, описанных в настоящем документе. Сходным образом, предполагается, что любой описанный в настоящем документе способ может быть переведен в соединение, на которое заявлено право использования.

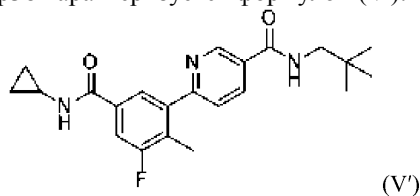
Например, применение ингибитора киназы p38 для получения медикамента, для лечения расстройства, реагирующего на ингибирование киназы p38, где указанный ингибитор киназы p38 характеризуется формулой (V'):



или его фармацевтически приемлемой соли; где указанное расстройство ассоциировано с экспрессией гена DUX4, а указанный ингибитор киназы p38 снижает уровни экспрессии DUX4 и/или экспрессии одного или более последующих генов в клетках субъекта.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения плече-лопаточно-лицевой мышечной дистрофии (FSHD), включающий введение нуждающемуся в этом субъекту эффективного количества ингибитора киназы p38, где указанный ингибитор киназы p38 характеризуется формулой (V'):



или его фармацевтически приемлемой соли.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что указанное соединение формулы V' или его фармацевтически приемлемую соль вводят в дозе 7,5 мг или 15 мг;

и где необязательно:

(a) указанное соединение формулы V' или его фармацевтически приемлемую соль вводят в дозе 7,5 мг,

(b) указанное соединение формулы V' или его фармацевтически приемлемую соль вводят в дозе 15 мг,

или

(c) указанное соединение формулы V' или его фармацевтически приемлемую соль вводят два раза в сутки.

3. Способ по п.1, отличающийся тем, что введение указанного ингибитора киназы p38 снижает

уровни экспрессии полипептида DUX4 и/или полипептида, кодируемого геном DUX4, в мышечных клетках указанного субъекта.

4. Способ по п.3, отличающийся тем, что последующий относительно DUX4 ген выбран из группы, состоящей из: ZSCAN4, LEUTX, PRAMEF2, TRIM43, MBD3L2, KHDC1L, RFPL2, CCNA1, SLC34A2, TPRX1, PRAMEF20, TRIM49, PRAMEF4, PRAME6, PRAMEF15 и ZNF280A.

5. Способ по п.3, отличающийся тем, что указанные мышечные клетки
(а) являются терминально дифференцированными мышечными клетками,
(б) содержат разрегулированный массив D4Z4 на хромосоме 4q35 или
(с) содержат по меньшей мере один неделетированный аллель 4qA.

6. Способ по п.3, отличающийся тем, что указанная плече-лопаточно-лицевая мышечная дистрофия представляет собой

(а) FSHD типа 1 (FSHD1), необязательно где указанные мышечные клетки содержат делецию одного или более макросателлитных повторов D4Z4 в субтеломерной области хромосомы 4q35, дополнительно необязательно менее 11 макросателлитных повторов D4Z4 в субтеломерной области хромосомы 4q35, или

(б) FSHD типа 2 (FSHD2), необязательно где указанные мышечные клетки содержат одну или более мутаций в гене содержащего гибкий шарнирный домен белка поддержания структуры хромосом 1 (SMCHD1).

7. Способ по п.3, отличающийся тем, что указанное введение вызывает уменьшение мышечной дегенерации у субъекта или снижение апоптоза мышечных клеток у субъекта.

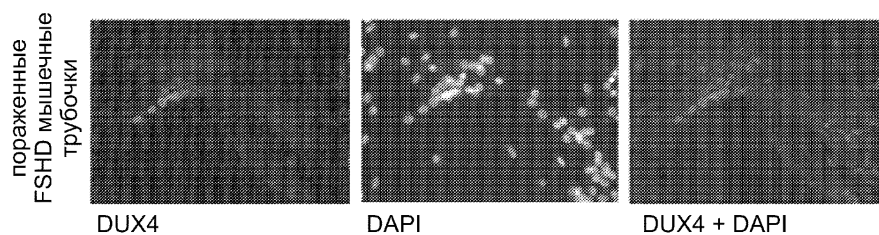
8. Способ по п.1, отличающийся тем, что указанное соединение или его фармацевтически приемлемую соль вводят указанному субъекту парентерально, перорально или путем ингаляции.

9. Способ по п.1, отличающийся тем, что указанное соединение формулы V' или его фармацевтически приемлемую соль вводят в дозе 7,5 мг дважды в сутки.

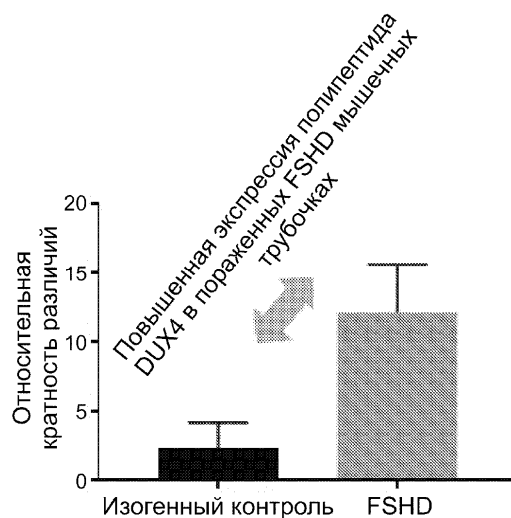
10. Способ по п.1, отличающийся тем, что указанное соединение формулы V' или его фармацевтически приемлемую соль вводят в дозе 15 мг дважды в сутки.

11. Способ по п.1, отличающийся тем, что плече-лопаточно-лицевая мышечная дистрофия (FSHD) представляет собой FSHD типа 1 (FSHD1).

12. Способ по п.1, отличающийся тем, что плече-лопаточно-лицевая мышечная дистрофия (FSHD) представляет собой FSHD типа 2 (FSHD2).

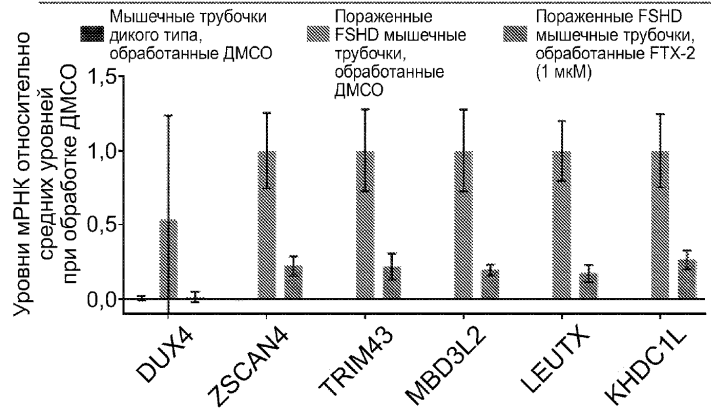


Фиг. 1А

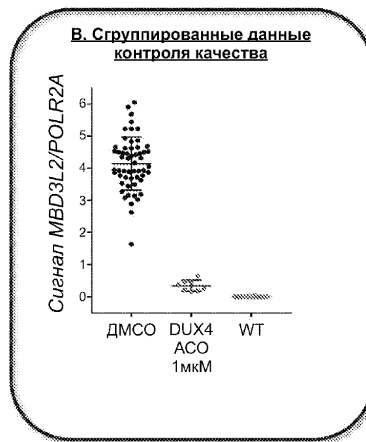


Фиг. 1В

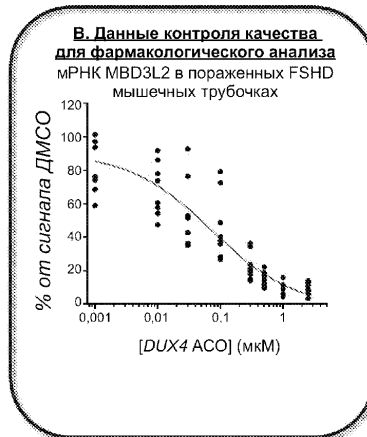
Репрессия регулируемых DUX4 генов



Фиг. 2



Фиг. 3А



Фиг. 3В

В. Статистика анализа

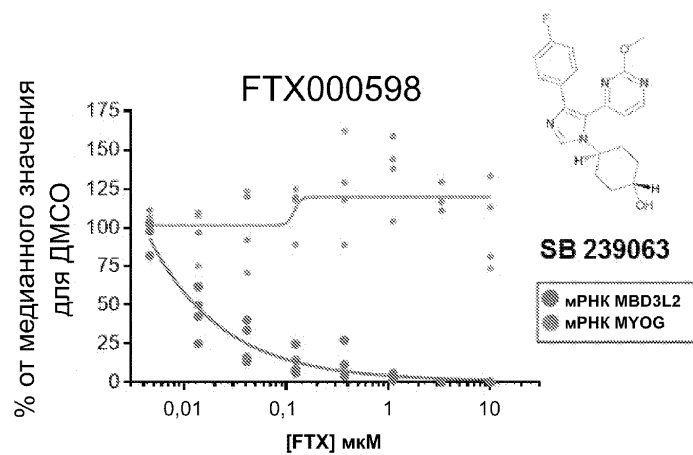
Z' ДМСО-WT: 0,512

S/N WT: 5,1

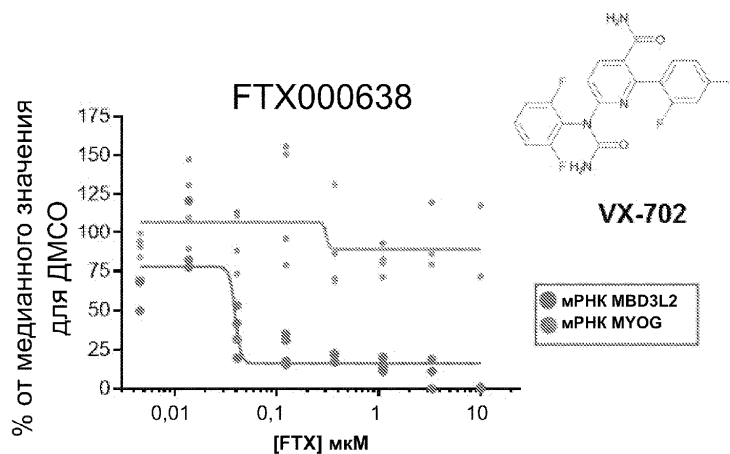
Z' ДМСО-DUX4 АСО: 0,319

S/N ДМСО-DUX4 АСО: 4,6

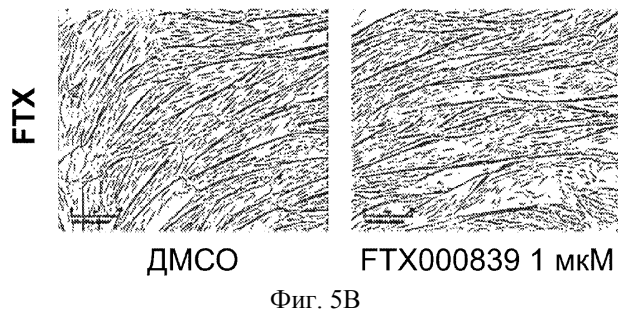
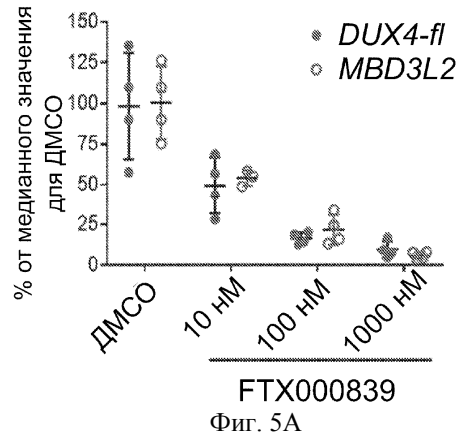
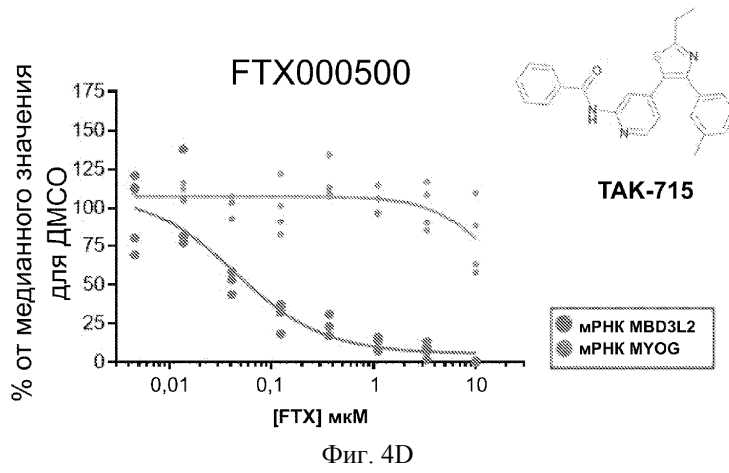
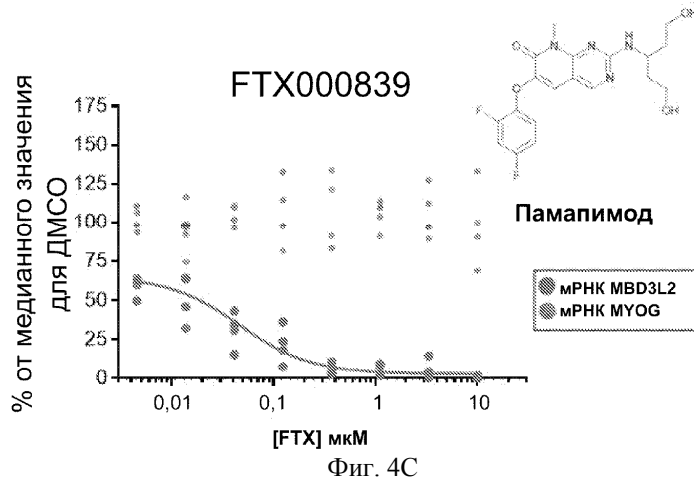
Фиг. 3С



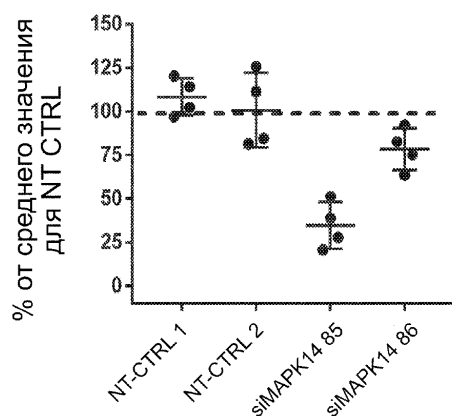
Фиг. 4А



Фиг. 4В

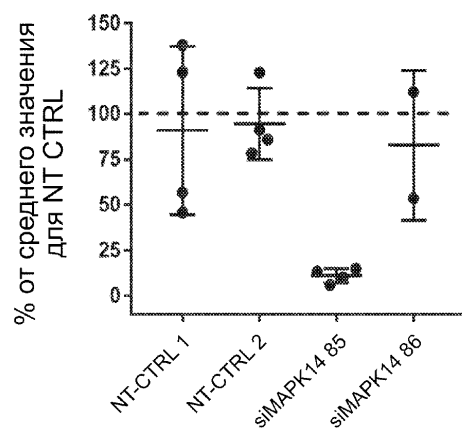


мРНК MAPK14

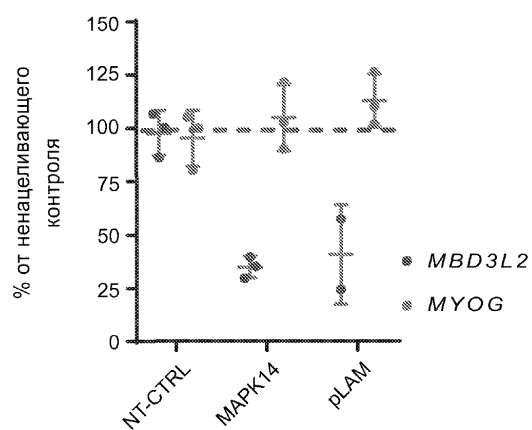


Фиг. 6А

мРНК MBD3L2

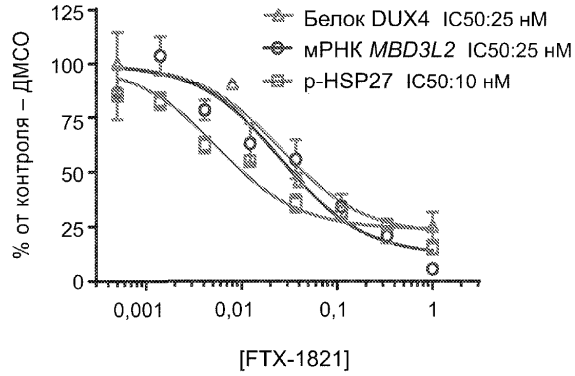
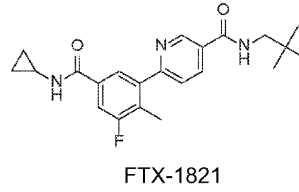


Фиг. 6В



Фиг. 6С

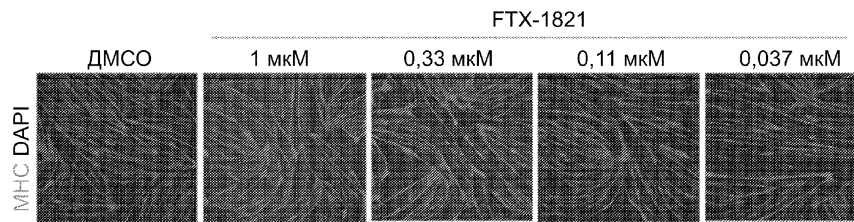
046703



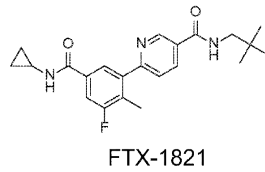
Фиг. 7

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

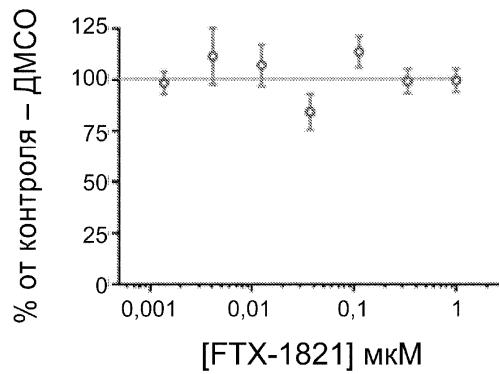
A



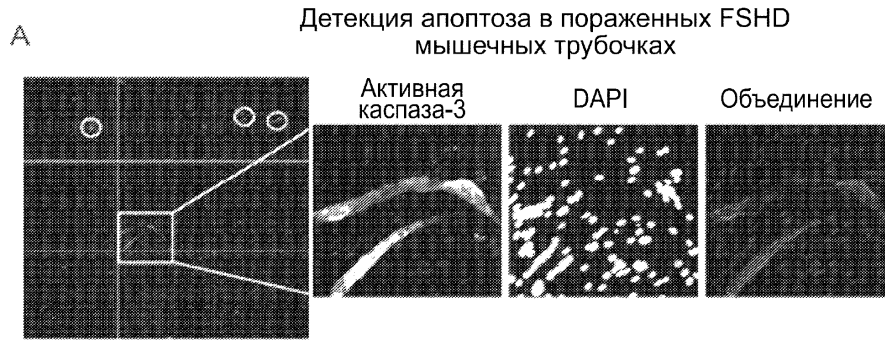
Фиг. 8A



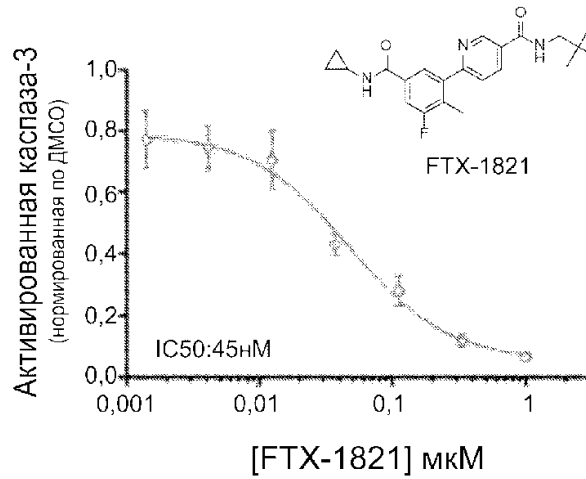
Количественное определение ядер в МНС+ мышечных трубочках после обработки FTX-1821



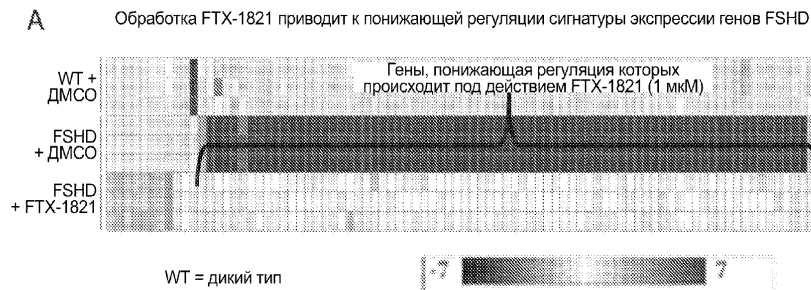
Фиг. 8B



Фиг. 9А



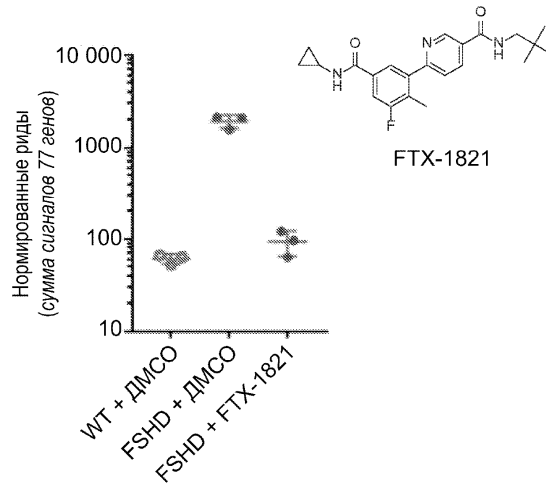
Фиг. 9В

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

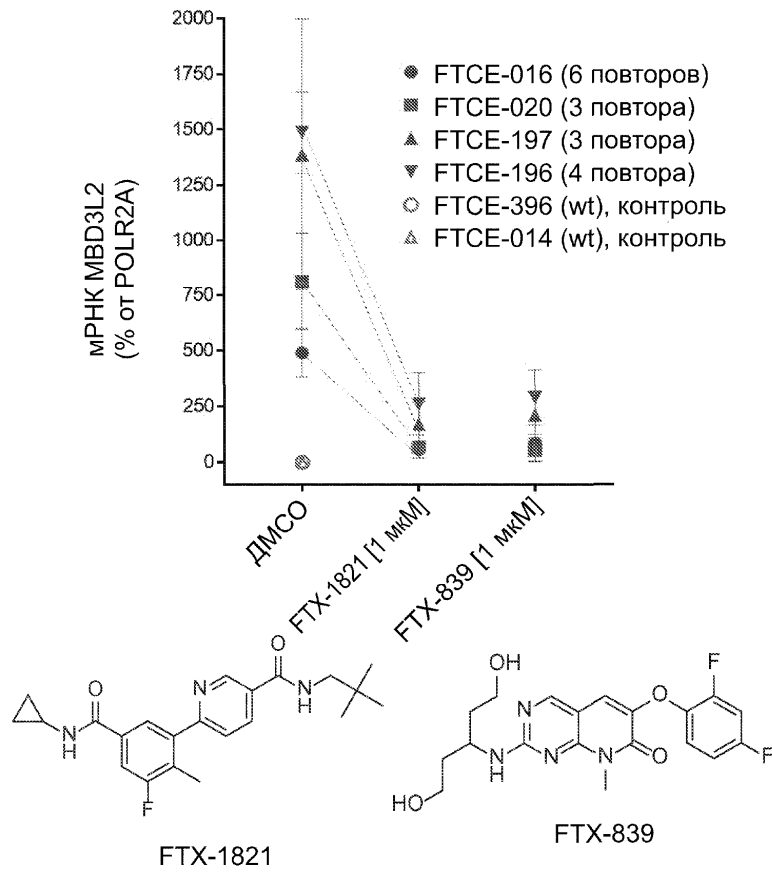
ZSCAN4	TRIM51BP	MBD3L3	UBTF5	AP001043.1	ABRA
PRAMEF20	KHDC1P1	KDM4F	HNRNPCL3	MBD3L5	WIPF3
PRAMEF6	RFPL4A	DUXA	ZIM3	TRIM51CP	UBTF11
PRAMEF17	ZSCAN5DP	TPRX1	TRIM53BP	TRIM53CP	POU5F1B
PRAMEF1	PRAMEF9	PRAMEF13	TRIM53AP	CILP	UBTF12
ZNF705E	KLF17	TRIM43	DPPA3	SLC2A3	FAM151A
LEUTX	RFPL2	MBD3L2	MBD3L2B	TRIM49	TRIM60
PRAMEF15	CCNA1	PRAMEF11	USP29	ZNF705G	PRAMEF28P
ZNF705A	PRAMEF2	PRAMEF14	ZNF296	TRIM43CP	KLF18
PRAMEF12	HNRNPCL1	KHDC1L	F2RL1	TRIM48	SNAI1P1
SLC34A2	DUXB	PRAMEF19	FREM2	UBTF6	HUNK
HNRNPCL2	HSPA6	PRAMEF4	PRAMEF8	PRAMEF33	P2RX1
PRAMEF18	TRIM43B	KDM4E	TRIM51	C1DP2	TPRX2P
TRIM49C	TC2N	TRIM49B	IGFN1	DPYSL5	FAM9C
					GJA5
					IMPG2

Фиг. 10А

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



Фиг. 10В

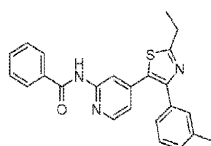


Фиг. 11

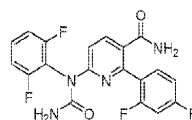
Таблица 1

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

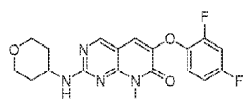
Фиг. 12А



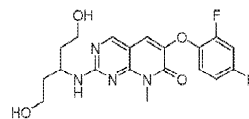
FTX-500
«ТАК-715»



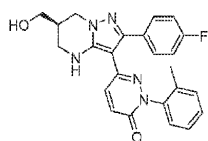
FTX-638
«VX-702»



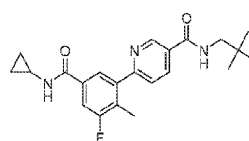
FTX-830
«R1487»



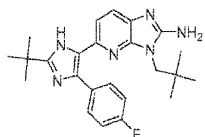
FTX-839
«Памапимод»



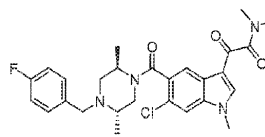
FTX-1341
«AS1940477»



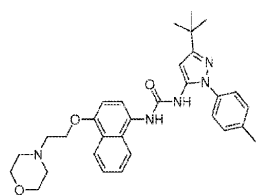
FTX-1821
«Лосмапимод»



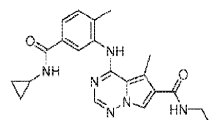
FTX-2865
«LY2228820»



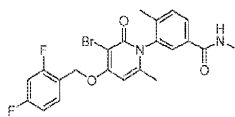
FTX-4078
«SCIO-469»



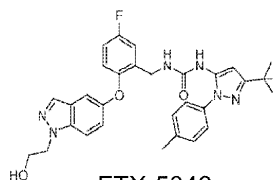
FTX-4385
«Дорамапимод»



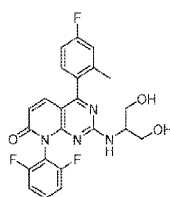
FTX-5041
«BMS-582949»



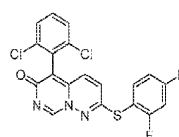
FTX-5042
«PH-797804»



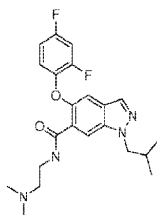
FTX-5043
«Пексметиниб»



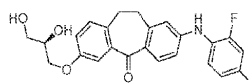
«Дилмапимод»



FTX-4384
«Нефламапимод»
«VX-745»



«ARRY-797»



«Скепинон-L»

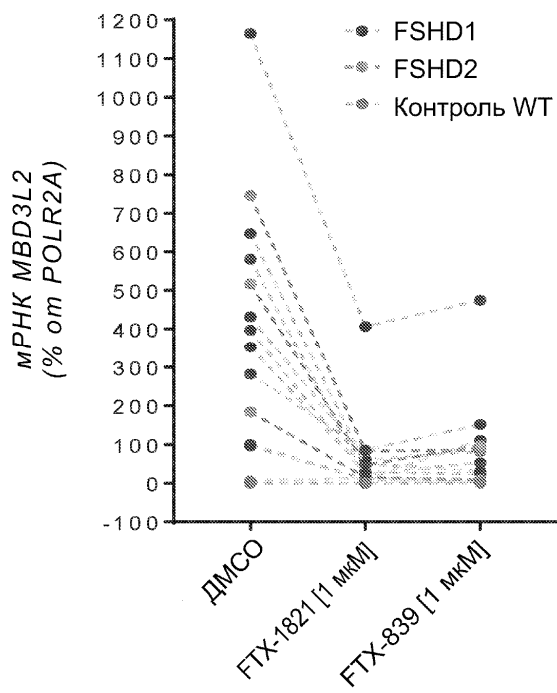
Фиг. 12В

Таблица 2

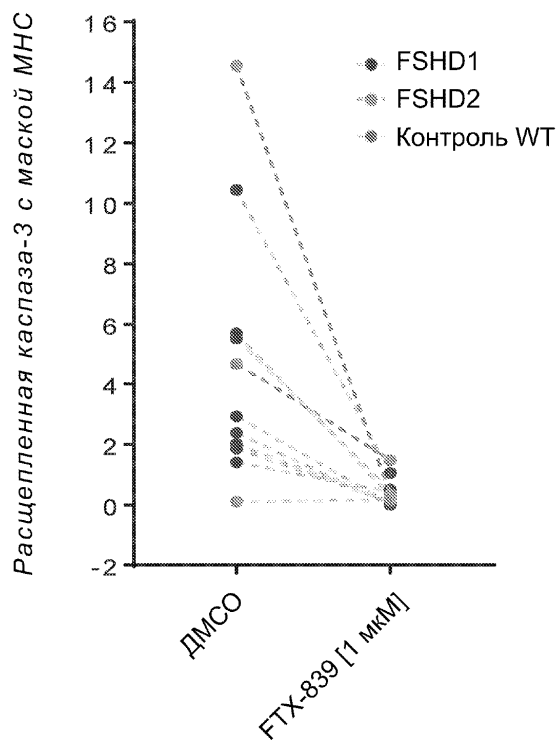
CSID №:	Идентификатор	п./и.	Тип клеток	Число повторов	Контроль/ FSHD
CTID-001	FTCE-204	первичные	Миобласты	39	Контроль
CTID-002	FTCE-425	первичные	Миобласты	5,5	FSHD
CTID-003	FTCE-423	первичные	Миобласты	3	FSHD
CTID-004	FTCE-396	первичные	Миобласты	н.о.	Контроль
CTID-005	FTCE-422	первичные	Миобласты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

Фиг. 13

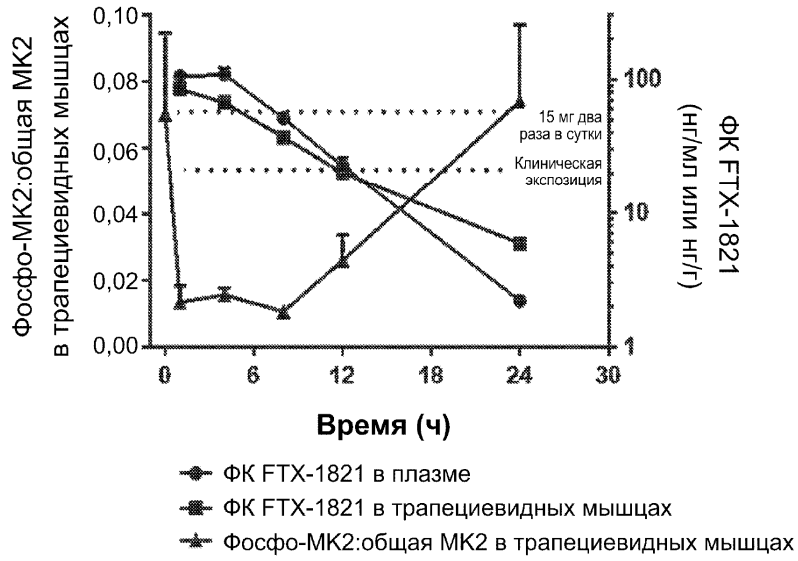
046703



Фиг. 14А

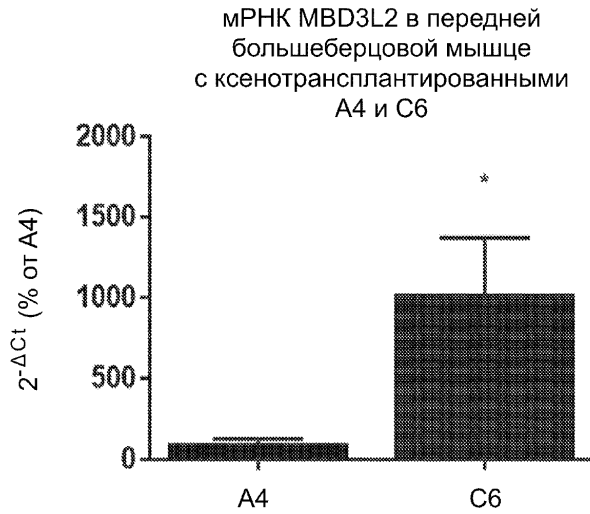


Фиг. 14В



Фиг. 15

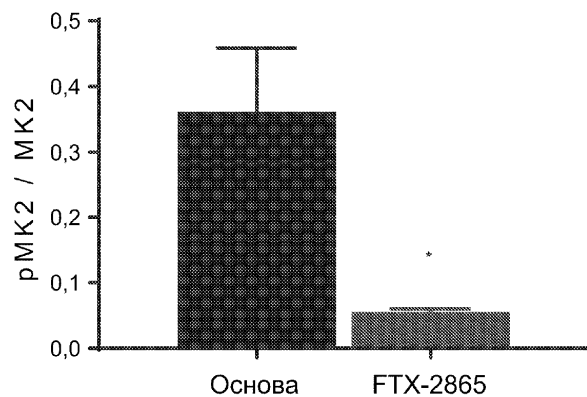
Усиление DUX4-зависимой мРНК-программы в мышцах мышей с ксенотрансплантатами FSHD или контрольными ксенотрансплантатами



Фиг. 16

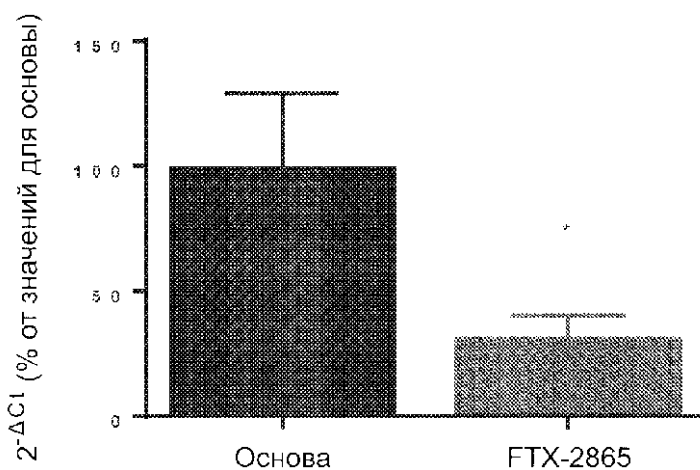
Лечение мышей с FSHD мощным селективным ингибитором p38, FTX-2865, приводит к вовлечению мишени p38 в трапециевидной мышце

Отношение фосфорилированной MK2 к общей MK2 в трапециевидной мышце мышей



Фиг. 17

мРНК MBD3L2 в передней большеберцовой мышце с ксенотрансплантированными С6



Фиг. 18



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2