

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202091325** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2020.08.28

(22) Дата подачи заявки
2018.11.16

(51) Int. Cl. *C12N 5/0783* (2010.01)
A61K 35/17 (2015.01)
A61P 1/00 (2006.01)
A61P 3/08 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)
A61P 37/02 (2006.01)

(54) **СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ С ПОМОЩЬЮ ЛИГАНДОВ ЛАНТИОНИН С-ПОДОБНОГО БЕЛКА 2 И ПОДГОТОВЛЕННЫХ С ИХ ПОМОЩЬЮ КЛЕТОК**

(31) **62/592,692**

(32) **2017.11.30**

(33) **US**

(86) **PCT/US2018/061588**

(87) **WO 2019/108418 2019.06.06**

(71) Заявитель:

ЛЭНДОС БАЙОФАРМА, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:

**Бэссэйгэйнн-Риэра Джозеп, Лебер
Эндрю, Хантэсиллэс Ракель (US)**

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Предложены соединения, которые нацелены на путь лантионинсинтетаза С-подобного белка 2, и клетки, такие как иммунные клетки, полученные *in vitro* с помощью указанных соединений. Указанные соединения и клетки могут быть использованы для лечения множества патологий, включающих в себя инфекционные заболевания, гиперпролиферативные нарушения, врожденные дефекты метаболизма, хронические иммунометаболические заболевания, аутоиммунные заболевания, отторжение трансплантированного органа, воспалительные нарушения и хроническую боль, среди прочих.

A1

202091325

202091325

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-563110EA/011

СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ С ПОМОЩЬЮ ЛИГАНДОВ ЛАНТИОНИН С-ПОДОБНОГО БЕЛКА 2 И ПОДГОТОВЛЕННЫХ С ИХ ПОМОЩЬЮ КЛЕТОК ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Данное изобретение относится к области терапевтических способов лечения заболеваний и нарушений. Более конкретно, данное изобретение относится к классам биологически активных соединений и подготовленным с их помощью клеткам, которые могут быть использованы для лечения и профилактики патологий, таких как инфекционные заболевания, гиперпролиферативные нарушения, врожденные дефекты метаболизма, хронические иммунометаболические заболевания, аутоиммунные заболевания, отторжение трансплантированного органа, воспалительные нарушения и хроническая боль, среди прочих.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Лантионинсинтетаза С-подобный белок 2 (LANCL2 - Lanthionine synthetase C-like protein 2) (также называемый «лантионин-С-подобный белок 2» или «лантионинсинтетазный компонент С-подобный белок 2») представляет собой белок сигнального пути, который экспрессируется во всем организме и в частности в клетках желудочно-кишечного тракта и иммунной, нервной и эндокринной систем. Активация LANCL2 способствует изменению метаболических процессов клетки и снижению продуцирования медиаторов воспаления, таких как цитокины и хемокины, в тоже время повышая уровни противовоспалительных цитокинов. Ранее эти эффекты изучались в системах *in vitro* и *in vivo*, исследующих эффекты, варьирующие от толерантности к глюкозе в моделях диабета до уменьшения воспаления кишечника в моделях воспалительного заболевания кишечника.

Клеточный метаболизм осуществляет контроль над способностью иммунных клеток дифференцироваться на воспалительные субпопуляции, пролиферировать и продуцировать воспалительные цитокины и медиаторы (O'Neill, L.A., R.J. Kishton, and J. Rathmell, A guide to immunometabolism for immunologists. *Nat Rev Immunol*, 2016. 16(9): p. 553-65). Способы лечения, направленные как на иммунитет, так и на метаболизм, являются успешными в клинических испытаниях для таких заболеваний, как рак (Mullard, A., Cancer metabolism pipeline breaks new ground. *Nat Rev Drug Discov*, 2016. 15(11): p. 735-737). Сначала было продемонстрировано, что активация LANCL2, лежащая в основе механизма действия ВТ-11, вызывает метаболические эффекты в неиммунных клетках, выступая в качестве рецептора для природного и пищевого соединения, АВА (Sturla, L., et al., LANCL2 is necessary for abscisic acid binding and signaling in human granulocytes and in rat insulinoma cells. *J Biol Chem*, 2009. 284(41): p. 28045-57), и трансдуктора сигнала для продуцирования метаболических гормонов, до открытия его роли в воспалении (Lu, P., et al., Computational modeling-based discovery of novel classes of anti-inflammatory drugs that target lanthionine synthetase C-like protein 2. *PLoS One*, 2012. 7(4): p. e34643). Объединение

метаболического и иммунологического воздействий LANCL2 является особо важным механизмом действия ВТ-11 и других новых соединений, нацеленных на LANCL2.

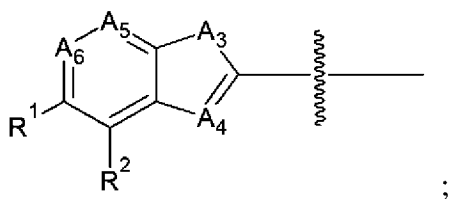
Данное изобретение предлагает использование ряда классов соединений, идентифицированных для того, чтобы нацеливаться на, связываться и активировать LANCL2, вызывая полезные иммунометаболические ответы в различных клетках для лечения заболеваний, включающих, но не ограниченных лишь этими: инфекционные заболевания, гиперпролиферативные нарушения, врожденные дефекты метаболизма, хронические иммунометаболические заболевания, аутоиммунные заболевания, отторжение трансплантированного органа, воспалительные нарушения и хроническую боль, среди прочих.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

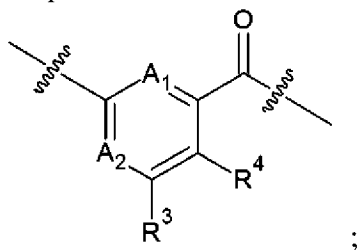
Данное изобретение относится к области терапевтических способов лечения заболеваний и нарушений. Более конкретно, данное изобретение относится к применению класса соединений для активации полезных иммунометаболических эффектов в клетках для лечения инфекционных заболеваний, гиперпролиферативных нарушений, врожденных дефектов метаболизма, хронических иммунометаболических заболеваний, аутоиммунных заболеваний, отторжения трансплантированного органа, воспалительных нарушений и хронической боли, среди прочих.

Соединения, используемые для способов лечения, описанных в данном документе, включают в себя те, которые имеют формулу Z-Y-Q-Y'-Z', или их фармацевтически приемлемую соль или сложный эфир, где:

Z представляет собой:



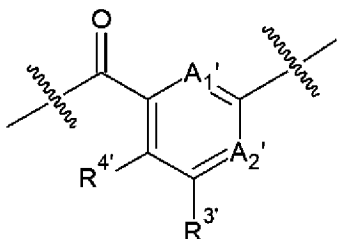
Y представляет собой:



Q представляет собой пиперазин-1,4-диил; 2,5-диазабицикло[2.2.1]гептан-2,5-диил; 2,5-диазабицикло[2.2.2]октан-2,5-диил; 1,4-дiazепан-1,4-диил; бензол-1,4-диамин-N¹,N⁴-диил; этан-1,2-диамин-N¹,N²-диил; N¹,N²-диалкилэтан-1,2-диамин-N¹,N²-диил; пропан-1,3-диамин-N¹,N³-диил; N¹,N³-диалкилпропан-1,3-диамин-N¹,N³-диил; 1,4-диаминоантрацен-9,10-дион-1,4-диил; C₆ арен-1,4-диамин-N¹,N⁴-диил, где арен замещен от одного до четырех заместителями в 2, 3, 5 или 6 позициях, и где заместители независимо выбраны из группы, состоящей из -C(O)O(от C₁ до C₆)алкила, OH, O(от C₁ до C₆)алкила, (от C₁ до

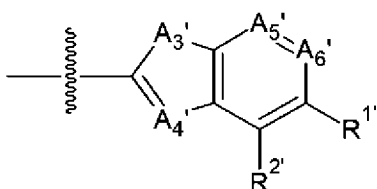
C_6 алкила, CF_3 , F, Cl, и Br; или замещенный пиперазин-1,4-диил, где пиперазин замещен от одного до восьми заместителями в 2, 3, 5 или 6 позициях и где заместители независимо выбраны из группы, состоящей из (от C_1 до C_6)алкила, арила, арил(от C_1 до C_6)алкила, $C(O)OH$, и $C(O)O$ (от C_1 до C_6)алкила;

Y' представляет собой:



или одинарную связь; и

Z' представляет собой:



или R^5 ;

где:

Y' представляет собой одинарную связь, только когда Z' представляет собой R^5 ;

A_1 и A_1' , если присутствуют, каждый независимо представляет собой N, N(от C_1 до C_6)алкил, O, S, или CR^6 ;

A_2 и A_2' , если присутствуют, каждый независимо представляет собой N или CR^7 ;

A_3 и A_3' , если присутствуют, каждый независимо представляет собой NR^8 , O, или S;

A_4 и A_4' , если присутствуют, каждый независимо представляет собой N или CR^9 ;

A_5 и A_5' , если присутствуют, каждый независимо представляет собой N или CR^{10} ;

A_6 и A_6' , если присутствуют, каждый независимо представляет собой N или CR^{11} ;

$R^1, R^1', R^2, R^2', R^3, R^3', R^4, R^4', R^5, R^6, R^7, R^8, R^9, R^{10}$ и R^{11} , если присутствуют, в каждом случае независимо выбраны из группы, состоящей из водорода; алкила; галогена; трифторметила; диалкиламина, где каждый алкил выбран независимо; $-NH_2$; алкиламина; арилалкила; гетероарилалкила; гетероциклоалкила; замещенного гетероциклоалкила, замещенного 1-2 заместителями, независимо выбранными из группы, состоящей из $-C(O)OH$, $-C(O)O$ (от C_1 до C_6)алкила, (от C_1 до C_6)алкила, $-CF_3$, F, Cl, и Br; и замещенного гетероарилалкила;

где замещенный гетероарилалкил замещен 1-3 заместителями, независимо выбранными из группы, состоящей из $-NH_2$; $-NH$ (от C_1 до C_6)алкила; $-N$ ((от C_1 до C_6)алкила) $_2$, где каждый алкил выбран независимо; алкила; галогена; арила; замещенного арила, замещенного 1-3 заместителями, независимо выбранными из группы, состоящей из $-SO_2R^{12}$, $-OR^{13}$, -галогена, $-CN$, $-CF_3$, аминоалкила-, $-S(O)R^{14}$, и алкила; гетероциклоалкила; гетероарила; замещенного арила, замещенного 1-3 заместителями,

независимо выбранными из группы, состоящей из алкила, $-\text{CF}_3$, F, Cl, и Br; алкиламина-; гетероциклоалкил-алкил-амин-; алкиламиноалкиламина-; $-\text{NHC(O)OR}^{15}$; $-\text{NHC(O)NR}^{16}\text{R}^{17}$; $-\text{C(O)NR}^{16}\text{R}^{17}$; замещенного гетероарила, замещенного 1-3 заместителями, выбранными из группы, состоящей из алкила, галогена, CN, NH_2 , $-\text{NH}(\text{C}_1\text{-C}_6\text{ алкила})$, $-\text{N}(\text{C}_1\text{-C}_6\text{ алкила})_2$, где каждый алкил выбран независимо, $-\text{CF}_3$, и замещенного арила, замещенного от 1 до 3 заместителями, независимо выбранными из группы, состоящей из $-\text{S(O)}_2\text{R}^{15}$ и $-\text{CN}$;

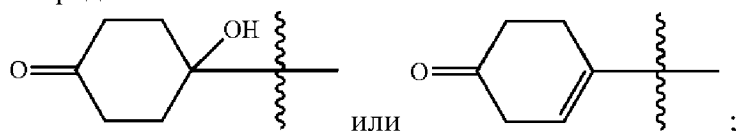
где R^{12} , R^{13} , R^{14} , R^{15} , R^{16} , и R^{17} каждый независимо выбран из группы, состоящей из $\text{C}_1\text{-C}_6$ алкила, диалкиламина, содержащего независимо выбранный $\text{C}_1\text{-C}_6$ алкил, $-\text{NH}_2$, алкиламина, гетероциклоалкила, и замещенного гетероциклоалкила с от одного до двух заместителями, независимо выбранными из группы, состоящей из $-\text{C(O)O}(\text{C}_1\text{-C}_6\text{ алкила})$ и $-\text{C}_1\text{-C}_6$ алкила.

В некоторых соединениях, A_4 представляет собой N. В некоторых соединениях, A_3 представляет собой NR^8 и A_4 представляет собой N. В некоторых соединениях, по меньшей мере один из A_3 и A_3' представляет собой O или S. В некоторых соединениях, один или оба из A_1 и A_1' представляют собой N. В некоторых соединениях, A_5 и A_5' , если присутствуют, каждый независимо представляет собой CR^{10} , и A_6 и A_6' , если присутствуют, каждый независимо представляет собой CR^{11} . В некоторых соединениях, по меньшей мере один из A_1 , A_2 , A_1' , и A_2' представляет собой N. В некоторых соединениях, один или оба из A_2 и A_2' представляют собой CH, A_3 представляет собой NH, A_4 представляет собой N, A_5 представляет собой CH, и A_6 представляет собой CH. В некоторых соединениях, один или оба из A_2 и A_2' представляют собой CH, один или оба из A_3 и A_3' представляют собой NH, один или оба из A_4 и A_4' представляют собой N, один или оба из A_5 и A_5' представляют собой CH, и один или оба из A_6 и A_6' представляют собой CH. В некоторых соединениях, Q представляет собой пиперазин-1,4-диил; 2,5-диазабицикло[2.2.1]гептан-2,5-диил; 2,5-диазабицикло[2.2.2]октан-2,5-диил; 1,4-дiazепан-1,4-диил; N^1, N^2 -диалкилэтан-1,2-диамин- N^1, N^2 -диил; N^1, N^3 -диалкилпропан-1,3-диамин- N^1, N^3 -диил; 1,4-диаминоантрацен-9,10-дион-1,4-диил; C_6 арен-1,4-диамин- N^1, N^4 -диил, где арен замещен от одного до четырех заместителями в 2, 3, 5, или 6 позициях и каждый заместитель независимо выбран из группы, состоящей из $-\text{C(O)O}$ (от C_1 до C_6)алкила, OH, O(от C_1 до C_6)алкила, (от C_1 до C_6)алкила, CF_3 , F, Cl, и Br; или замещенный пиперазин-1,4-диил, где пиперазин замещен от одного до восьми заместителями в 2, 3, 5, или 6 позициях и каждый заместитель независимо выбран из группы, состоящей из (от C_1 до C_6)алкила, арила, арил(от C_1 до C_6)алкила, C(O)OH , и C(O)O (от C_1 до C_6)алкила. В некоторых соединениях, R^1 , $\text{R}^{1'}$, R^2 , $\text{R}^{2'}$, R^3 , $\text{R}^{3'}$, R^4 , $\text{R}^{4'}$, R^5 , R^6 , R^7 , R^8 , R^9 , R^{10} , и R^{11} , если присутствуют, в каждом случае независимо выбраны из группы, состоящей из водорода, алкила, галогена, трифторметила, диалкиламина, где каждый алкил является тем же или отличающимся, $-\text{NH}_2$, алкиламина, арила и ариалкила.

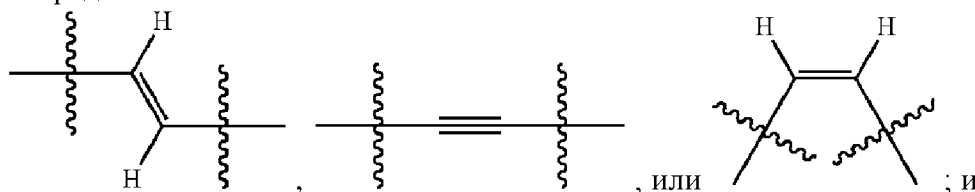
Другие соединения, подходящие для применения в описанных в данном документе способах лечения, включают в себя соединения, содержащие формулу A-B-C, или их

фармацевтически приемлемую соль или сложный эфир, где:

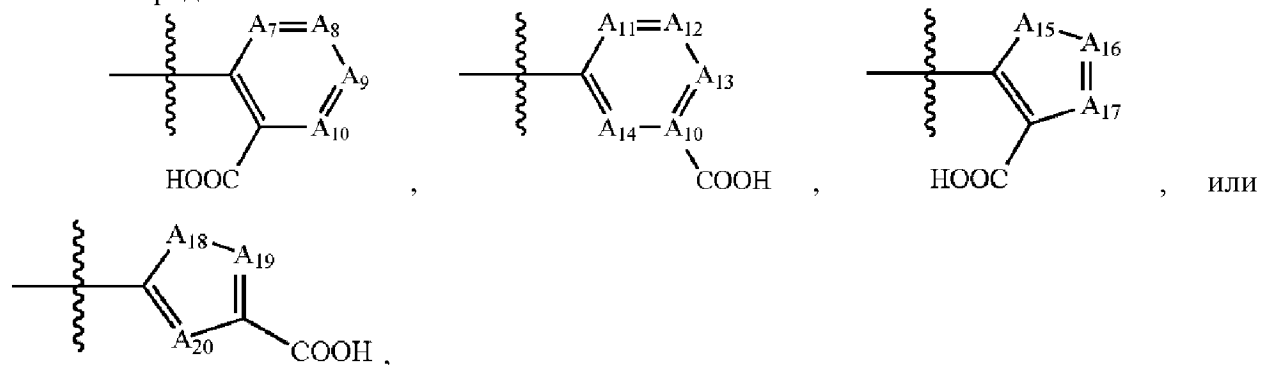
A представляет собой:



B представляет собой:



C представляет собой:



где:

A_7 , A_8 , A_9 , A_{10} , A_{11} , A_{12} , A_{13} , и A_{14} каждый независимо выбран из CH , CR^{18} , и N ;

A_{15} , A_{16} , A_{17} , A_{18} , A_{19} , и A_{20} каждый независимо выбран из CH , CR^{19} , N , NR^{20} , O , и S , с условием, что только один из A_{15} , A_{16} , и A_{17} может представлять собой N , NR^{20} , O , или S , и только один из A_{18} , A_{19} , и A_{20} может представлять собой N , NR^{20} , O , или S ;

R^{18} и R^{19} каждый независимо выбран из C_1 - C_6 алкила; C_1 - C_6 диалкиламина, где каждый C_1 - C_6 алкил выбран независимо; $-\text{NH}_2$; алкиламина; гетероциклоалкила; и замещенного гетероциклоалкила, где замещенный гетероциклоалкил замещен от одного до двух заместителями, независимо выбранными из группы, состоящей из: $-\text{C}(\text{O})\text{O}(\text{C}_1$ - C_6 алкила) и C_1 - C_6 алкила; при этом в соединениях с более чем одним CR^{18} каждый R^{18} выбран независимо, и в соединениях с более чем одним CR^{19} каждый R^{19} выбран независимо; и

R^{20} представляет собой C_1 - C_6 алкил.

Другие соединения, подходящие для применения в описанных в данном документе способах лечения, включают в себя любое соединение, раскрытое или охваченное любой формулой, раскрытой в патенте США № 9,556,146. Патент США № 9,556,146 полностью включен в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

Данное изобретение предлагает способы лечения патологии у животного с помощью любого одного или большего количества соединений, описанных в данном документе. Способы могут включать в себя введение животному эффективного количества одного или большего количества соединений, описанных в данном документе.

Данное изобретение также предлагает способы получения подготовленной клетки из клетки-предшественника с помощью соединений, описанных в данном документе. Способы могут включать в себя *in vitro* приведение в контакт клетки-предшественника с одним или большим количеством соединений, описанных в данном документе, для получения подготовленной клетки.

Данное изобретение также относится к выделенным клеткам, полученным путем *in vitro* приведения в контакт клетки-предшественника с одним или большим количеством соединений, описанных в данном документе, для получения подготовленной клетки.

Данное изобретение также предлагает способы лечения патологии у животного с помощью подготовленной клетки, как описано в данном документе. Способы включают в себя введение подготовленной клетки животному в количестве, достаточном для лечения патологии.

Патологии, поддающиеся лечению соединениями или клетками, описанными в данном документе, могут включать в себя инфекционное заболевание, гиперпролиферативное нарушение, врожденный дефект метаболизма, хроническое иммунометаболическое заболевание, аутоиммунное заболевание, отторжение трансплантированного органа, воспалительное нарушение и хроническую боль. В некоторых вариантах осуществления, инфекционное заболевание включает в себя бактериальное заболевание. В некоторых вариантах осуществления, бактериальное заболевание включает в себя инфекцию *C. difficile*. В некоторых вариантах осуществления, гиперпролиферативное нарушение включает в себя рак. В некоторых вариантах осуществления, рак включает в себя рак желудочно-кишечного тракта. В некоторых вариантах осуществления, рак желудочно-кишечного тракта включает в себя колоректальный рак. В некоторых вариантах осуществления, гиперпролиферативное нарушение включает в себя семейный аденоматозный полипоз. В некоторых вариантах осуществления, врожденный дефект метаболизма включает в себя болезнь накопления гликогена. В некоторых вариантах осуществления, болезнь накопления гликогена включает в себя болезнь Андерсена. В некоторых вариантах осуществления, хроническое иммунометаболическое заболевание включает в себя сердечно-сосудистое заболевание. В некоторых вариантах осуществления, сердечно-сосудистое заболевание включает в себя атеросклероз. В некоторых вариантах осуществления, хроническое иммунометаболическое заболевание включает в себя гипертонию. В некоторых вариантах осуществления, аутоиммунное заболевание включает в себя по меньшей мере одно из следующего: волчанку и рассеянный склероз. В некоторых вариантах осуществления, аутоиммунное заболевание включает в себя аутоиммунное заболевание, вызванное иммунотерапией рака. В некоторых вариантах осуществления, аутоиммунное заболевание, вызванное иммунотерапией рака, включает в себя ревматическое заболевание, вызванное иммунотерапией рака. В некоторых вариантах осуществления, воспалительное нарушение включает в себя острый дивертикулит толстой кишки. В некоторых вариантах осуществления, воспалительное нарушение включает в себя

вызванное облучением воспаление желудочно-кишечного тракта. В некоторых вариантах осуществления, вызванное облучением воспаление желудочно-кишечного тракта включает в себя по меньшей мере одно из следующего: лучевой проктит, лучевой энтерит и лучевой проктосигмоидит. В некоторых вариантах осуществления, хроническая боль включает в себя фибромиалгию. В некоторых вариантах осуществления, патология включает в себя воспалительное заболевание кишечника, такое как болезнь Крона или язвенный колит.

Объекты и преимущества данного изобретения станут более понятными из следующего подробного описания предпочтительного варианта осуществления данного изобретения, приведенного вместе с прилагаемыми графическими материалами.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Фиг. 1A-1F. ВТ-11 подавляет развитие болезни в Mdr1a^{-/-} модели колита. ВТ-11 снижает индекс активности заболевания (Фиг. 1A, панель A). Репрезентативные микрофотографии окрашенных ГЭ срезов толстой кишки животных в возрасте десяти недель, обработанных носителем (Фиг. 1A, панель B) и ВТ-11 (Фиг. 1A, панель C). Иммунофенотипирование Th1 (CD3⁺ CD4⁺ CD8⁻ NK1.1⁻ Tbet⁺ ИФН γ ⁺), Th17 (CD3⁺ CD4⁺ CD8⁻ NK1.1⁻ ROR γ T⁺ ИЛ17⁺) и Трег (регуляторные Т-лимфоциты) (CD3⁺ CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺ ИЛ10⁺) клеток, соответственно в собственной пластинке толстой кишки (Фиг. 1B, панели D-F) и в брыжеечных лимфатических узлах (Фиг. 1C, панели G-I), в возрасте десяти недель. кОТ-ПЦР целой толстой кишки для ИФН γ (Фиг. 1D, панель J), ИЛ17a (Фиг. 1D, панель K), Msr1 (Фиг. 1E, панель L), ФНОa (Фиг. 1E, панель M), Lancl2 (Фиг. 1F, панель N) и ИЛ6 (Фиг. 1F, панель O), с нормализацией по β -актину. Статистическая значимость для группы обработки (n=10) отмечена * (P<0,05) и ** (P<0,01).

Фиг. 2A-2C. Потеря Lancl2 в CD4⁺ Т-лимфоцитах отменяет эффекты ВТ-11 в модели ДСН (декстран сульфат натрия). Активность заболевания (Фиг. 2A, панель A) и изменение массы (Фиг. 2A, панель B) в течение семидневного воздействия ДСН, после чего следовали три дня со стандартной водой. Репрезентативные микрофотографии окрашенных ГЭ срезов толстой кишки (Фиг. 2B, панель C) на седьмой день воздействия ДСН у мышей дикого типа, обработанных носителем и ВТ-11, и у мышей Lancl2 Δ T, обработанных носителем и ВТ-11. Иммунофенотипирование Th1 (CD3⁺ CD4⁺ CD8⁻ NK1.1⁻ Tbet⁺ ИФН γ ⁺), Th17 (CD3⁺ CD4⁺ CD8⁻ NK1.1⁻ ROR γ T⁺ ИЛ17⁺), и Трег (CD3⁺ CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺ ИЛ10⁺) клеток, в собственной пластинке толстой кишки, соответственно (Фиг. 2C, панели D-F), на 7-мой день воздействия ДСН. кОТ-ПЦР целой толстой кишки для ИФН γ (Фиг. 2C, панель G), ИЛ17a (Фиг. 2C, панель H), ФНОa (Фиг. 2C, панель I), и ИЛ6 (Фиг. 2C, панель J), с нормализацией по β -актину. Статистическая значимость для группы обработки (n=10) отмечена * (P<0,05) и ** (P<0,01), а для группы генотипа (n=10) отмечена # (P<0,05).

Фиг. 3A-3C. ВТ-11 оказывает первичное воздействие через регуляторные CD4⁺ Т-лимфоциты. Индекс активности заболевания у мышей Rag2^{-/-}, которым были перенесены

эффекторные CD4⁺ Т-лимфоциты ДТ (Фиг. 3А, панель А) и *Lancl2*^{-/-} (Фиг. 3А, панель В), в комбинации с отсутствующими, ДТ или *Lancl2*^{-/-} регуляторным CD4⁺ Т-лимфоцитами с момента переноса до 6 недели после переноса. Обобщенные оценки лейкоцитарной инфильтрации в срезе толстой кишки через шесть недель после переноса, полученные посредством гистопатологического исследования (Фиг. 3В, панель С). Иммунофенотипирование клеток Th1 (CD3⁺ CD4⁺ CD8⁻ NK1.1⁻ Tbet⁺ ИФН γ ⁺) и нейтрофилов (Gr1hiCD11b⁺) соответственно в собственной пластинке толстой кишки (Фиг. 3В, панели D-E; Фиг. 3С, панели F-H). Статистическая значимость для группы обработки (n=10) отмечена * (P<0,05) и ** (P<0,01).

Фиг. 4. ВТ-11 индуцирует повышенную стабильность и супрессивную функцию в *in vitro* дифференцированных Трег. Измерение 24-часовой клеточной пролиферации путем окрашивания СЭКФ (сукцинимидиловый сложный эфир карбоксифлуоресцеина, CFSE) (панель А), и продуцирования ФНО α (панель В) и ИФН γ (панель С) CD4⁺ Т-лимфоцитами с помощью цитометрического анализа с гранулами, которые совместно культивировали с *in vitro* дифференцированными Трег, обработанными ВТ-11 (0, 0,00975, 0,039, 0,625 мкМ). Экспрессия генов *Socs2* (панель D), *Irf7* (панель E), *Ikzf2* (панель F), *Carn3* (панель G), *Lag3* (панель H), *P2rx7* (панель I) в Трег после 48 часов обработки ВТ-11. Статистическая значимость для группы обработки (n=9) отмечена * (P<0,05) и ** (P<0,01).

Фиг. 5А-5В. ВТ-11 влияет на позднюю стадию гликолиза и влияет на дифференцировку Трег. Экспрессия генов *Pkm2* (Фиг. 5А, панель А) и *Eno1* (Фиг. 5А, панель В) в Трге ДТ и *Lancl2*^{-/-}, обработанных ВТ-11 (0, 0,00975, 0,039, 0,625 мкМ). Ферментная активность пируваткиназы (Фиг. 5А, панель С) и пируватдегидрогеназы (Фиг. 5В, панель F) в Трег ДТ, обработанных ВТ-11 (0, 0,00975, 0,039, 0,156, 0,625 мкМ; слева направо). Внутриклеточная концентрация ФЕП (фосфоенолпируват) (Фиг. 5В, панель D) в Трег ДТ, обработанных ВТ-11 (0, 0,00975, 0,039, 0,156, 0,625 мкМ; слева направо). Внутриклеточная концентрация ФЕП (Фиг. 5В, панель E) и активность пируватдегидрогеназы (Фиг. 5В, панель G) при обработке PS-48 (0, 0,00975, 0,156 мкМ ВТ-11; слева направо). Дифференциация CD4⁺ Т-лимфоцитов ДТ и *Lancl2*^{-/-} в Трег (Фиг. 5В, панель H) в присутствии PS-48, тапсигаргина или *DASA-58* и ВТ-11 (0, 0,00975, 0,039, 0,156, 0,625 мкМ; слева направо). Статистическая значимость для группы обработки (n=9) отмечена * (P<0,05) и ** (P<0,01).

Фиг. 6А-6С. Подтверждение *in vivo* иммунометаболического эффекта ВТ-11. Репрезентативные микрофотографии окрашенных ГЭ срезов толстой кишки мышей в возрасте десяти недель, обработанных носителем (Фиг. 6А, панели А, С) и ВТ-11 (Фиг. 6А, панели В, D), с и без введения PS-48, соответственно. Гистологические оценки толстой кишки в возрасте десяти недель (Фиг. 6В, панели E-G). Иммунофенотипирование совокупных клеток CD4⁺, Трег (CD3⁺ CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺ ИЛ10⁺), Th17 (CD3⁺ CD4⁺ CD8⁻ NK1.1⁻ ROR γ T⁺ ИЛ17⁺), соответственно собственной пластинки толстой кишки (Фиг. 6В, панели H-J) в возрасте десяти недель. Концентрация ФЕП (Фиг. 6С, панель K) и активность пируватдегидрогеназы (Фиг. 6С, панель L) в целой толстой кишке в возрасте

десяти недель. кОТ-ПЦР целой толстой кишки для *Ifng* (Фиг. 6С, панель М), *ФНОα* (Фиг. 6С, панель N), *Foxp3-E2* (Фиг. 6С, панель O), *Foxp3* (Фиг. 6С, панель P), *Socs2* (Фиг. 6С, панель Q) и *Carn3* (Фиг. 6С, панель R), с нормализацией по β -актину. Условия для панелей E-R (слева направо): носитель, ВТ-11 (8 мг/кг), носитель с PS-48, и ВТ-11 (8 мг/кг) с PS-48. Статистическая значимость для группы обработки (n=10) отмечена * (P<0,05) и ** (P<0,01).

Фиг. 7А-7Е. Подтверждение иммунометаболических эффектов ВТ-11 с помощью МКПК человека. Процент клеток ИЛ10⁺ (Фиг. 7А, панель А), *FOXP3*⁺ (Фиг. 7А, панель В), *ФНОα*⁺ (Фиг. 7В, панель С) и *ИФНγ*⁺ (Фиг. 7В, панель D) среди МКПК из доноров с болезнью Крона после 24-часового культивирования с ВТ-11 (0, 0,00975, 0,0195, 0,039, 0,156, 0,625 мкМ). Процент клеток ИЛ10⁺ (Фиг. 7С, панель E) и *ИФНγ*⁺ (Фиг. 7С, панель F) среди МКПК с подвергнутым сайленсингу *Lancl2*, после 24-часового культивирования с ВТ-11 (0, 0,00975, 0,0195, 0,039, 0,156, 0,625 мкМ). Экспрессия генов *Lag3* (Фиг. 7D, панель G), *Socs2* (Фиг. 7D, панель H), *Ifi7* (Фиг. 7D, панель I), *P2rx7* (Фиг. 7D, панель J), *Carn3* (Фиг. 7D, панель K), *Ikzf2* (Фиг. 7D, панель L) в наивных CD4⁺ Т-лимфоцитах, выделенных из человеческих МКПК, дифференцированных в Трег в присутствии ВТ-11. Активность пируваткиназы (Фиг. 7Е, панель M) *in vitro* дифференцированных Трег человека. Процент клеток *FOXP3*⁺ (Фиг. 7Е, панель N) и *ИФНγ*⁺ (Фиг. 7Е, панель O) после 24-часового культивирования с ВТ-11 (0, 0,00975, 0,0195, 0,039, 0,156, 0,625 мкМ), и в присутствии тапсигаргина или внешнего ФЕП. Статистическая значимость для группы обработки (n=9) отмечена * (P<0,05) и ** (P<0,01).

Фиг. 8. Изменения микробиома у мышей, инфицированных *S. difficile*, в результате обработки ВТ-11 в качестве лиганда *LANCL2*, и у неинфицированных мышей с нокаутом *LANCL2*.

Фиг. 9. Колониеобразующие единицы *S. difficile*, продуцирование Токсина А (*TcdA*) и Токсина В (*TcdB*), и формирование спор в контрольной, обработанной ванкомицином и обработанной ВТ-11 среде из нарезанного мяса.

Фиг. 10А-С. Эффекты ВТ-11 в отношении уменьшения воспаления, смертности и тяжести инфекции *S. difficile*.

Фиг. 11А-11В. ИЛ-2 и ВТ-11 усиливают дифференцировку CD25⁺ *FOXP3*⁺ Т-лимфоцитов. Наивные CD4⁺ Т-лимфоциты выделяли из селезенок мышей дикого типа и дифференцировали в регуляторные CD4⁺ Т-лимфоциты в присутствии носителя или обработки ВТ-11 (10, 100 нМ). Разделение на клетки CD25⁺ *FOXP3*⁺ (Фиг. 11А, панель А) и CD25⁺ *Tbet*⁺ (Фиг. 11В, панель В) в стандартной среде для дифференцировки или среде для дифференцировки, содержащей ИЛ-2 (10 нг/мл), с помощью проточной цитометрии. Разделение на клетки CD25⁺ *FOXP3*⁺ (Фиг. 11А, панель С) и CD25⁺ *Tbet*⁺ (Фиг. 11В, панель D) в стандартной среде для дифференцировки или среде для дифференцировки, содержащей ИЛ-12 (10 нг/мл), с помощью проточной цитометрии. Данные отображаются как среднее с СОС (среднеквадратичная ошибка среднего) (n=8). Статистическая значимость (P<0,05) для обработки обозначена звездочкой (*), а при наличии ИЛ-2/ИЛ-12

- (#).

Фиг. 12А-12D. ВТ-11 увеличивается фосфорилирование STAT5, чтобы установить стабильную CD25+ клеточную дифференцировку. Экспрессия Stat5a (Фиг. 12А, панель А), Pten (Фиг. 12А, панель В), Foxo1 (Фиг. 12А, панель С) и Phlpp1 (Фиг. 12А, панель D) согласно кОТ-ПЦР в CD4+ Т-лимфоцитах, выделенных из толстой кишки мышей Mdr1a-/-, обработанных носителем и ВТ-11, в возрасте 10 недель во время активной фазы заболевания. Нормализованная экспрессия p-STAT5a (Фиг. 12В, панель Е) и p-FOXO1 (Фиг. 12В, панель F) согласно вестерн-блоттингу в *in vitro* дифференцированных Трег с носителем или ВТ-11 (10, 100 нМ), с или без ИЛ-2 (10 нг/мл) или ИЛ-12 (10 нг/мл). Разделение на клетки CD25+ FOXP3+ (Фиг. 12С, панель G) и CD25+ Tbet+ (Фиг. 12С, панель H) в среде для дифференцировки, содержащей ИЛ-2 (10 нг/мл) и ингибиторы SF1670 или STAT5i, с помощью проточной цитометрии. Разделение на клетки CD25+ FOXP3+ (Фиг. 12D, панель I) и CD25+ Tbet+ (Фиг. 12D, панель J) в среде для дифференцировки, содержащей ИЛ-12 (10 нг/мл) и ингибиторы SF1670 или STAT5i, с помощью проточной цитометрии. Данные отображаются как среднее с СОС (среднеквадратичная ошибка среднего) (n=8). Статистическая значимость (P<0,05) для обработки обозначена звездочкой (*), а при наличии ингибитора - (#).

Фиг. 13. Обработка *ex vivo* регуляторных CD4+ Т-лимфоцитов стимулирует усиление регуляторных эффектов *in vivo*. Мышам были адоптивно перенесены эффекторные Т-лимфоциты (Тэфф) и регуляторные CD4+ Т-лимфоциты (Трег), которые *ex vivo* обрабатывали ВТ-11 или носителем в течение 12 часов. Мыши, которые получили Трег, обработанные ВТ-11, имели более низкую кумулятивную активность заболевания (воспаление кишечника) и сдвиги в популяциях CD4+ Т-лимфоцитов толстой кишки спустя пять недель после переноса.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Термин «алкил» сам по себе или как часть другого заместителя, означает, если не указано иное, полностью насыщенный, с прямой цепью, с разветвленной цепью или циклический углеводородный радикал или их комбинацию, и может включать в себя ди- и мультивалентные радикалы, с указанным числом атомов углерода (например, C₁-C₁₀ означает от одного до десяти атомов углерода, включительно). Примеры алкильных групп включают в себя, без ограничения, метил, этил, н-пропил, изопропил, н-бутил, трет-бутил, изобутил, втор-бутил, циклогексил, (циклогексил)этил, циклопропилметил, и их гомологи и изомеры, например, н-пентил, н-гексил, н-гептил, н-октил и т. п. Термин «алкил», если не указано иное, также включает в себя те производные алкила, определенные более подробно ниже, как «гетероалкил» и «циклоалкил».

Термин «алкенил» обозначает алкильную группу, как определено выше, за исключением того, что она содержит одну или большее количество двойных связей. Примеры алкенильных групп включают в себя винил, 2-пропенил, кротил, 2-изопентенил, 2-(бутадиенил), 2,4-пентадиенил, 3-(1,4-пентадиенил) и т. д., а также высшие гомологи и изомеры.

Термин «алкинил» обозначает алкильную или алкенильную группу, как определено выше, за исключением того, что она содержит одну или большее количество тройных связей. Примеры алкинильных групп включают в себя этинил, 1- и 3-пропинил, 3-бутинил и т. п., включая в себя высшие гомологи и изомеры.

Термины «алкилен», «алкенилен» и «алкинилен», отдельно или как часть другого заместителя, обозначают двухвалентный радикал, полученный из алкильной, алкенильной или алкинильной группы, соответственно, как проиллюстрировано в качестве примера с помощью $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$.

Как правило, алкильные, алкенильные, алкинильные, алкиленильные, алкениленильные и алкиниленильные группы будут иметь от 1 до 24 атомов углерода. Эти группы с 10 или меньшим числом атомов углерода являются предпочтительными в данном изобретении. Термин «низший» при применении к любой из этих групп, как в «низшем алкиле» или «низшем алкилене», обозначает группу с 10 или меньшим количеством атомов углерода.

«Замещенный» относится к химической группе, как описано в данном документе, которая дополнительно включает в себя один или большее количество заместителей, таких как низший алкил, арил, ацил, галоген (например, алкилгалоген, такой как CF_3), гидроксильный, амино, алкокси, алкиламино, ациламино, тиоамидо, ацилокси, арилокси, арилоксиалкил, меркапто, тиа, аза, оксо, как насыщенные, так и ненасыщенные циклические углеводороды, гетероциклы и т. п. Эти группы могут присоединяться к любому углероду или заместителю алкильных, алкенильных, алкинильных, алкиленильных, алкениленильных и алкиниленильных фрагментов. Кроме того, эти группы могут присоединяться как боковые группы или быть цельными с самой углеродной цепочкой.

Термин «арил» используется в данном документе для обозначения ароматического заместителя, который может быть одним ароматическим кольцом или множеством ароматических колец, которые сконденсированы вместе, ковалентно связаны или связаны с общей группой, такой как диазо, метиленовый или этиленовый фрагмент. Общей связующей группой также может быть карбонил, как в бензофеноне. Ароматическое кольцо (кольца) может включать в себя, например, фенил, нафтил, бифенил, дифенилметил и бензофенон, среди прочих. Термин «арил» охватывает «арилалкил» и «замещенный арил». Для фенильных групп арильное кольцо может быть моно-, ди-, три-, тетра- или пентазамещенным. Кольца большего размера могут быть незамещенными или содержать один или большее количество заместителей.

«Замещенный арил» относится к арилу, как только что было описано, включающему в себя одну или большее количество функциональных групп, таких как низший алкил, ацил, галоген, алкилгалоген (например, CF_3), гидроксильный, амино, алкокси, алкиламино, ациламино, ацилокси, фенокси, меркапто, и как насыщенные, так и ненасыщенные циклические углеводороды, которые сконденсированы с ароматическим кольцом (кольцами), ковалентно связаны или присоединены к общей группе, такой как

диазо, метилен или этиленовый фрагмент. Связующей группой может также быть карбонил, как, например, в циклогексилфенилкетоне. Термин «замещенный арил» охватывает «замещенный арилалкил».

Термин «галоген» или «гало» используется в данном документе для обозначения атомов фтора, брома, хлора и йода.

Термин «гидрокси» используется в данном документе для обозначения группы -ОН.

Термин «амино» используется для обозначения NRR' , где R и R' независимо представляют собой H, алкил, алкенил, алкинил, арил или их замещенные аналоги. «Амино» охватывает «алкиламино», обозначающее вторичные и третичные амины, и «ациламино» описывает группу $\text{RC(O)NR}'$.

В ходе способов данного изобретения, терапевтически эффективное количество соединений согласно данному изобретению может быть введено животному, включая млекопитающих и людей, различными путями. Хотя в предпочтительном варианте, соединения согласно данному изобретению вводят перорально или парентерально, также предусмотрены и другие формы введения, такие как посредством медицинских соединений или аэрозолей.

Для перорального введения эффективное количество соединений может быть введено, например, в твердом, полутвердом, жидком или газообразном состоянии. Конкретные примеры включают в себя агенты в виде таблетки, капсулы, порошка, гранулы, раствора, суспензии, сиропа и эликсира. Однако соединения не ограничиваются этими формами.

Для приготовления соединений согласно данному изобретению в виде таблеток, капсул, порошков, гранул, растворов или суспензий, соединение предпочтительно смешивают с связующим, разрыхляющим агентом и/или смазывающим агентом. Если необходимо, полученная композиция может быть смешана с разбавителем, буфером, инфильтрующим агентом, консервантом и/или ароматизатором, используя известные способы. Примеры связующего вещества включают в себя кристаллическую целлюлозу, производные целлюлозы, кукурузный крахмал, циклодекстрины и желатин. Примеры разрыхляющего агента включают в себя кукурузный крахмал, картофельный крахмал и натрий карбоксиметилцеллюлозу. Примеры смазывающего агента включают в себя тальк и стеарат магния. Дополнительно, также могут быть использованы добавки, которые используются традиционно, такие как лактоза и маннит.

Соединения согласно данному изобретению также могут быть введены ректально. Для ректального введения может быть использован суппозиторий. Суппозиторий может быть приготовлен путем смешивания соединений согласно данному изобретению с фармацевтически подходящим наполнителем, который плавится при температуре тела, но остается твердым при комнатной температуре. Примеры включают в себя, но не ограничиваются лишь этими: масло какао, углеродный воск и полиэтиленгликоль. Полученная композиция может быть отлита в любую желаемую форму с использованием способов, известных в данной области техники.

Для парентерального введения, соединения согласно данному изобретению могут вводиться путем инъекции. Для введения путем инъекции, соединения согласно данному изобретению могут вводиться подкожно, внутривожно, внутривенно или внутримышечно. Лекарственные препараты для такой инъекции могут быть приготовлены растворением, суспендированием или эмульгированием соединений согласно данному изобретению в водном или неводном растворителе, таком как растительное масло, глицерид синтетической смоляной кислоты, сложный эфир высшей жирной кислоты или пропиленгликоль, с помощью известного способа. При необходимости, также могут быть добавлены добавки, такие как солюбилизующий агент, осморегулирующий агент, эмульгатор, стабилизатор или консервант, которые обычно используются. Хотя и не требуется, предпочтительно, чтобы композиция была стерильной или стерилизованной.

Для приготовления соединений согласно данному изобретению в виде суспензий, сиропов или эликсиров может быть использован фармацевтически приемлемый растворитель. В качестве неограничивающего примера, включена, помимо прочего, вода.

Соединения согласно данному изобретению также можно использовать вместе с дополнительным соединением, имеющим другую фармацевтически подходящую активность, для получения лекарственного средства. Лекарственное средство, либо содержащее соединение согласно данному изобретению в качестве отдельного соединения, либо в качестве части композиции, может быть использовано для лечения субъектов, нуждающихся в этом.

Соединения согласно данному изобретению также могут вводиться в форме аэрозоля или ингалянта, приготовленного путем загрузки соединений в форме жидкости или мелкого порошка, вместе с газообразным или жидким распыляющим агентом и, при необходимости, известным вспомогательным агентом, таким как газообразующий агент, в контейнер при обычном давлении, такой как аэрозольный баллончик или ингалятор. В качестве распыляющего агента может быть использован сжатый газ, например, дихлорфторметан, пропан или азот.

Соединения согласно изобретению могут вводиться животному, включая млекопитающих и людей, которые нуждаются в этом, в виде фармацевтической композиции, такой как таблетки, капсулы, растворы или эмульсии. Введение других форм соединений, описанных в данном изобретении, включающих в себя, но неограниченных лишь этими: их сложные эфиры, их фармацевтически приемлемые соли, их метаболиты, их структурно родственные соединения, их аналоги и их комбинации, в виде одной дозы или в виде множества доз, также предусмотрено данным изобретением.

Термины «предотвращение», «лечение», «защита» или «облегчение» и подобные термины, используемые в данном документе, включают в себя профилактику и полное или частичное лечение. Термины могут также включать в себя уменьшение симптомов, облегчение симптомов, уменьшение тяжести симптомов, уменьшение частоты возникновения заболевания, индукцию ремиссии, поддержание ремиссии или любое другое изменение состояния пациента, которое улучшает терапевтический результат.

Новые соединения, описанные в данном изобретении, предпочтительно используются и/или вводятся в форме композиции. Подходящими композициями являются, предпочтительно, фармацевтическая композиция, пищевой продукт или пищевая добавка. Эти композиции обеспечивают удобную форму в которой доставляются соединения. Композиции согласно данному изобретению могут содержать антиоксидант в количестве, эффективном для повышения стабильности соединений в отношении окисления или растворимости.

Количество соединения, которое вводят в способе согласно данному изобретению или которое предназначено для введения при использовании данного изобретения, представляет собой любое подходящее количество. Предпочтительно оно составляет от около 0,00001 г до около 20 г (более предпочтительно от 0,01 г до 1 г, например от 0,05 г до 0,5 г) соединения в день. Подходящие композиции могут быть приготовлены соответствующим образом. Специалисты в области дозирования биологически активных агентов смогут разработать конкретные схемы дозирования для различных субъектов на основе известных и хорошо понятных параметров.

Предпочтительная композиция согласно данному изобретению представляет собой фармацевтическую композицию, например, в виде таблеток, пилюль, капсул, каплет, в виде множества частиц (включая гранулы, шарики, пеллеты и микроинкапсулированные частицы), порошков, эликсиров, сиропов, суспензий, гидрогелей, таких как нацеленные на воспаление гидрогели, и растворов. Фармацевтические композиции обычно содержат фармацевтически приемлемый разбавитель или носитель. Фармацевтические композиции предпочтительно адаптированы к парентеральному или пероральному введению. Композиции для перорального введения могут быть в твердой или жидкой форме и могут, принимать форму таблеток, порошков, суспензий и сиропов, среди прочего. Необязательно, композиции содержат один или большее количество ароматизаторов и/или красителей. В целом, терапевтические и пищевые композиции могут содержать любое вещество, которое не оказывает существенного влияния на действие соединений на субъекта.

Фармацевтически приемлемые носители, подходящие для использования в таких композициях, хорошо известны в области фармацевтики. Композиции согласно данному изобретению могут содержать 0,01-99% по массе соединений согласно данному изобретению. Композиции согласно данному изобретению обычно готовят в виде единицы формы дозирования. Предпочтительно, единица формы дозирования соединений, описанных в данном изобретении, составляет от 1 до 1000 мг (более предпочтительно от 50 до 500 мг). Наполнители, используемые при приготовлении этих композиций, являются известными в данной области техники наполнителям.

Дополнительные примеры форм продуктов для композиции представляют собой пищевые добавки, например, в виде мягкой гелеобразной или твердой капсулы, содержащей инкапсулирующий материал, выбранный из группы, состоящей из желатина, крахмала, модифицированного крахмала, производных крахмала, таких как глюкоза,

сахароза, лактоза и фруктоза. Необязательно, инкапсулирующий материал может содержать сшивающие или полимеризующие агенты, стабилизаторы, антиоксиданты, светопоглощающие агенты для защиты светочувствительных наполнителей, консерванты и тому подобное. Предпочтительно единица формы дозирования соединений в пищевых добавках представляет собой от 1 до 1000 мг (более предпочтительно от 50 до 500 мг).

В целом, термин «носитель» может быть использован во всей данной заявке для представления композиции, с которой описанные соединения могут быть смешаны, будучи ее фармацевтическим носителем, пищевым продуктом, пищевой добавкой или диетической добавкой. Материалы, описанные выше, могут считаться носителями для целей согласно изобретению. В некоторых вариантах осуществления согласно данному изобретению, носитель практически не имеет биологической активности в отношении соединений согласно данному изобретению.

Доза: Способы согласно данному изобретению могут включать в себя введение терапевтически эффективного количества соединения нуждающемуся в этом животному. Эффективное количество соединения зависит от формы вводимого соединения, продолжительности введения, пути введения (например, перорального или парентерального), возраста животного и состояния животного, включая млекопитающих и людей.

Например, количество соединения, эффективное для лечения или профилактики патологий, описанных в данном документе, у животного, может составлять 0,1-10000 мг/кг/день. Предпочтительное эффективное количество соединения составляет от 1 до 5000 мг/кг/сутки, более предпочтительная доза составляет от 2 до 100 мг/кг/сутки. Верхний предел эффективного количества, подлежащего введению, не является критическим, поскольку соединения нетоксичны, как демонстрируют наши данные по токсикологии. Эффективное количество соединения является наиболее эффективным в лечении или профилактике патологий, описанных в данном документе, у животного, когда его вводят животному в течение периодов, составляющих около от 7 до 100 дней, с предпочтительным периодом от 15 до 50 дней и наиболее предпочтительным периодом от 30 до 42 дней.

Количество соединения, наиболее эффективное для предотвращения чрезмерной активации или дисрегуляции иммунной системы, приводящей к аутоиммунным, воспалительным или метаболическим заболеваниям, может составлять от 0,1 до 500 мг/кг/сутки, с предпочтительной дозой от 1 до 150 мг/кг/сутки.

Когда эффективное количество соединения согласно данному изобретению вводят в виде терапевтической, медицинской или ветеринарной композиции, предпочтительная доза составляет от около 0,01 до 2,0% мас./мас. от лекарственного продукта.

В некоторых других вариантах осуществления, согласно данному изобретению предложено использование LANCL2-связывающих соединений, а также структурно родственных соединений, например соединения, выбранного из группы, состоящей из соединения, его сложных эфиров, его фармацевтически подходящих солей, его

метаболитов, его структурно родственных соединений, или их комбинаций, в лечении и профилактике иммунометаболического заболевания.

Кроме того, в целом, данное изобретение относится к предотвращению дефектов или восстановлению гомеостаза в отношении путей иммунометаболизма, которые помогают останавливать аутоиммунные, воспалительные, метаболические или инфекционные заболевания, причем соответствующие пути включают в себя метаболизм и хранение глюкозы, метаболизм и хранение жирных кислот, метаболизм и хранение аминокислот, баланс кальция, метаболизм циклического АМФ, воспалительные пути, такие как сигналинг TLR и NLR, или сигналинг NF-κB, которые контролируют выработку провоспалительных цитокинов (фактор некроза опухолей альфа, гамма-интерферон, интерлейкин-6 и хемоаттрактантный белок 1 моноцитов) и регуляторные пути, такие как активность FOXP3 или сигналинг ИЛ-10. Эффект является результатом воздействия соединения на различные типы клеток в организме, которое вызывает биологический эффект. Клетки могут включать в себя, но не ограничиваются лишь этим: клетки тканей желудочно-кишечного тракта, иммунные клетки (т. е., макрофаги, моноциты, лимфоциты), мышечные клетки, эндотелиальные клетки или эпителиальные клетки. В некоторых вариантах осуществления, данное изобретение предлагает лечение субъектов соединением согласно данному изобретению, например вводимым перорально, для уменьшения или предотвращения воспаления, связанного с инфекционным заболеванием, таким как инфекция *C. difficile*.

На практике, способы согласно данному изобретению могут осуществляться путем введения соединений субъекту любым приемлемым путем введения, с использованием любой приемлемой формы, как описано выше, и позволяют организму субъекта транспортировать соединения в клетке-мишени посредством природных процессов. Как описано выше, введение также может осуществляться путем прямой инъекции в область (например, орган, ткань), содержащий клетку-мишень (т. е. клетку, подлежащую лечению), или культивированием клеток, которые будут использоваться для клеточной терапии с указанными соединениями перед инъекцией клеток обратно в организме.

Кроме того, введение может следовать любому количеству схем. Таким образом, оно может включать в себя однократную дозу или введение дозы экспериментального соединения, или многократные дозы или введение доз в течение периода времени. Следовательно, лечение может включать в себя повторение стадии введения один или большее количество раз, пока не будет достигнут желаемый результат. В некоторых вариантах осуществления, лечение может продолжаться в течение продолжительных периодов времени, таких как недели, месяцы или годы. Специалисты в данной области техники в полной мере способны легко разработать подходящие схемы введения доз для индивидов на основе известных в данной области техники параметров. Количества доз для соединений согласно данному изобретению могут быть использованы в способах таких вариантов осуществления данного изобретения. Для лечения иммунометаболического заболевания предпочтительно, чтобы соединения вводились в

количестве от около 0,001 мг/день до 9000 мг/день.

Количество, подлежащее введению, будет изменяться в зависимости от субъекта, стадии заболевания или нарушения, возраста субъекта, общего состояния здоровья субъекта и других различных параметров, известных и обычно принимаемых во внимание специалистами в области медицины. Как правило, будет вводиться достаточное количество соединения для того, чтобы осуществить заметное изменение степени воспаления в пораженной области или концентрации пораженного метаболита или сигнального трансдуктора. У пациентов, не испытывающих активных симптомов, изменение, которое ищут, может включать в себя параметры иммунных клеток, такие как экспрессия ФНО α в иммунных клетках или процент регуляторных Т-лимфоцитов в крови, или метаболические параметры, такие как поглощение глюкозы клетками или количество гликогена внутри клеток. В данном документе раскрыты подходящие количества, и дополнительные подходящие количества могут быть определены специалистами в данной области техники без чрезмерного или избыточного экспериментирования, на основании количеств, раскрытых в данном документе.

Принимая во внимание вышеуказанные способы, должно быть очевидно, что данное изобретение предлагает иммунометаболическое лечение с помощью LANCL2-связывающего соединения для применения в приведение в контакт с клетками, например, при лечении клеток субъекта. Вышеупомянутое обсуждение фокусируется на использовании соединений согласно данному изобретению в качестве части композиции для применения в том, что в целом можно считать фармацевтической или медицинской схемой лечения.

Соединения, описанные в данном изобретении для лечения иммунометаболического заболевания и других описанных патологий, могут быть приготовлены в виде фармацевтической, пищевой композиции, функциональной пищевой композиции, диетической добавки или для клеточной терапии, как более подробно описано выше.

В качестве альтернативы или в дополнение к способам лечения патологий путем прямого введения соединений, патологии можно лечить с помощью подготовленных клеток, полученных из клеток-предшественников с помощью указанных соединений. Патологии, которые можно лечить, включают в себя любую патологию, описанную в данном документе или в патенте США № 9556146. Соединения, используемые в лечении, могут включать в себя любое соединение, раскрытое в данном документе или охватываемое любыми формулами, раскрытыми в данном документе, или любое соединение, раскрытое или охватываемое любой формулой, раскрытой в патенте США № 9556146.

Термин «клетка-предшественница» используется в данном документе для обозначения в целом любой клетки, которая служит в качестве исходной клетки, которую обрабатывают для получения подготовленной клетки. Клетка может быть клеткой выше в пути дифференцировки, ведущему к подготовленной клетке, например стволовой клеткой,

клеткой-основательницей или «клеткой-предшественницей» (как данный термин используется в данной области техники для обозначения промежуточного звена между стволовой клеткой и дифференцированной клеткой), обладающей, например, тотипотентными, мультипотентными или унипотентными свойствами, но необязательно должна иметь таковые. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления, получение подготовленной клетки из клетки-предшественника включает в себя дифференцировку клетки-предшественника в подготовленную клетку. В других вариантах осуществления, получение подготовленной клетки из клетки-предшественника включает в себя только индукцию изменений, таких как изменения экспрессии генов.

Подготовленные клетки могут быть получены из клеток-предшественников путем приведения в контакт клеток-предшественников *in vitro* с одним или большим количеством соединений согласно данному изобретению, чтобы таким образом получить подготовленные клетки. Термины «*in vitro*» и «*ex vivo*» используются в данном документе взаимозаменяемо в отличие от «*in vivo*», и относятся к состоянию нахождения вне живого организма.

Клетки-предшественники и/или подготовленные клетки, согласно данному изобретению, могут включать в себя иммунные клетки. Иллюстративные иммунные клетки включают в себя гранулоциты, тучные клетки, моноциты, макрофаги, нейтрофилы, дендритные клетки, клетки природные-киллеры, Т-лимфоциты и В-лимфоциты, среди прочих. Иллюстративные гранулоциты включают в себя базофилы, эозинофилы и нейтрофилы.

Клетки-предшественники и/или подготовленные клетки, согласно данному изобретению, могут включать в себя лейкоциты. Иллюстративные лейкоциты включают в себя нейтрофилы, эозинофилы (ацидофилы), базофилы, лимфоциты и моноциты.

Клетки-предшественники и/или подготовленные клетки согласно данному изобретению могут содержать мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК) или мононуклеарные клетки собственной пластинки (МКСП). Иллюстративные МКПК и МКСП включают в себя лимфоциты (Т-лимфоциты, В-лимфоциты, НК-клетки) и моноциты.

Клетки-предшественники и/или подготовленные клетки согласно данному изобретению могут включать в себя Т-лимфоциты. Т-лимфоциты делятся на две обширные категории: CD8⁺ Т-лимфоциты или CD4⁺ Т-лимфоциты, в зависимости от того, какой белок присутствует на поверхности клетки. Т-лимфоциты выполняют множество функций, в том числе уничтожают инфицированные клетки, и активируют или привлекают другие иммунные клетки. CD8⁺ Т-лимфоциты также называют цитотоксическими Т-лимфоцитами или цитотоксическими лимфоцитами (ЦТЛ). Они имеют ключевое значение для распознавания и удаления инфицированных вирусом клеток и раковых клеток. Основными субпопуляциями CD4⁺ Т-лимфоцитов являются наивные CD4⁺ Т-лимфоциты, TH1-лимфоциты, TH2-лимфоциты, TH17-лимфоциты и Трег-лимфоциты, где «ТН» означает «Т-хелперный лимфоцит». Наивные CD4⁺ Т-

лимфоциты представляют собой Т-лимфоциты, которые не дифференцируются в какие-либо из ТН1-клеток, ТН2-клеток, ТН17-клеток и Трег-клеток. Регуляторные Т-лимфоциты (Трег) контролируют и ингибируют активность других Т-лимфоцитов. Они предотвращают нежелательную иммунную активацию и поддерживают толерантность, или предотвращают иммунные реакции против собственных клеток и антигенов организма. В некоторых вариантах осуществления, клетки-предшественники включают в себя наивные CD4⁺ Т-лимфоциты, а подготовленные клетки включают в себя Трег-клетки.

Получение подготовленных клеток из клеток-предшественников может включать в себя приведение в контакт количества одного или более соединений согласно данному изобретению в течение времени, достаточного для индуцирования зависимого от соединения отличия в подготовленных клетках по отношению к клеткам-предшественникам. Как применяется в данном документе, термин «зависимое от соединения отличие» относится к отличию в подготовленных клетках по отношению к клеткам-предшественникам, возникающему в результате приведения в контакт клетки-предшественника с одним или большим количеством соединений согласно данному изобретению. Зависимые от соединения отличия могут быть определены путем приведения в контакт клеток с средой в присутствии или в отсутствие одного или большего количества соединений согласно данному изобретению, при этом зависимые от соединения отличия представляют собой характеристики, которые проявляются только в случае клеток, приведенных в контакт со средой в присутствии одного или большего количества соединений согласно данному изобретению. Зависимые от соединения отличия могут быть отличиями не только по виду, но и по степени.

Зависимое от соединения отличие в подготовленных клетках может включать в себя отличие в экспрессии гена. Если явным образом не указано иное, «экспрессия гена» широко используется в данном документе для обозначения любой или всей транскрипции или трансляции. Таким образом, отличие в экспрессии гена может быть отличием в продуцировании мРНК, отличием в продуцировании белка, или обоим. Если явным образом не указано иное, ген, имеющий дифференциальную экспрессию, может быть идентифицирован в данном документе путем ссылки на белок, полученный из гена (например, FOXP3), или путем ссылки на сам ген (например, Lag3). В вариантах осуществления данного изобретения, зависимые от соединения отличия в экспрессии генов могут включать себя одно или большее количество из: увеличение экспрессии ИЛ-10 или его ортолога, увеличение экспрессии FOXP3 или его ортолога, уменьшение экспрессии ФНО α или его ортолога, уменьшение экспрессии ИФН γ или его ортолога, уменьшение экспрессии Tbet или его ортолога, увеличения экспрессии Lag3 или его ортолога, увеличение экспрессии Socs2 или его ортолога, увеличение экспрессии Irf7 или его ортолога, увеличения экспрессии P2rx7 или его ортолога, увеличение экспрессии Carn3 или его ортолога, увеличение экспрессии Ikzf2 или его ортолога, увеличение экспрессии Stat5a или его ортолога, увеличение экспрессии Pten или его ортолога,

увеличение экспрессии Foxo1 или его ортолога и/или увеличение экспрессии Phlpp1 или его ортолога. Ортологи могут включать в себя ортологи у видов животных. Ортологи могут включать в себя ортологи у видов млекопитающих. Ортологи (например, для названных выше генов мыши) могут включать в себя ортологи у приматов. Ортологи (например, для названных выше генов мыши) могут включать в себя ортологи у людей.

Зависимое от соединения отличие в подготовленных клетках может включать в себя другие обнаруживаемые отличия, такие как увеличение фосфорилирования STAT5a или его ортолога, увеличение фосфорилирования FOXO1 или его ортолога, и/или увеличение активности пируваткиназы.

При получении подготовленных клеток, клетки-предшественники могут быть приведены в контакт с количествами соединения от около 100 нМ, около 10 нМ, около 1 нМ или меньше до около 1 мкМ, около 10 мкМ, около 100 мкМ, около 1 мМ или больше. Клетки-предшественники могут приводиться в контакт с соединением в течение времени от около 12 часов, 6 часов, 1 часа, около 30 минут, или меньше до около 24 часов, около 48 часов, около 72 часов или больше.

В некоторых вариантах осуществления, в целом, МКПК или МКСП приводят в контакт с соединением согласно данному изобретению. МКПК или МКСП могут быть выделены из животного. В некоторых вариантах осуществления, подтипы МКПК или МКСП, такие как Т-лимфоциты, могут быть выделены из МКПК или МКСП и затем приведены в контакт с соединением согласно данному изобретению. В некоторых вариантах осуществления, МКПК или МКСП приводят в контакт с соединением согласно данному изобретению, и затем из них выделяют подтипы клеток, такие как Т-лимфоциты или Т-лимфоциты определенного типа. Способы выделения МКПК, МКСП и их подтипов известны в данной области техники. Смотрите, например, Majowicz et al. 2012 (Majowicz A, van der Marel S, te Velde AA, Meijer SL, Petry H, van Deventer SJ, Ferreira V. Murine CD4⁺ CD25⁻ cells activated in vitro with PMA/ionomycin and anti-CD3 acquire regulatory function and ameliorate experimental colitis in vivo. *BMC Gastroenterol.* 2012 Dec 3;12:172) и Canavan et al. 2016 (Canavan JB, Scottà C, Vossenkämper A, Goldberg R, Elder MJ, Shoval I, Marks E, Stolarczyk E, Lo JW, Powell N, Fazekasova H, Irving PM, Sanderson JD, Howard JK, Yagel S, Afzali B, MacDonald TT, Hernandez-Fuentes MP, Shpigel NY, Lombardi G, Lord GM. Developing in vitro expanded CD45RA⁺ regulatory T cells as an adoptive cell therapy for Crohn's disease. *Gut.* 2016 Apr;65(4):584-94). Например, субпопуляции МКПК, могут быть выделены с помощью анти-CD3 антител и анти-CD28 антител. Анти-CD3 антитела и анти-CD28 антитела могут быть предоставлены в виде анти-CD3/анти-CD28 гранул, например человеческий Т-активатор CD3/CD28 DYNABEADS® от ThermoFisher Scientific (Уолтем, Массачусетс).

Получение подготовленных клеток может включать в себя дифференцировку полученных клеток из клеток-предшественников. Например, подготовленные клетки, такие как клетки Трег, можно дифференцировать из клеток-предшественников, таких как наивные CD4⁺ Т-лимфоциты. Такое дифференцирование может включать в себя

приведение в контакт клеток-предшественников с факторами дифференциации в дополнение к одному или большему количеству соединений согласно данному изобретению. Различные факторы дифференциации могут включать в себя полностью-трансретиноевую кислоту, ТФР- β , фобол-миристат-ацетат, иономицин, рапамицин и/или ИЛ-2. В некоторых вариантах осуществления, дифференцирование может включать в себя увеличение доли клеток Трег в подготовленных клетках по отношению к доле клеток-предшественников.

Клетки-предшественники и подготовленные клетки согласно данному изобретению могут быть выделенными клетками. Термин «выделенный» или «очищенный» обозначает материал, который удален из его первоначальной среды, например, из естественной среды. Материал считается «очищенным», когда он присутствует в специфической композиции в более высокой или более низкой концентрации, чем концентрация, в которой он находится до этапа (этапов) очистки.

Лечение патологии подготовленными клетками согласно данному изобретению может включать в себя введение клеток животному в количестве, достаточном для лечения патологии. Подготовленные клетки могут быть введены любым путем или способом, описанным выше для соединений, включая парентеральный или энтеральный. Неограничивающие формы парентерального введения включают в себя инъекцию или инфузию. Подготовленные клетки могут быть введены или инфузирваны прямо в кровотоки или другие части тела. Неограничивающие формы энтерального введения включают в себя пероральное и ректальное введение, так что подготовленные клетки попадают в желудочно-кишечный тракт. Подготовленные клетки могут быть аутологичными для обработанного животного (т. е. получены из клетки, взятой из того же животного, для лечения которого использовалась подготовленная клетка), или гетерологичными для обработанного животного (т. е. получены из животного, отличающегося от того, для лечения которого использовалась подготовленная клетка). Клетка, подготовленная, как описано выше, может быть использована в способе лечения любой из патологий, описанных в данном документе. Иллюстративные патологии включают в себя воспаление кишечника. Иллюстративные типы воспаления кишечника включают в себя воспалительное заболевание кишечника. Иллюстративные типы воспалительных заболеваний кишечника включают в себя болезнь Крона и язвенный колит.

В одном варианте осуществления изобретения, способ лечения иммунометаболического заболевания включает в себя лечение, не вызывающее заметных побочных эффектов, таких как значительное увеличение массы, системное подавление иммунитета, кушингоидная внешность, остеопения/остеопороз, клеточная токсичность или панкреатит, что является распространенным для доступных в настоящее время препаратов (т. е., статинов, антибиотиков, кортикостероидов, доксорубицина, метотрексата). То есть было обнаружено, что способ лечения согласно данному изобретению, который обеспечивает эффект лечения, по меньшей мере частично, путем

воздействия на экспрессию и/или активацию LANC2 и/или другие иммунометаболические пути в некоторых клетках, обеспечивает благоприятный эффект, не вызывающий значительного увеличения массы, например, за счет удержания жидкости, у субъекта, которого лечат, по сравнению с другими аналогичными субъектами, не получающими лечение.

Таким образом, иммунометаболические способы согласно данному изобретению могут обеспечить виды лечения для уменьшения воспаления путем воздействия на метаболизм иммунных клеток. Способы могут уменьшать воспаление системно (т. е., по всему телу субъекта) или локально (например, в участке введения или в области воспалительных клеток, включающих в себя, но не ограниченных Т-лимфоцитами и макрофагами). При лечении или профилактике воспаления через иммунометаболизм одним из наблюдаемых эффектов является сдвиг в метаболизме глюкозы. В конкретном варианте осуществления, может быть сдвиг от продуцирования лактата из пирувата в сторону цикла трикарбоновых кислот, который связан с иммуновоспалительными процессами. Более конкретно, этот сдвиг в метаболизме может быть связан с увеличением доли CD4+CD25+FOXP3+ или других регуляторных CD4+ Т-лимфоцитов относительно эффекторных CD4+ Т-лимфоцитов, таких как клетки ИЛ17+ Th17 или клетки ИФН γ + Th1. Другим наблюдаемым эффектом может быть снижение клеточной пролиферации в результате сочетания сниженного анаэробного метаболизма и усиления путей иммунных контрольных точек. Другим эффектом вызванных терапевтически сдвигов в метаболизме, может быть снижение экспрессии воспалительных хемокинов, таких как MCP-1, ИЛ-8 или CXCL9, в результате изменений процессинга и запасания жирных кислот. Таким образом, способы также могут рассматриваться как способы воздействия или изменения иммунного ответа субъекта, которому вводят лекарство, тем самым останавливая воспаление, заболевание и патологию.

Данное изобретение предлагает способы ингибирования воспаления в желудочно-кишечном тракте, в котором соответствующие компоненты включают в себя желудок, тонкую кишку, толстую кишку и прямую кишку.

Данное изобретение предлагает способы лечения или профилактики субъекта, страдающего от ВЗК, или других здоровых индивидов, возможно, с генетической предрасположенностью к болезни Крона или язвенному колиту, от развития ВЗК. Способы могут также включать в себя лечение пациентов с рецидивирующей формой ВЗК. Согласно данному изобретению термин «субъект, страдающий от ВЗК» используется для обозначения субъекта (например, животного, человека), имеющего заболевание или нарушение, показывающее один или большее количество клинических признаков, типичных для ВЗК. В целом, способ лечения или профилактики согласно этому аспекту данного изобретения включает в себя введение субъекту количества соединения или клеточной терапии, которое эффективно для лечения или предотвращения родного или большего количества симптомов или клинических проявлений ВЗК, или для предотвращения развития такого симптома(мов) или проявления(ний).

Таким образом, в соответствии со способами согласно данному изобретению, данное изобретение может предлагать способы лечения ВЗК, воспаления, связанного с кишечной инфекцией, и воспаления, связанного с аутоиммунными заболеваниями. Способы лечения могут быть профилактическими способами. В некоторых вариантах осуществления изобретения, способ представляет собой способ лечения ВЗК, воспаления, связанного с кишечной инфекцией, и воспаления, связанного с аутоиммунными заболеваниями. В других вариантах осуществления изобретения, способ представляет собой способ профилактики ВЗК. В вариантах осуществления изобретения, способ представляет собой способ предотвращения перехода рецидивирующей формы ВЗК в активную. В еще других вариантах осуществления изобретения, способ представляет собой способ улучшения состояния здоровья субъекта, страдающего от ВЗК, воспаления, связанного с кишечной инфекцией, и воспаления, связанного с аутоиммунными заболеваниями. Организмы, вызывающие желудочно-кишечные инфекции, включают в себя, но не ограничиваются лишь этими: *Escherichia coli*, *Shigella*, *Salmonella*, *pathogenic Vibrios*, *Campylobacter jejuni*, *Yersina enterocolitica*, *Toxoplasma gondii*, *Entamoeba histolytica* и *Giardia lamblia*. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления изобретения, данное изобретение относится к способу защиты здоровья, органов и/или тканей субъекта, страдающего от ВЗК, воспаления, связанного с кишечной инфекцией, и воспаления, связанного с аутоиммунными заболеваниями, или с риском развития ВЗК, воспаления, связанного с кишечной инфекцией, и воспаления, связанного с аутоиммунными заболеваниями.

В одном варианте осуществления изобретения, способ лечения ВЗК включает в себя лечение ВЗК, не вызывающее заметных побочных эффектов, таких как значительное увеличение массы, системное подавление иммунитета, кушингоидная внешность, остеопения/остеопороз, или панкреатит, что является распространенным для доступных в настоящее время препаратов (т. е., кортикостероидов, ингибиторов фактора некроза опухоли альфа). То есть было обнаружено, что способ лечения согласно данному изобретению, который обеспечивает эффект лечения, по меньшей мере частично, путем воздействия на экспрессию и/или активацию *LANCL2* в некоторых клетках, обеспечивает благоприятный эффект, не вызывая значительное увеличение массы, например, за счет удержания жидкости, у субъекта, подвергаемого лечению, по сравнению с другими аналогичными субъектами, не получающими лечение.

Как таковые, способы данного изобретения могут обеспечивать способы уменьшения воспаления. Способы могут уменьшать воспаление системно (т. е., по всему телу субъекта) или локально (например, в участке введения или в области воспалительных клеток, включающих в себя, но не ограниченных Т-лимфоцитами и макрофагами). При лечении или профилактике воспаления в соответствии со способами согласно данному изобретению одним из эффектов, который можно наблюдать, является уменьшение количества моноцитов или макрофагов и лимфоцитов, проникающих в кишечник. Другое может представлять собой увеличение популяций регуляторных иммунных клеток, таких

как CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ регуляторные Т-лимфоциты, или увеличение регуляторных свойств лимфоцитов или макрофагов (например, увеличение интерлейкина 4 (ИЛ-4) или ИЛ-10, или снижение ФНО- α и ИЛ-6). Другое может представлять собой уменьшенное присутствие воспалительных генов и/или молекул адгезии. Таким образом, эти способы также могут рассматриваться как способы воздействия или изменения иммунного ответа субъекта, которому назначают терапию. Субъект может иметь воспалительное заболевание кишечника или другую патологию, при которой иммуномодуляция Т-лимфоцитов или отрицательная регуляция молекул клеточной адгезии является желаемым результатом.

Данное изобретение также предлагает способы лечения инфекционного заболевания с помощью соединений или клеток, описанных в данном документе. Неограничивающие примеры таких инфекционных заболеваний включают в себя вирусные инфекции, бактериальные инфекции и грибковые инфекции.

Неограничивающие примеры вирусных инфекций включают в себя инфекции вирусами: семейства Adenoviridae, такими как аденовирус; вирусами семейства Herpesviridae, такими как простой герпес типа 1, простой герпес типа 2, вирус ветряной оспы, вирус Эпштейна-Барра, цитомегаловирус человека, вирус герпеса человека и тип 8; вирусами семейства Papillomaviridae, такими как вирус папилломы человека; вирусами семейства Polyomaviridae, такими как вирус ВК и вирус JC; вирусами семейства Poxviridae, такими как натуральная оспа; вирусами семейства Herpadnaviridae, такими как вирус гепатита В; вирусами семейства Parvoviridae, такими как бокавирус человека и парвовирус В19; вирусами семейства Astroviridae, такими как астровирус человека; вирусами семейства Caliciviridae, такими как вирус Норфолк; вирусами семейства Picornaviridae, такими как вирус Коксаки, вирус гепатита А, полиовирус и риновирус; вирусами семейства Coronaviridae, такими как вирус острого респираторного синдрома; вирусами семейства Flaviviridae, такими как вирус гепатита С, вирус желтой лихорадки, вирус денге и вирус Западного Нила, вирусами семейства Togaviridae, такими как вирус краснухи; вирусами семейства Неревирidae, такими как вирус гепатита Е; вирусами семейства Retroviridae, такими как вирус иммунодефицита человека (ВИЧ); вирусами семейства Orthomyxoviridae, такими как вирус гриппа; вирусами семейства Arenaviridae, такими как вирус гуанарито, вирус Джунин, вирус Ласса, вирус Мачупо и вирус Сэбия; вирусами семейства Bunyaviridae, такими как вирус конго-крымской геморрагической лихорадки; вирусами семейства Filoviridae, такими как вирус Эбола и вирус Марбург; вирусами семейства Paramyxoviridae, такими как вирус кори, вирус свинки, вирус парагриппа, респираторно-синцитиальный вирус, метапневмовирус человека, вирус Хендра и вирус Нипах; вирусами семейства Rhabdoviridae, такими как вирус бешенства; неопределенными вирусами, такими как вирус гепатита D; и вирусами семейства Reoviridae, такими как ротавирус, орбивирус, колтивирус и вирус Банна, среди прочего.

Неограничивающие примеры бактериальных инфекций включают в себя инфекции бактериями, описанными выше, в дополнение к *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*,

Bordetella pertussis, *Borrelia burgdorferi*, *Brucella abortus*, *Brucella canis*, *Brucella melitensis*, *Brucella suis*, *Campylobacter jejuni*, *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydophila psittaci*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli*, *Francisella tularensis*, *Haemophilus influenzae*, *Helicobacter pylori*, *Legionella pneumophila*, *Leptospira interrogans*, *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium ulcerans*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Rickettsia rickettsii*, *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Treponema pallidum*, *Vibrio cholerae*, *Yersinia pestis*, *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pseudotuberculosis*, и другим видам из рода вышеуказанных организмов.

Неограничивающие примеры грибковых инфекций включают в себя инфекции: грибами рода *Aspergillus*, такими как *Aspergillus fumigatus*, который вызывают аспергиллез; грибами рода *Blastomyces*, такими как *Blastomyces dermatitidis*, которые вызывают бластомикоз; грибами рода *Candida*, такими как *Candida albicans*, которые вызывают кандидоз; грибами рода *Coccidioides*, которые вызывают кокцидиоидомикоз (калифорнийскую лихорадку); грибами рода *Cryptococcus*, такими как *Cryptococcus neoformans* и *Cryptococcus gattii*, которые вызывают криптококкоз; грибами-дерматофитами, которые вызывают руброфитию; грибами, которые вызывают грибковый кератит, такими как виды *Fusarium*, виды *Aspergillus* и виды *Candida*; грибами рода *Histoplasma*, такими как *Histoplasma capsulatum*, которые вызывают гистоплазмоз; грибами порядка *Mucorales*, которые вызывают мукоромикоз; грибами рода *Saccharomyces*, такими как *Saccharomyces cerevisiae*; грибами рода *Pneumocystis*, такими как *Pneumocystis jirovecii*, которые вызывают плазмоклеточную пневмонию; и грибами рода *Sporothrix*, такими как *Sporothrix schenckii*, которые вызывают споротрихоз.

Данное изобретение также предлагает способы лечения гиперпролиферативных нарушений соединениями, описанными в данном документе. Гиперпролиферативные нарушения включают в себя патологии, связанные с неконтролируемым ростом клеток, такие как рак, или патологии, связанные с ростом опухолей, аденом или полипов. Неограничивающие примеры гиперпролиферативных нарушений включают в себя: колоректальный рак, семейный аденоматозный полипоз (САП), рак горла, рак щитовидной железы, рак желудка, рак желудочно-кишечного тракта, рак поджелудочной железы, лимфому Ходжкина, неходжкинскую лимфому, острый миелолейкоз, гепатоцеллюлярный рак, желудочно-кишечные стромальные опухоли, острый лимфобластный лейкоз, хронические миелолиферативные нарушения, гиперэозинофильный синдром, мастоцитоз, среди прочих.

Данное изобретение также предлагает способы лечения врожденного дефекта метаболизма соединениями или клетками, описанными в данном документе.

Неограничивающие примеры врожденных дефектов метаболизма включают в себя: болезнь Вильсона, болезнь Андерсена или другие болезни накопления гликогена, цистинурию, болезнь Фабри, цитруллинемию II типа с началом в взрослом возрасте, синдром Зеллвегера, лейциноз, синдром Леша-Нихана, болезнь Ниманна-Пика, болезнь Фанкони-Биккеля, болезнь фон Гирке, наследственную непереносимость фруктозы, фенилкетонурию, дефицит ацил-КоА-дегидрогеназы со средней длиной цепи, среди прочих.

Данное изобретение также предлагает способы лечения хронического иммунометаболического заболевания с помощью соединений или клеток, описанных в данном документе. Неограничивающие примеры хронических иммунометаболических заболеваний включают в себя: сердечно-сосудистые заболевания, такие как атеросклероз, заболевание коронарной артерии, заболевание периферических артерий, легочную болезнь сердца, эндокардит, миокардит и гипертонию.

Данное изобретение также предлагает способы лечения аутоиммунного заболевания, такого как воспалительное аутоиммунное заболевание, с помощью соединений или клеток, описанных в данном документе. Неограничивающие примеры аутоиммунных заболеваний включают в себя: воспалительное заболевание кишечника (ВЗК) (например, болезнь Крона и язвенный колит), волчанку, системную волчанку, ревматоидный артрит, диабет I типа, псориаз, рассеянный склероз и аутоиммунные заболевания, вызванные иммунотерапией рака, среди прочих. Неограничивающие примеры аутоиммунных заболеваний, вызванных иммунотерапией рака, включают в себя ревматические заболевания, вызванные иммунотерапией рака.

Данное изобретение также предлагает способы лечения хронических воспалительных заболеваний соединениями или клетками, описанными в данном документе. Неограничивающие примеры хронических воспалительных заболеваний включают в себя метаболический синдром, ожирение, предиабет, сердечно-сосудистое заболевание, и диабет 2 типа, среди прочих.

Данное изобретение также предлагает способы лечения воспалительных нарушений, таких как острый дивертикулит толстой кишки и радиационно-индуцированное воспаление желудочно-кишечного тракта, с помощью соединений или клеток, описанных в данном документе. Неограничивающие примеры радиационно-индуцированного воспаления желудочно-кишечного тракта включают в себя радиационный проктит, радиационный энтерит и радиационный проктосигмоидит.

Данное изобретение также предлагает способы лечения диабета с помощью соединений или клеток, описанных в данном документе, включая диабет 1 типа, диабет 2 типа и другие типы диабета. Термин «диабет» или «сахарный диабет» используется для охвата метаболических нарушений, при которых у субъекта высокий уровень сахара в крови (т. е., гипергликемия). Гипергликемические патологии имеют различную этиологию, например, поджелудочная железа не вырабатывает достаточно инсулина или клетки не реагируют на выработанный инсулин. Существует несколько определенных

подтипов диабета. Диабет 1 типа характеризуется полной неспособностью тела продуцировать инсулин или неспособностью тела продуцировать достаточное количество инсулина. Диабет 2 типа в целом является результатом резистентности к инсулину, патологией, при которой клетки не способны использовать инсулин надлежащим образом. Диабет 2 типа иногда присутствует совместно с недостаточностью инсулина. Гестационный диабет происходит, когда у беременной женщины без предварительного диагноза диабет развивается гипергликемия. Менее распространенные формы диабета включают в себя наследственный диабет (вследствие генетических дефектов, связанных с секрецией инсулина), связанный с кистозным фиброзом диабет, сахарный стероидный диабет, индуцированный высокими дозами глюкокортикоидов, и некоторые формы моногенного диабета (включая диабет с началом в зрелом возрасте у молодых людей). Моногенный диабет охватывает некоторые наследственные формы диабета, вызванные мутациями в одном, аутосомном доминантном гене (в противоположность более сложным, полигенным этиологиям, приводящим к гипергликемии).

Данное изобретение также предлагает способы лечения хронической боли соединениями или клетками, описанными в данном документе. Неограничивающие примеры заболеваний хронической боли включают в себя фибромиалгию, повреждение нервов, мигрени, боли в спине, боли в животе, среди прочих.

Данное изобретение также предлагает способы лечения дополнительных патологий соединениями или клетками, описанными в данном документе. Они включают в себя хронические воспалительные заболевания, такие как: хроническое гранулематозное заболевание, болезнь «трансплантат против хозяина» и периодический синдром, связанный с рецептором фактора некроза опухоли; атрофия мышц, такая как боковой амиотрофический склероз, мышечная дистрофия Дюшенна, сколиоз и прогрессирующая мышечная атрофия; среди прочих.

Элементы и этапы способа, описанные в данном документе, могут использоваться в любой комбинации, независимо от того, описаны они подробно или нет.

Все комбинации этапов способа, как применяется в данном документе, могут быть выполнены в любом порядке, если не указано иное или явным образом противоположное не следует из контекста, в котором указана упоминаемая комбинация.

При использовании в данном документе, формы единственного числа включают в себя отсылки ко множественному числу, если в контексте явным образом не указывается иное.

Числовые диапазоны, как применяется в данном документе, предназначены для включения любого числа и подгруппы чисел, содержащихся в этом диапазоне, независимо от того явно они раскрыты или нет. Дополнительно, эти числовые диапазоны следует рассматривать как обеспечивающие обоснование для пункта формулы, направленного на любое число или подгруппу чисел в этом диапазоне. Например, раскрытие от 1 до 10 следует рассматривать как обоснование для диапазона от 2 до 8, от 3 до 7, от 5 до 6, от 1 до 9, от 3,6 до 4,6, от 3,5 до 9,9 и т. д.

Все патенты, публикации патентов и рецензируемые публикации (т. е. «ссылки»), цитируемые в данном документе, явным образом включены посредством ссылки в том же объеме, как если бы каждая отдельная ссылка была конкретно и отдельно указана как включенная посредством ссылки. В случае противоречия между данным раскрытием и включенными ссылками данное раскрытие имеет преимущество.

Следует понимать, что данное изобретение не ограничено конкретной проиллюстрированной и описанной конструкцией и расположением частей в ней, но охватывает такие ее модифицированные формы, находящиеся в пределах объема формулы изобретения.

ПРИМЕРЫ МОЛЕКУЛЯРНОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ И СВЯЗЫВАНИЯ LANCL2

Примеры, демонстрирующие связывание VT-11 и родственных соединений с LANCL2, предоставлены в патенте США № 9556146, который включен в данный документ посредством ссылки в полном объеме. Предсказанное и фактическое связывание (посредством поверхностного плазмонного резонанса (ППР) VT-11 и других родственных соединений продемонстрировано в Таблицах 1А и Таблицах 1В.

Таблица 1А. Предсказанное и фактическое согласно ППР связывание VT-11 и родственных соединений

Пример №	Обозначение соединения	Структура	Предсказанная аффинность связывания с LANCL2	Аффинность к LANCL2 согласно ППР (K _{св})
1	BT-11		-11,2	7,7
2	BT-12		-10,9	
3	BT-14		-9,3	
4	BT-15		-9,9	21,4
5	BT-13		-7,2	
6	BT-4		-9,8	84,3
7	BT-6		-8,6	18,2
8	BT-16		-7,6	4,85e-06
9	BT-3		-10,1	

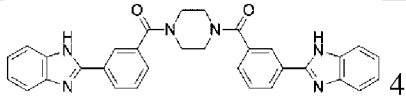
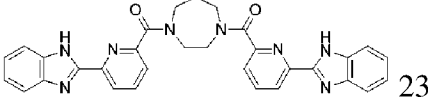
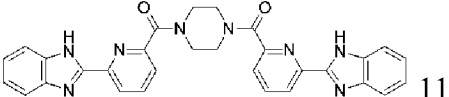
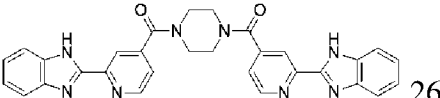
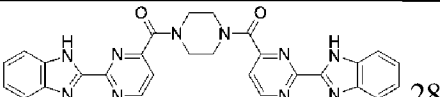
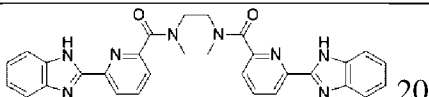
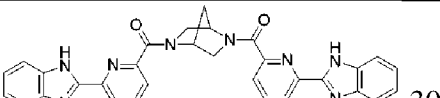
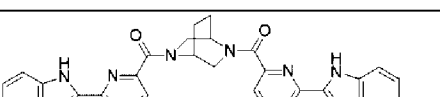
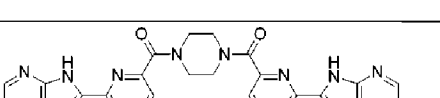
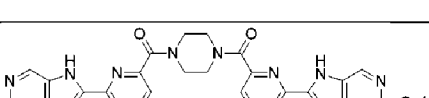
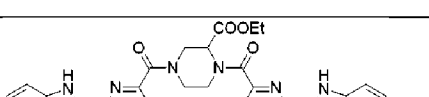
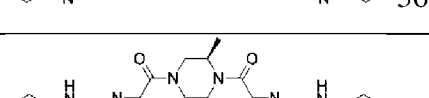
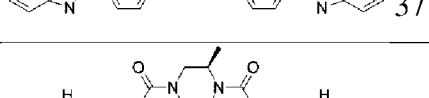
Таблица 1В. Предсказанное и фактическое согласно ППР связывание BT-11 и родственных соединений

Пример №	Обозначение соединения	Структура	Предсказанная аффинность связывания с LANCL2	Аффинность к LANCL2 согласно ПШР (K ₀₇)
10	BT-5		-8.9	
11	BT-17		-7.6	
12	BT-ABA-25		-7.5	1.77e-04
13	BT-ABA-5a		-9.5	1.17e-05
14	BT-ABA-6		-7.5	163
15	BT-ABA-13		-7.6	4.65e-06
16	BT-ABA-16		-7.6	4.85e-06
REF 18	61610	 N1,N4-бис(1H-бензо[д]имидазол-2-ил)фенил) тетрафталами́д	-9.1	6,2
REF 18	ABA		-7.5	2,3

Дополнительные соединения были проверены практически на связывания с LANCL2 с помощью AutoDock Vina (Trott et al. J Comput Chem, 2010, 31(2):455-61.). Энергия связывания верхней позиции по связыванию была определена для каждого соединения. Ранее представленные протоколы и параметры (Lu et al. J Mol Model, 2011, 17(3):543-53) были адаптированы для данного анализа. Таблица 2 демонстрирует некоторые из протестированных соединений и их предсказанные энергии связывания с

LANCL2.

Таблица 2. Энергии связывания соединений с LANCL2.

Соединение (ВТ-№)	Энергия связывания верхней позиции (ккал/моль)
 4	-10
 23	-9,3
 11	-9,9
 26	-9
 28	-9,2
 20	-7,7
 30	-10,1
 31	-10,1
 33	-10,1
 34	-9,8
 36	-9,1
 37	-10,4
 38	-9,7

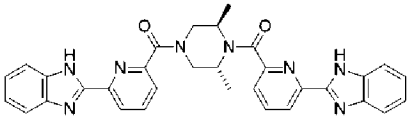
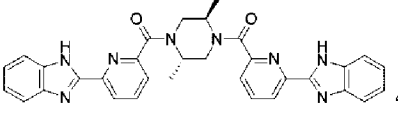
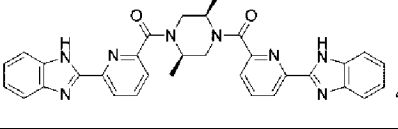
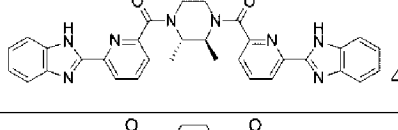
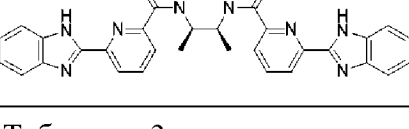
 39	-9,9
 40	-10,3
 41	-10,1
 42	-10,0
 43	-10,4

Таблица 3 демонстрирует предсказанную аффинность LANCL2 (энергия связывания верхней позиции по связыванию в ккал/моль) вариантов ВТ-11. Варианты основной структуры ВТ-11 для каждого соединения в Таблице 2 определены в соответствии с переменными, приведенными в данном документе для формулы Z-Y-Q-Y'-Z'.

Таблица 3. LANCL2 аффинность вариантов ВТ-11.

Замена на базовой структуре ВТ-11	Энергия связывания верхней позиции (ккал/моль)
Q=пропан-1,3-диамин-N ¹ ,N ³ -диил	-8,9
Q=N ¹ ,N ³ -диалкилпропан-1,3-диамин-N ¹ ,N ³ -диил	-7,8
Q=1,4-диаминоантрацен-9,10-дион-1,4-диил	-11,3
Q=C6-арен-1,4-диамин-N ¹ ,N ⁴ -диил	-10
A ₄ , A ₄ '= CR ⁹ , где R ⁹ =H	-11,2
A ₄ =CR ⁹ , где R ⁹ =H	-10,7
Z' представляет собой: R ⁵ , где R ⁵ =H	-9,5
R ¹ , R ^{1'} , R ² , R ^{2'} , R ³ , R ^{3'} , R ⁴ , R ^{4'} = CH ₃	-10,9
R ¹ =CH ₃	-10,7
R ¹ , R ^{1'} = CH ₃	-10,4
R ² =CH ₃	-10,5
R ² , R ^{2'} = CH ₃	-10,5
R ³ =CH ₃	-10,8
R ³ , R ^{3'} = CH ₃	-10,1

$R^{4=}\text{CH}_3$	-10,1
$R^4, R^{4'} = \text{CH}_3$	-9,7
$R^{6=}\text{CH}_3$	-10,8
$R^{7=}\text{CH}_3$	-10,9
$R^{8=}\text{CH}_3$	-10,8
$R^{9=}\text{CH}_3$	-10,5
$R^{10=}\text{CH}_3$	-10,8
$R^{11=}\text{CH}_3$	-11

Как продемонстрировано в Таблицах 1А, 1В, 2 и 3, ВТ-11 может адаптироваться к значительной модификации и по-прежнему связывать LANCL2 с высокой аффинностью.

ПРИМЕРЫ МЕДИЦИНСКОЙ ХИМИИ

Примеры, демонстрирующие синтез ВТ-11 и родственных соединений, предоставлены в патенте США № 9556146, который включен в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

ПРИМЕРЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

ВТ-11 ИЗМЕНЯЕТ ИММУНОМЕТАБОЛИЧЕСКИЕ ПУТИ ВО ВРЕМЯ ВОСПАЛЕНИЯ

Введение

Воспалительные заболевания кишечника (ВЗК), охватывающие как болезнь Крона (БК), так и язвенный колит (ЯК), поражают 1,6 миллиона жителей Северной Америки и 4 миллиона во всем мире, с ростом за последние пять лет почти на 15% [1,2]. Из-за сложной и мультифакторной природы ВЗК, при котором симптомы, факторы риска и степень тяжести варьируют в области значений, разработка эффективных методов лечения была медленным, трудным процессом [3]. В настоящее время, доминирующая рыночная терапия приносит пользу лишь небольшим частям от всего населения [4], имея высокий уровень отсутствия ответа [5], или вызывая высокий уровень побочных эффектов, включая рак, инфекцию и смерть [6,7]. Следовательно, существует неудовлетворенная клиническая потребность в более безопасных и более эффективных терапевтических средствах для лечения ВЗК.

Среди множества факторов, связанных с развитием ВЗК, - дисбаланс и экспансия воспалительных CD4+ Т-лимфоцитов [8]. Их самопроизвольное высокое продуцирование ИФН γ , ФНО α и ИЛ17 среди других цитокинов, является важным фактором случайных вспышек воспаления [9]. В противоположность этому, основная роль регуляторных CD4+ Т (Трег) лимфоцитов заключается в предотвращении такой экспансии, активации и продуцирования цитокинов. Несмотря на эти явные преимущества, клетки Трег подвергаются ожидаемому компенсаторному увеличению их уровня в ЖКТ у пациентов с ВЗК [10] и демонстрируют обычную супрессивную функцию *in vitro* [11] по сравнению со здоровыми контролями, что вызывает споры об их значимом влиянии на заболевание.

Последние данные свидетельствуют о том, что хотя на самом деле увеличивается количество Трег, которые характеризуются традиционными маркерами, эти клетки могут быть ко-продуцентами воспалительных цитокинов или клеток, которые нестабильно экспрессируют FOXP3 *in situ* [12-14]. Это ко-продуцирование создает промежуточный фенотип, который более тесно ассоциируется с эффекторным/воспалительным CD4+ Т-лимфоцитом, нежели с типичным Трег лимфоцитом. Кроме того, экспансия Трег была связана с ответной реакцией на современные способы лечения ВЗК [15]. Потенциально, нацеливание на стабильность полностью коммитированного профиля Трег, может восстановить эффективность естественной и индуцированной функции Трег лимфоцитов в слизистой оболочке желудочно-кишечного тракта.

В последнее время, переплетенная природа клеточного метаболизма и иммунитета стала более заметной в изучении заболеваний человека и разработке нацеленных на иммунитет терапевтических средств [16]. В частности, воспалительные и аутоиммунные заболевания, такие как ВЗК и другие, были определены в качестве ярких примеров эффективности иммунометаболических регуляторов [17]. Эффекторные и регуляторные CD4+ Т-лимфоциты имеют выраженные различия в метаболической функции с эффекторными клетками, способствующие продуцированию лактата и утилизации глюкозы [18], тогда как регуляторные типы клеток сохраняют сбалансированный метаболический профиль между окислением жирных кислот и глюкозы [19]. Интерфейс между иммунитетом и метаболизмом, известный как иммунометаболизм, приобретает более высокую детализированность и достоверность, поскольку новые метаболические ферменты и субстраты идентифицированы как обладающие совместными функциями, влияющими на иммунологическое поведение от гексокиназы [20] и ГАФД [21] до энolahзы [22] и фосфоенолпирувата [23]. Влияя на продуцирование ИЛ-1 β и ИФН γ , экспрессию FOXP3 и сигналинг кальция, эти элементы, как ранее считались только производящие энергию, оказывают множество сильных эффектов на иммунную функцию. Контролируя метаболизм иммунных клеток, иммунометаболические препараты могут эффективно предотвращать дифференцировку и поляризацию в воспалительных подгруппах [24-27].

Ранее идентифицированная LANCL2-опосредованная регуляция метаболизма в энтероэндокринных и мышечных клетках [28] предполагает, что важным аспектом терапевтической эффективности LANCL2 и ВТ-11 может быть потенциальный иммунометаболический механизм действия ВТ-11 в желудочно-кишечном тракте. Более конкретно, впервые было продемонстрировано, что активация LANCL2, критически важного первого шага эффективности ВТ-11, оказывает метаболические эффекты в неиммунных клетках, в качестве рецептора для натурального и пищевого соединения, АВА [28], и сигнального трансдуктора для продуцирования метаболических гормонов, до открытия его роли в воспалении [29]. Впрочем, связь между метаболическими и иммунологическими активностями пути LANCL2 еще должна быть доказана. Таким образом, LANCL2, и другие иммунометаболические мишени, заслуживают механистической оценки как инновационные иммуномодулирующие способы,

охватывающие воспалительные и аутоиммунные заболевания.

С помощью поверхностного плазмонного резонанса было продемонстрировано то, что ВТ-11 поражает LANCL2, и было продемонстрировано, путем оценивания *in vitro* и в модели ДСН заболевания, наличие терапевтического воздействия при ВЗК [30,31]. Активности ВТ-11 после перорального введения строго направлены на слизистую оболочку желудочно-кишечного тракта с системной биодоступностью <10% и периодом полужизни в плазме 3,1 часа. Дополнительно, предварительные исследования безопасности на крысах показывают чистый профиль безопасности вплоть до предельной дозы 1000 мг/кг перорально [32]. Предыдущие оценивания эффективности определяют улучшение показателей активности заболевания и уменьшение уровней маркеров воспаления в толстой кишке мышей, на которых воздействовали ДСН. Помимо активации LANCL2, лежащие в основе механизмы действия, посредством которых ВТ-11 уменьшает тяжесть заболевания при ВЗК, в настоящее время не определены.

Следующие примеры показывают, что активация LANCL2 посредством ВТ-11 расширяет и индуцирует стабильность в пределах регуляторных CD4⁺ Т-лимфоцитов с помощью иммунометаболических механизмов для подавления чрезмерного воспаления в слизистой оболочке ЖКТ. Следующие примеры также предоставляют первые доказательства иммунометаболических эффектов ВТ-11 посредством активации LANCL2. Эти данные допускают применение ВТ-11 в иммунометаболическом лечении ряда заболеваний или патологий, в частности, связанных с ними воспалений.

Материалы и способы

Мыши.

Rag2^{-/-} на основе C57BL/6 были получены из Jackson Laboratories. Mdr1a^{-/-} на основе FVB были получены из Taconic Biosciences. Lancl2^{-/-} и Lancl2^{fl/fl} на основе C57BL/6 были получены благодаря сотрудничеству с коммерческим источником. Мыши Lancl2^{fl/fl} были скрещены с CD4-cre трансгенными мышами для получения Т-лимфоцит специфичных Lancl2-нокаутированных животных (Lancl2^{ΔT}). Эвтаназию проводили с помощью CO₂-наркоза с последующей вторичной цервикальной дислокацией. Экспериментальные животные походили по возрасту, полу и массе тела для использования в экспериментах. Все исследования были выполнены с одобрения Институционального комитета по уходу и использованию животных.

Индукция экспериментального ВЗК.

Модель Mdr1a^{-/-}. У мышей Mdr1a^{-/-} развивался спонтанный колит. В возрасте 4 недель мыши Mdr1a^{-/-} начали ежедневно получать лечение ВТ-11 (8 мг/кг) через желудочный зонд. Мышей взвешивали и оценивали еженедельно для мониторинга развития колита. В возрасте 10 недель мышей Mdr1a^{-/-} умерщвляли для сбора ткани для последующего анализа. Модель ДСН. Lancl2^{ΔT} и Lancl2-экспрессирующим контролям добавляли декстрансульфат натрия в питьевую воду в течение семи дней. Через семь дней давали стандартную питьевую воду. Мышей взвешивали и оценивали ежедневно. Мышей подвергали эвтаназии для сбора тканей на 7 и 10 дни экспериментального графика.

Модель адаптивного переноса. Донорские селезенки ДТ и Lancl2-/- измельчали и обогащали по фракции CD4⁺ с помощью магнитной сортировки. Клетки CD4⁺CD45RB^{hi}CD25⁻ (Тэфф) и CD4⁺CD45RB^{lo}CD25⁺ (Трег) сортировали с помощью сортировщика клеток FACSAria. Исходя из обозначенной экспериментальной группы, мышши-реципиенты Rag2-/-, путем внутрибрюшинной инъекции, получали 4×10^5 Тэфф и 1×10^5 Трег клеток от мышши ДТ или Lancl2-/-. После переноса мышши ежедневно получали лечение ВТ-11. Мышши взвешивали и оценивали еженедельно до эвтаназии которую проводили через 8 недель после переноса.

Проточная цитометрия.

Толстые кишки и брыжеечные лимфатические узлы (БЛУ) помещали в буфер RPMI/FBS, содержащий коллагеназу (300 Ед/мл) и ДНКазу (50 Ед/мл) для расщепления. После фильтрации полученных суспензий отдельных клеток, иммунные клетки очищали с помощью градиента Перколла. Клетки метили смесью внеклеточных (CD45, CD3, CD4, CD8, CD19, NK1.1, CD25, F4/80, CD11b, CX3CR1, CD64) и внутриклеточных (Tbet, ROR γ T, FOXP3, ИФН γ , ИЛ17, ИЛ10) антител с последующим окрашиванием живых клеток в 96-луночных плашках. Данные были получены с использованием проточного цитометра FACS Celesta с программным обеспечением FACSDiva.

Генная экспрессия.

Совокупную РНК из толстой кишки и клеток получали с использованием мини-набора Qiagen RNeasy. кДНК получали с использованием набора для синтеза кДНК BioRad iScript. Стандартные кривые были получены путем серийного разбавления очищенного продукта из стандартной реакции ПЦР с ДНК-полимеразой Taq с последующей очисткой с использованием набора для очистки Qiagen MinElute PCR. Уровни экспрессии получали из количественной ПЦР в реальном времени с использованием супермикса SybrGreen на термоциклере BioRad CFX96 с последующей нормализацией относительно экспрессии β -актина, как описано ранее [33].

Гистопатология.

Окрашенные ГЭ срезы толстой кишки готовили из частей толстых кишок, собранных в 10% забуференный формалин и помещенных в парафин. Препараты были изучены сертифицированным ветеринарным патологоанатомом с помощью микроскопа Olympus, и изображения были получены с помощью программного обеспечения Image-Pro. Образцы были оценены (0-4) на лейкоцитарную инфильтрацию, эпителиальную эрозию и утолщение слизистой оболочки.

Метаболический анализ.

Толстые кишки и клетки суспендировали в специфическом буфере для анализа и гомогенизировали в течение 10 секунд. Гомогенат центрифугировали в течение 10 минут при $10000 \times g$. Для анализа ферментной активности, супернатант собирали и высевали. Образцы смешивали с проявителем фермента и субстратом. Колориметрическое определение продуцирования НАДН измеряли с помощью считывателя плашек BioTek μ Quant в комбинации с программным обеспечением Gen5. Для анализа ФЕП, супернатант

депротеинизировали, используя очистку, опосредованную хлорной кислотой. Образцы высевали и смешивали с зондом, конвертером, проявительной смесью. Концентрацию ФЕП измеряли путем количественного определения оптической плотности на считывателе плашек.

Культивирование CD4+ T-лимфоцитов in vitro.

Селезенки мышей ДТ и Lancl2-/- изымали и измельчали для получения суспензии отдельных клеток. Фракцию CD4+ T-лимфоцитов обогащали путем отрицательного отбора с помощью магнитной сортировки с помощью системы BD IMag. Наивные CD4+ T-лимфоциты получали путем инкубации с биотинилированным антителом CD62L с последующим конъюгированием с магнитными гранулами, покрытыми стрептавидином. Наивные клетки инкубировали в течение 48 часов в покрытых анти-CD3 плашках для тканевых культур в полной среде IMDM, содержащей полностью-трансретиноевую кислоту и очищенный ТФР-β, чтобы стимулировать дифференцировку в Трег [18]. Клетки высевали в среду, содержащую обозначенную концентрацию ВТ-11, от 0 до 48 часов. Метаболические модуляторы, PS-48 (5 мкМ), DASA-58 (10 мкМ) и тапсигаргин (10 нМ), добавляли в 0 часов. Для совместного анализа, фракцию CD4+ и Трег получали, как описано, и высевали в одну и ту же лунку в соотношении 1:1 2×10^5 клеток каждая, без ВТ-11 и инкубировали вместе в течение 24 часов. За шесть часов до анализа клетки стимулировали ФМА (форбол мирестат ацетат) и иономицином. Клетки собирали из плашки для последующего анализа проточной цитометрией, анализа экспрессии генов и метаболического анализа.

Выделение и культивирование МКПК человека.

Свежая, с удаленной персональной информацией, цельная кровь была получена от коммерческого поставщика. Кровь разбавляли и очищали для получения фракции МКПК с помощью пробирки LeukoSep. Оставшиеся эритроциты лизировали гипотоническим лизисом. Клетки высевали в лунки с анти-CD3-покрытием в полную среду RPMI и инкубировали с ВТ-11 в течение 24 часов. Для экспериментов с миРНК, клетки сначала инкубировали с 3-олигомерной миРНК LANCL2 OriGene или скремблированным контролем, суспендированным в реагенте для трансфекции ViomerGreen в течение 6 часов. Спустя шесть часов клетки промывали и ресуспендировали в свежей среде, содержащей ВТ-11. Клетки стимулировали ФМА и иономицином за шесть часов до анализа. После 48 часов обработки ВТ-11 клетки собирали для проточной цитометрии, анализа экспрессии генов и метаболического анализа.

Статистический анализ.

Данные выражены как среднее ± СОС. Параметрические данные анализировали с помощью дисперсионного анализа с последующим анализом множественным сравнением Шеффе. Дисперсионный анализ выполняли с использованием общей линейной модели SAS (SAS Institute, Кэри, Северная Каролина). Использовали факторный порядок 2×2, сравнивающий генотип и лечение. Статистическую значимость определяли как $P < 0,05$.

Результаты

BT-11 уменьшает уровни гистопатологических, клеточных и молекулярных маркеров воспаления ВЗК в модели Mdr1a-/-.

Мышам Mdr1a-/- вводили через пероральный зонд ежедневно по 8 мг/кг BT-11 или носителя в течение шестинедельного периода, начинающегося в возрасте четырех недель. Пероральное лечение BT-11 предотвращало развитие заболевания в течение шестинедельного периода (Фиг. 1А, панель А) и уменьшало лейкоцитарную инфильтрацию толстой кишки, эпителиальную эрозию и утолщение слизистой оболочки к возрасту 10 недель (Фиг. 1А, панели В-С). Согласно проточной цитометрии, значимое ($P < 0,05$) снижение клеток Th1 (CD4+Tbet+ИФН γ +) и Th17 (CD4+ROR γ T+ИЛ17+) происходило в собственной пластинке толстой кишки (СП) (Фиг. 1В, панели D-E) и в брыжеечных лимфатических узлах (БЛУ) (Фиг. 1С, панели G-H), обработанных BT-11. В противоположность этому, BT-11 увеличивал процент ИЛ-10-продуцирующих клеточных субпопуляций, включая макрофаги CX3CR1+ (CX3CR1+F4/80^{hi}CD11b+CD64+) в СП толстой кишки и индуцированные Трег лимфоциты (CD4+FOXP3+ИЛ10+) в СП толстой кишки и БЛУ (Фиг. 1В, панель F; Фиг. 1С, панель I). Снижение уровня воспалительных цитокинов, ИФН γ (Фиг. 1D, панель J), ИЛ17А (Фиг. 1D, панель K), ИЛ6 (Фиг. 1F, панель O), ФНО α (Фиг. 1E, панель M) и Msp1 (Фиг. 1E, панель L), было подтверждено экспрессией генов в толстой кишке и с помощью цитометрического анализа с гранулами. Дополнительно, пероральная обработка с помощью BT-11 активировала экспрессию LANCL2 в толстой кишке (Фиг. 1F, панель N). В дополнение к профилактическому функционированию, BT-11 проявляет эффективность при терапевтическом назначении, начиная с момента появления симптомов в возрасте 7 недель.

Экспрессия LANCL2 в CD4+ Т-лимфоцитах необходима для терапевтической эффективности BT-11.

Мыши с CD4-специфичной делецией LANCL2 (Lancl2fl/flCD4cre+; Lancl2 Δ^T) были получены с использованием технологии cre-lox. Lancl2 Δ^T и Lancl2-экспрессирующие контроли подвергались воздействию ДСН в течение семидневного периода и обрабатывались перорально BT-11 или контролем-носителем. Потеря LANCL2 в CD4+ Т-лимфоцитах полностью отменяла эффективность BT-11 (Фиг. 2А-2С). Lancl2 Δ^T продемонстрировали повышенную активность заболевания, потерю массы и увеличенную тяжесть гистопатологических поражений толстой кишки (Фиг. 2А, панели А-В; Фиг. 2В, панель С). На клеточном уровне, Lancl2 Δ^T , обработанные BT-11, не смогли достичь характерного снижения уровня клеток Th1 и Th17 в толстой кишке, а также размножить продуцирующие ИЛ-10 макрофаги CX3CR1+ (Фиг. 2С, панели D-F). Обработанные и необработанные BT-11 Lancl2 Δ^T мыши экспрессировали более высокие уровни воспалительных цитокинов в толстой кишке (Фиг. 2С, панели G-J).

Пероральная обработка BT-11 подавляет воспаление по Трег-зависимому механизму.

Чтобы дополнительно охарактеризовать клеточный механизм действия BT-11 и зависимость его терапевтической эффективности от Т-лимфоцитов, мы использовали

совместный перенос эффекторных (Тэфф) и регуляторных (Трег) CD4⁺ Т-лимфоцитов из либо доноров дикого типа (ДТ), либо доноров (КО) Lancl2^{-/-}, мышам Rag2^{-/-} (Фиг. 3А-3С). Среди экспериментальных групп, которым перенесли Тэфф ДТ, только в группе, которой совместно перенесли Трег ДТ, наблюдалось постоянное снижение воспаления при обработке ВТ-11 по всем показателям, включая активность заболевания (Фиг. 3А, панели А-В), гистопатологическую оценку (Фиг. 3В, панель С), популяции Th1 (Фиг. 3В, панель D) и нейтрофилов (Фиг. 3В, панель E) в СП толстой кишке и экспрессию воспалительных цитокинов (Фиг. 3С, панели F-H). Примечательно, что группа Тэфф ДТ/КО Трег не показала преимуществ лечения ВТ-11 в клеточных или гистопатологических оценках воспаления. Аналогично, пероральная обработка ВТ-11 показала эффективность у реципиентов Трег ДТ клеток даже при совместном переносе КО Тэфф. Эти мыши имели показатели активности заболевания, лейкоцитарной инфильтрации, Th1, и нейтрофилов примерно на уровне таковых в группе Тэфф ДТ/Трег ДТ. Эти результаты в комбинации с потерей эффективности у мышей Lancl2^{ΔT}, при воздействии ДСН, еще раз подтверждают, что механизм действия ВТ-11 заключается в активации LANCL2 в клетках Трег.

Обработка Трег с помощью ВТ-11 увеличивает супрессирующую способность и стабильность фенотипа.

Чтобы прямо подтвердить результаты модели адоптивного переноса, был проведен совместный анализ клеток CD4⁺ и Трег. Клетки Трег из доноров ДТ и КО выделяли для культивирования в дифференцирующих средах Трег (АТРА, ТФРβ) и обрабатывали ВТ-11 в течение двухдневного периода. Спустя два дня клетки собирали и высевали с свежесобранными CFSE- меченными CD4⁺ Т-лимфоцитами. Трег ДТ, обработанные ВТ-11, снижали пролиферативный индекс клеток ДТ и КО в дополнение к экспрессии ФНОα и ИФНγ⁺, как измерено с помощью цитометрического анализа с гранулами (Фиг. 4, панели А-С). В противоположность этому, предварительная обработка КО Трег с помощью ВТ-11 не вызывала изменений в каком-либо измерении. Трег ДТ, предварительно обработанные ВТ-11, также продемонстрировали сохранение фенотипа Трег (FOXP3+ИЛ10⁺) после 24-часового периода совместного анализа. Чтобы изучить это явление, мы проанализировали экспрессию панели генов, которые определяют стабильность фенотипа Трег [34], включая Socs2, Carп3, Irf7, Lag3, Ikzf2 и P2rx7 (Фиг. 4, панели D-I). Socs2, Carп3, Irf7 и Lag3 продемонстрировали дозозависимое увеличение в Трег ДТ после 48 часов обработки ВТ-11, что привело к значительному усилению экспрессии при дозе 0,625 мкМ ВТ-11. P2rx7 не показал эффекта при более низких дозах, но значительно повышалась экспрессия (P<0,05) при дозе 0,625 мкМ ВТ-11. Между тем, Ikzf2 был единственным геном, демонстрирующим значительные различия по генотипу. В комбинации с наблюдаемым сохранением фенотипа Трег-клеток, эти результаты экспрессии позволяют предположить, что активация LANCL2 с помощью ВТ-11 индуцирует стабильную экспрессию Трег-ассоциированных генов.

ВТ-11 индуцирует стабильность клеток Трег посредством

иммунометаболических механизмов контроля баланса глюкозы.

Учитывая указанное участие LANCL2 в метаболизме глюкозы [35,36] и важность метаболического профиля для дифференцировки CD4⁺ Т-лимфоцитов было изучено влияние ВТ-11 на гликолиз. Экспрессия двух гликолитических ферментов, Pkm2 и Eno1, была значительно изменена при потере LANCL2 в Трег лимфоцитах *in vitro* (Фиг. 5А, панели А-В). При обработке ВТ-11 наблюдалось основательное изменение функциональной активности фермента. При анализе активности фермента, обработанные 0,625 мкМ Трег ДТ, продемонстрировали увеличение активности пируваткиназы (Фиг. 5А, панель С). Концентрация субстрата, фосфоенолпирувата (ФЕП), пируваткиназы была значительно ниже в Трег, обработанных ВТ-11, по сравнению с контрольными группами, обработанными носителем (Фиг. 5В, панель Е). Кроме того, вступление в цикл трикарбоновых кислот (ЦТК), о чем свидетельствует активность пируватдегидрогеназы (ПДГ), стимулировалось обработкой ВТ-11, в частности дозами 0,156 мкМ и 0,625 мкМ (Фиг. 5В, панель F). Индуцированное ВТ-11 снижение активности ФЕП и ПДГ отменялось обработкой PS-48, низкомолекулярным ингибитором ПДГ (Фиг. 5В, панели G-H). Это говорит о том, что ВТ-11-опосредованное воздействие на гликолитический путь зависит от эффективного продвижения субстрата в направлении цикла ЦТК. Обработка PS-48 блокирует повышенную дифференциацию Трег, порождаемую ВТ-11 (Фиг. 5В, панель D). Кроме того, ингибирование сигналинга SERCA с помощью тапсигаргина уменьшает индуцированное ВТ-11 увеличение дифференцировки клеток Трег, в то время как стимуляция активности пируваткиназы с помощью DASA-58 способствует высокому уровню дифференцировки как обработанных, так и необработанных клеток, демонстрируя важность конечной стадии процессов гликолиза в дифференцировке CD4⁺ Т-лимфоцитов.

Ингибирование метаболических эффектов с помощью ВТ-11 отменяет эффективность у мышей Mdr1a/- с ВЗК.

Для подтверждения результатов исследования иммунометаболизма *in vitro*, мышам Mdr1a/- еженедельно вводили внутривентральные инъекции PS-48 или контрольного носителя. Мыши, которых перорально обрабатывали ВТ-11 и которым давали инъекции носителя, продемонстрировали ожидаемые тенденции относительно активности заболевания, гистопатологии (Фиг. 6А, панели А-D) и популяций CD4⁺ Т-лимфоцитов (Фиг. 6В, панели E-G), как определено ранее. Метаболические изменения *in vitro* были подтверждены в толстой кишке в возрасте 10 недель, в виде пониженной концентрации ФЕП и повышенной активности ПДГ при обработке ВТ-11 (Фиг. 6В, панели H-I). Дополнительно, экспрессия генов, связанных со стабильностью Трег лимфоцитов, была повышена при обработке ВТ-11 (Фиг. 6В, панель J; Фиг. 6С, панели K-O). С помощью клинических, клеточных и метаболических измерений было продемонстрировано, что PS-48 эффективно блокировал изменения, вызванные ВТ-11. При инъекции PS-48, необработанные и обработанные ВТ-11 мыши, не имели заметных различий в гистологии, популяциях CD4⁺ Т-лимфоцитов и метаболических параметрах. Подобные закономерности наблюдались в модели ДСН.

BT-11 вызывает противовоспалительные эффекты в МКПК, которые были выделены из доноров, страдающих от болезни Крона.

Цельная кровь была получена от пациентов с болезнью Крона, с классификацией болезни от легкой до умеренной. При обработке BT-11, выделенные МКПК имели более высокий процент клеток ИЛ-10⁺ и FOXP3⁺, и более низкий процент клеток ФНО α ⁺ и ИФН γ ⁺ (Фиг. 7А, панели А-В; Фиг. 7В, панели С-Д). Чтобы продемонстрировать LANCL2-специфичность BT-11 в клетках человека, МКПК трансфицировали миРНК Lancl2 или скремблированным контролем. После трансфекции миРНК, воздействия BT-11 на клетки ИЛ10⁺ и ИФН γ ⁺ утрачивались (Фиг. 7С, панели Е-Ф). Из фракции МКПК были получены наивные CD4⁺ Т-лимфоциты и дифференцированы в Трег в присутствии BT-11. Как наблюдали в мышинных клетках, BT-11 индуцировал повышенную экспрессию связанных со стабильностью маркеров Трег в дозозависимой фракции (Фиг. 7D, панели G-L). Дополнительно, в Трег человека наблюдали метаболические шаблоны активности пируваткиназы и пируватдегидрогеназы (Фиг. 7Е, панель M). Тапсигаргин предотвращал повышенную индукцию клеток FOXP3⁺ в МКПК, обработанных BT-11 (Фиг. 7Е, панель N). Между тем, BT-11 предотвращал увеличенный переход к эффекторным фенотипам в присутствии увеличенной концентрации ФЕП (Фиг. 7Е, панель O). Эти результаты демонстрируют проецируемость эффективности BT-11 для людей.

Обсуждение

BT-11 является перорально активным, локально действующим первым в своем классе терапевтическим средством для лечения ВЗК и других воспалительных патологий. Посредством этого исследования мы демонстрируем терапевтическую эффективность на трех отдельных мышинных моделях ВЗК и определяем новый иммунометаболический механизм действия BT-11 через LANCL2. BT-11 - это низкомолекулярное терапевтическое средство с физико-химическими свойствами, спроектированными и оптимизированными для локализованного действия в ЖКТ, сводя к минимуму риск системных побочных эффектов. Безвредный профиль безопасности у крыс вплоть до предельной дозы 1000 мг BT-11/кг [32] дополнительно указывает на низкий риск возможных побочных эффектов. BT-11 нацелен на путь LANCL2, который, как было отмечено, не обладает какими-либо генетическими мутациями, которые бы делали его активацию бесполезной, тем самым используя преимущество нового механизма иммунорегуляции, который сильно экспрессируется в слизистой оболочке ЖКТ в эпителиальных и иммунных клетках. В этой рукописи мы определили, что BT-11 функционирует, воздействуя на корневую проблему ВЗК - дисбаланс эффекторных и регуляторных CD4⁺ Т-лимфоцитов. Дополнительно, мы демонстрируем, что BT-11 способен повышать и восстанавливать низкоуровневую экспрессию LANCL2 в ЖКТ, восстанавливая любые функциональные нарушения, вызванные воспалением при ВЗК.

Отсутствие окончательной животной модели является характерной проблемой при разработке новых терапевтических средств при многофакторных заболеваниях, таких как ВЗК. С этой целью мы подтвердили эффективность BT-11 в устоявшихся моделях,

включающих в себя химические, клеточные и генетические способы индукции. ВТ-11 ингибирует избыточное воспаление даже при потере барьерной функции эпителиальных клеток и транслокации бактерий в модели ДСН, что свидетельствует о способности поддерживать гомеостаз слизистой оболочки при наличии кратковременного повреждения эпителия. Между тем, в модели адоптивного переноса ВТ-11 демонстрирует способность блокировать воспаление, вызванное Т-лимфоцитами, в нестандартизированной среде. С потерей распознавания неопасных антигенов, типично предполагаемого элемента для патогенеза ВЗК, эта способность имеет решающее значение для успешного лечения.

Модель *Mdr1a*^{-/-} определенно является многообещающей моделью с проецированием на человека. В отличие от других генетических моделей заболевания, которые дают мышей с ослабленным иммунитетом, мыши *Mdr1a*^{-/-} являются иммунитет-полноценными [37], с делецией вместо воздействия на клеточную способность выводить молекулы и предотвращать клеточный стресс. Накопление отходов и побочных продуктов приводит к нарушению регуляции жизненного цикла эпителиальных клеток и увеличению секреции воспалительных цитокинов и хемокинов. Таким образом, это приводит к хроническому и самопроизвольному началу заболевания с первичными инициирующими событиями, происходящими в эпителии. Дополнительно, ген *MDR1* является аллелем возникновения риска ВЗК и влияет на чувствительность к лечению глюкокортикоидами [38,39]. Была определена связь между конкретным полиморфизмом в гене *MDR1*, 1236T, и повышенным риском хирургической резекции у пациентов с БК (болезнью Крона) [40]. Способность ВТ-11 обеспечивать терапевтическую эффективность в отсутствие этого гена является важным показателем устойчивости в присутствии генетических аномалий и обосновывает эффективность при проецировании на человека.

Достижения в междисциплинарной области иммунометаболизма все больше связаны с пониманием развития аутоиммунных заболеваний, нарушений пищеварения, и рака, и предлагают новые неиспользованные возможности для терапевтического усовершенствования. Вовлечение механизма действия ВТ-11 в поздней стадии гликолиза имеет особое, трехкратное значение для дифференцировки и стабильности Трег лимфоцитов и индукции ремиссии. Во-первых, повышенная транскрипция *Eno1* снижает экспрессию *FOXP3-E2*, изоформа *FOXP3* связана с большей подавляющей способностью [22]. Хотя сама свободная енолаза может быть связана с измененной экспрессией *FOXP3*, *MVP1*, транскрипционный репрессор промоторов *FOXP3*, является альтернативной изоформой, транскрибируемой с гена *Eno1* [41]. Снижение общей транскрипции *Eno1* и захват ферментативной изоформы в гликолизе, тем самым уменьшают экспрессию *MVP1* и предотвращают ингибирование экспрессии *FOXP3*. Во-вторых, баланс между продуцированием лактата и вступлением в цикл ЦТК является критическим разделением между Тэфф (способствующие аутоиммунному заболеванию) и Трег (лечащие или предупреждающие аутоиммунное заболевание) подгруппами *CD4+* Т-лимфоцитов, причем множественные факторы, контролирующие это разделение, связаны со способностью создавать и поддерживать популяцию Трег и толерантность в ткани,

пораженной аутоиммунным или воспалительным заболеванием. В-третьих, способность эффективно превращать ФЕП в пируват является требованием для беспрепятственного сигналинга SERCA [19,23]. Правильный сигналинг через путь SERCA является контрольной точкой для активности транскрипционных активаторов FOXP3, влияющих на способность STAT3 связываться с областью CNS2, сайтом сайленсера, посредством ацетилирования гистонов [42]. Эти модификации гистонов необходимы для продолжения экспрессии FOXP3 в делящихся Трег лимфоцитах, и их потеря приводит к неспособности подавить воспаление кишечника [43,44]. С измененным паттерном метилирования, Трег более восприимчивы к совместному образованию воспалительных цитокинов и промежуточного фенотипа, связанного с ВЗК [45]. Образование внутриклеточного ФЕП может активировать множество воспалительных путей от продуцирования лактата до формирования стресса эндоплазматического ретикулума [46,47], что способствует формированию воспалительных иммунных клеток и выживанию эпителиальных клеток. В то время как влияние сигналинга SERCA на CD4⁺ Т-лимфоциты при ВЗК, в настоящее время не изучено, ранее была обнаружена связь между ингибированной функцией SERCA и уменьшением сократимости толстой кишки и тонкой кишки, что приводило к измененному механосенсорному поведению [48].

Повышенная экспрессия целой панели генов, связанных со стабильностью Трег лимфоцитов, предполагает наличие влияния ВТ-11 прямо на активность FOXP3 или восходящего контроля транскрипционного фактора. Хотя гены вместе указывают на большую подавляющую способность и стабильность, эти нисходящие мишени имеют важное обособленное влияние на заболевание. Irf7 может усиливать экспрессию FOXP3 [49], а его отсутствие усугубляет тяжесть колита [50]. Lag3 является важной поверхностной молекулой с подавляющей способностью, и его экспрессия значительно повышает эффективность видов лечения на основе Трег при ВЗК [51]. Socs2 может подавлять экспрессию ИФН γ [52] и активацию антигенпрезентирующих клеток [53]. В целом, ВТ-11 обеспечивает усиление регуляторного и противовоспалительного поведения, что способствует возникновению более стабильных и противовоспалительных популяций Трег лимфоцитов.

Мы приводим доказательства того, что обработка ВТ-11 улучшает свойства Трег лимфоцитов в дополнение к их дифференцировке посредством усиленного подавления пролиферации CD4⁺ в совместных анализах. В то время как результаты в этой рукописи сосредоточены главным образом на активностях иТрег (индуцированных Трег), оценивание ВТ-11 на популяциях природных Трег дает дополнительную информацию для применения в терапевтических целях. В частности, на Helios, кодируемый геном Ikzf2 и являющийся маркером-кандидатом для различения пТрег (природных Трег) и иТрег [54,55], влияет экспрессия LANCL2, что указывает на потенциальную роль активации LANCL2 в образовании пТрег лимфоцитов. Обнаружено, что возникновение ВЗК и обострение тяжести заболевания связано с небольшими изменениями в пищевом рационе и микробиоме комменсалов кишечника с самопроизвольным развитием реакционной

способности к традиционно безвредным антигенам. Обладая современными знаниями, ожидается, что пероральное лечение ВТ-11 будет стимулировать и восстанавливать местную толерантность в этих ситуациях.

В дополнение к терапевтической эффективности в проверенных мышинных клетках и моделях ВЗК, а также в поддержку его потенциала в проецировании на человека, ВТ-11 стимулирует сильные эффекты в МКПК человека. ВТ-11 снижает продуцирование двух значимых воспалительных цитокинов, ФНО α и ИФН γ , в клетках, полученных из пациентов с болезнью Крона с от средней до тяжелой формой заболевания. Способность индуцировать естественное снижение экспрессии ФНО α предполагает наличие способности занимать то же терапевтическое пространство, что и биопрепараты анти-ФНО α , у пациентов с болезнью Крона с от средней до тяжелой степени. Помимо резких сдвигов в продуцировании цитокинов и дифференцировке клеток, мы демонстрируем, что выявленные механизмы действия проецируются с мышинных клеток на клетки человека с точки зрения специфичности LANCL2 и иммунометаболических путей. Общий механизм действия обосновывает целесообразность проецирования терапевтической эффективности с доклинических моделей заболеваний и патологии на клинические испытания. Благодаря этому исследованию и предыдущим усилиям [31,32], ВТ-11 стал многообещающим терапевтическим средством для решения неудовлетворенной клинической потребности в более безопасных и эффективных пероральных терапевтических средствах для лечения болезни Крона, язвенного колита и других патологий. При использовании новых иммунометаболических механизмов при участии LANCL2, ВТ-11 занимает уникальное место в качестве лекарства.

Данные указывают на эффективность ВТ-11 или других LANCL2-связывающих соединений, описанных в данном документе, или клеток, активированных ВТ-11 или другими LANCL2-связывающими соединениями, описанными в данном документе, в лечении инфекционных заболеваний, таких как инфекция *S. difficile*, других бактериальных заболеваний, и другие инфекционных заболеваний; гиперпролиферативных нарушений, таких как семейный аденоматозный полипоз, колоректальный рак, другие виды рака желудочно-кишечного тракта и другие виды рака; врожденных дефектов метаболизма, таких как болезнь Андерсена, другие болезни накопления гликогена и другие врожденные дефекты метаболизма; хронических иммунометаболических заболеваний, таких как атеросклероз, другие сердечно-сосудистые заболевания, гипертония и другие иммунометаболические заболевания; аутоиммунных заболеваний, таких как волчанка, рассеянный склероз, ревматические заболевания, вызванные иммунотерапией рака, другие аутоиммунные заболевания, вызванные иммунотерапией рака, и другие аутоиммунные заболевания; отторжения трансплантированного органа; воспалительных нарушений, таких как острый дивертикулит толстой кишки и вызванное облучением воспаление желудочно-кишечного тракта, такое как радиационный проктит, радиационный энтерит и радиационный проктосигмоидит, и другие воспалительные нарушения; и хронической боли, такой как

фибромиалгия, и других видов хронической боли.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Colombel JF, Mahadevan U. Inflammatory Bowel Disease 2017: Innovations and Changing Paradigms. *Gastroenterology* 2017;152:309-312.
2. Kaplan GG. The global burden of IBD: from 2015 to 2025. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2015;12:720-7.
3. Danese S, Fiocchi C, Panes J. Drug development in IBD: from novel target identification to early clinical trials. *Gut* 2016;65:1233-9.
4. Yajnik V, Khan N, Dubinsky M, et al. Efficacy and Safety of Vedolizumab in Ulcerative Colitis and Crohn's Disease Patients Stratified by Age. *Adv Ther* 2017;34:542-559.
5. Vande Casteele N, Ferrante M, Van Assche G, et al. Trough concentrations of infliximab guide dosing for patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2015;148:1320-9 e3.
6. Keane J, Gershon S, Wise RP, et al. Tuberculosis associated with infliximab, a tumor necrosis factor alpha-neutralizing agent. *N Engl J Med* 2001;345:1098-104.
7. Tillack C, Ehmann LM, Friedrich M, et al. Anti-TNF antibody-induced psoriasiform skin lesions in patients with inflammatory bowel disease are characterised by interferon-gamma-expressing Th1 cells and IL-17A/IL-22-expressing Th17 cells and respond to anti-IL-12/IL-23 antibody treatment. *Gut* 2014;63:567-77.
8. Zenewicz LA, Antov A, Flavell RA. CD4 T-cell differentiation and inflammatory bowel disease. *Trends Mol Med* 2009;15:199-207.
9. Strober W, Fuss IJ. Proinflammatory cytokines in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 2011;140:1756-1767.
10. Maul J, Loddenkemper C, Mundt P, et al. Peripheral and intestinal regulatory CD4+CD25(high) T cells in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2005;128:1868-78.
11. Holmen N, Lundgren A, Lundin S, et al. Functional CD4+CD25high regulatory T cells are enriched in the colonic mucosa of patients with active ulcerative colitis and increase with disease activity. *Inflamm Bowel Dis* 2006;12:447-56.
12. Eastaff-Leung N, Mabarrack N, Barbour A, et al. Foxp3+ regulatory T cells, Th17 effector cells, and cytokine environment in inflammatory bowel disease. *J Clin Immunol* 2010;30:80-9.
13. Shevach EM, Davidson TS, Huter EN, et al. Role of TGF-Beta in the induction of Foxp3 expression and T regulatory cell function. *J Clin Immunol* 2008;28:640-6.
14. Uhlig HH, Coombes J, Mottet C, et al. Characterization of Foxp3+CD4+CD25+ and IL-10-secreting CD4+CD25+ T cells during cure of colitis. *J Immunol* 2006;177:5852-60.
15. Li Z, Arijs I, De Hertogh G, et al. Reciprocal changes of Foxp3 expression in blood and intestinal mucosa in IBD patients responding to infliximab. *Inflamm Bowel Dis* 2010;16:1299-310.
16. Leber A, Hontecillas R, Tubau-Juni N, et al. Translating nutritional immunology into drug development for inflammatory bowel disease. *Curr Opin Gastroenterol* 2016;32:443-449.

17. Mathis D, Shoelson SE. Immunometabolism: an emerging frontier. *Nat Rev Immunol* 2011;11:81.
18. Leber A, Hontecillas R, Tubau-Juni N, et al. NLRX1 Regulates Effector and Metabolic Functions of CD4+ T Cells. *J Immunol* 2017;198:2260-2268.
19. Newton R, Priyadharshini B, Turka LA. Immunometabolism of regulatory T cells. *Nat Immunol* 2016;17:618-25.
20. Wolf AJ, Reyes CN, Liang W, et al. Hexokinase Is an Innate Immune Receptor for the Detection of Bacterial Peptidoglycan. *Cell* 2016;166:624-36.
21. Chang CH, Curtis JD, Maggi LB, Jr., et al. Posttranscriptional control of T cell effector function by aerobic glycolysis. *Cell* 2013;153:1239-51.
22. De Rosa V, Galgani M, Porcellini A, et al. Glycolysis controls the induction of human regulatory T cells by modulating the expression of FOXP3 exon 2 splicing variants. *Nat Immunol* 2015;16:1174-84.
23. Ho PC, Bihuniak JD, Macintyre AN, et al. Phosphoenolpyruvate Is a Metabolic Checkpoint of Anti-tumor T Cell Responses. *Cell* 2015;162:1217-28.
24. Cantarini L, Pucino V, Vitale A, et al. Immunometabolic biomarkers of inflammation in Behcet's disease: relationship with epidemiological profile, disease activity and therapeutic regimens. *Clin Exp Immunol* 2016;184:197-207.
25. Carbo A, Gandour RD, Hontecillas R, et al. An N, N-Bis(benzimidazolylpicolinoyl)piperazine (BT-11): A Novel Lanthionine Synthetase C-Like 2-Based Therapeutic for Inflammatory Bowel Disease. *Journal of Medicinal Chemistry* 2016.
26. Fullerton MD, Steinberg GR, Schertzer JD. Immunometabolism of AMPK in insulin resistance and atherosclerosis. *Mol Cell Endocrinol* 2013;366:224-34.
27. Souza CO, Teixeira AA, Lima EA, et al. Palmitoleic acid (n-7) attenuates the immunometabolic disturbances caused by a high-fat diet independently of PPARalpha. *Mediators Inflamm* 2014;2014:582197.
28. Sturla L, Fresia C, Guida L, et al. LANCL2 is necessary for abscisic acid binding and signaling in human granulocytes and in rat insulinoma cells. *J Biol Chem* 2009;284:28045-57.
29. Lu P, Hontecillas R, Horne WT, et al. Computational modeling-based discovery of novel classes of anti-inflammatory drugs that target lanthionine synthetase C-like protein 2. *PLoS One* 2012;7:e34643.
30. Bassaganya-Riera J, Carbo A, Gandour RD, et al. Novel LANCL2-based Therapeutics, 2016.
31. Carbo A, Gandour RD, Hontecillas R, et al. An N, N-Bis(benzimidazolylpicolinoyl)piperazine (BT-11): A Novel Lanthionine Synthetase C-Like 2-Based Therapeutic for Inflammatory Bowel Disease. *J Med Chem* 2016;59:10113-10126.
32. Bissel P, Boes K, Hinckley J, et al. Exploratory Studies With BT-11: A Proposed Orally Active Therapeutic for Crohn's Disease. *Int J Toxicol* 2016;35:521-9.
33. Bassaganya-Riera J, Reynolds K, Martino-Catt S, et al. Activation of PPAR gamma and delta by conjugated linoleic acid mediates protection from experimental inflammatory bowel

disease. *Gastroenterology* 2004;127:777-91.

34. Delgoffe GM, Woo SR, Turnis ME, et al. Stability and function of regulatory T cells is maintained by a neuropilin-1-semaphorin-4a axis. *Nature* 2013;501:252-6.

35. Bassaganya-Riera J, Guri AJ, Lu P, et al. Abscisic acid regulates inflammation via ligand-binding domain-independent activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J Biol Chem* 2011;286:2504-16.

36. Zocchi E, Hontecillas R, Leber A, et al. Abscisic Acid: A Novel Nutraceutical for Glycemic Control. *Front Nutr* 2017;4:24.

37. Haarberg KM, Wymore Brand MJ, Overstreet AM, et al. Orally administered extract from *Prunella vulgaris* attenuates spontaneous colitis in *mdr1a(-/-)* mice. *World J Gastrointest Pharmacol Ther* 2015;6:223-37.

38. Schwab M, Schaeffeler E, Marx C, et al. Association between the C3435T MDR1 gene polymorphism and susceptibility for ulcerative colitis. *Gastroenterology* 2003;124:26-33.

39. Yang QF, Chen BL, Zhang QS, et al. Contribution of MDR1 gene polymorphisms on IBD predisposition and response to glucocorticoids in IBD in a Chinese population. *J Dig Dis* 2015;16:22-30.

40. Bouzidi A, Mesbah-Amroun H, Boukercha A, et al. Association between MDR1 gene polymorphisms and the risk of Crohn's disease in a cohort of Algerian pediatric patients. *Pediatr Res* 2016;80:837-843.

41. Lung J, Liu KJ, Chang JY, et al. MBP-1 is efficiently encoded by an alternative transcript of the ENO1 gene but post-translationally regulated by proteasome-dependent protein turnover. *FEBS J* 2010;277:4308-21.

42. Mirlekar B, Ghorai S, Khetmalas M, et al. Nuclear matrix protein SMAR1 control regulatory T-cell fate during inflammatory bowel disease (IBD). *Mucosal Immunol* 2015;8:1184-200.

43. Li C, Jiang S, Liu SQ, et al. MeCP2 enforces Foxp3 expression to promote regulatory T cells' resilience to inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014;111:E2807-16.

44. Ohkura N, Hamaguchi M, Morikawa H, et al. T cell receptor stimulation-induced epigenetic changes and Foxp3 expression are independent and complementary events required for Treg cell development. *Immunity* 2012;37:785-99.

45. Li L, Boussiotis VA. The role of IL-17-producing Foxp3+ CD4+ T cells in inflammatory bowel disease and colon cancer. *Clin Immunol* 2013;148:246-53.

46. Mendez-Lucas A, Hyrossova P, Novellademunt L, et al. Mitochondrial phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK-M) is a pro-survival, endoplasmic reticulum (ER) stress response gene involved in tumor cell adaptation to nutrient availability. *J Biol Chem* 2014;289:22090-102.

47. Vincent EE, Sergushichev A, Griss T, et al. Mitochondrial Phosphoenolpyruvate Carboxykinase Regulates Metabolic Adaptation and Enables Glucose-Independent Tumor Growth. *Mol Cell* 2015;60:195-207.

48. Al-Jarallah A, Oriowo MA, Khan I. Mechanism of reduced colonic contractility in

experimental colitis: role of sarcoplasmic reticulum pump isoform-2. *Mol Cell Biochem* 2007;298:169-78.

49. Wang Z, Zheng Y, Hou C, et al. DNA methylation impairs TLR9 induced Foxp3 expression by attenuating IRF-7 binding activity in fulminant type 1 diabetes. *J Autoimmun* 2013;41:50-9.

50. Chiriac MT, Buchen B, Wandersee A, et al. Activation of Epithelial Signal Transducer and Activator of Transcription 1 by Interleukin 28 Controls Mucosal Healing in Mice With Colitis and Is Increased in Mucosa of Patients With Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology* 2017;153:123-138 e8.

51. Do JS, Visperas A, Sanogo YO, et al. An IL-27/Lag3 axis enhances Foxp3+ regulatory T cell-suppressive function and therapeutic efficacy. *Mucosal Immunol* 2016;9:137-45.

52. Cheng SM, Li JC, Lin SS, et al. HIV-1 transactivator protein induction of suppressor of cytokine signaling-2 contributes to dysregulation of IFN{gamma} signaling. *Blood* 2009;113:5192-201.

53. Posselt G, Schwarz H, Duschl A, et al. Suppressor of cytokine signaling 2 is a feedback inhibitor of TLR-induced activation in human monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol* 2011;187:2875-84.

54. Nakagawa H, Sido JM, Reyes EE, et al. Instability of Helios-deficient Tregs is associated with conversion to a T-effector phenotype and enhanced antitumor immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2016;113:6248-53.

55. Takatori H, Kawashima H, Matsuki A, et al. Helios Enhances Treg Cell Function in Cooperation With FoxP3. *Arthritis Rheumatol* 2015;67:1491-502.

ЛЕЧЕНИЕ ИНФЕКЦИИ С. DIFFICILE С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ИММУНОМЕТАБОЛИЧЕСКИХ МЕХАНИЗМОВ ПУТЕМ ПЕРОРАЛЬНОГО ВВЕДЕНИЯ ВТ-11

Введение

Повышение частоты инфекции *Clostridium difficile* (CDI) акцентирует внимания на факторах отбора антибиотиков, неудачных мерах контроля инфекции и недостатках современных способов лечения. Антимикробная терапия ванкомицином и метронидазолом дает ожидаемый ответ, составляющий 85-90%, сопровождаемый 20-25% риском рецидива для обоих препаратов [1-3]. Метронидазол является предпочтительной терапией первой линии из-за низкой стоимости и пониженного селективного давления на устойчивость к ванкомицину. Однако, оба способа лечения полностью разрушают нормальную микрофлору толстой кишки, которая обеспечивает устойчивость против колонизации *C. difficile* [4, 5]. Недавние исследования поставили под сомнение эффективность метронидазола для лечения CDI, как с точки зрения субоптимального первичного ответа, так и частоты рецидивов выше ожидаемой [6, 7]. Таким образом, оптимизация соединений, которые не содержат антибиотиков и способствуют разумному использованию антибиотиков и сохранению микробиома, является новой, своевременной

и остро необходимой. Следующие примеры используют иммунометаболические активности для лечения инфекции *C. difficile*.

Способы

Животная модель C. difficile.

Это исследование проводилось в соответствии с ранее описанной моделью инфекции *Clostridium difficile* [11,13,14]. До бактериального воздействия, мышей обрабатывали смесью антибиотиков в питьевой воде: колистин 850 Ед/мл (4,2 мг/кг), гентамицин 0,035 мг/мл (3,5 мг/кг), метронидазол 0,215 мг/мл (21,5 мг/мл) и ванкомицин 0,045 мг/мл (4,5 мг/кг) с последующей внутрибрюшинной инъекцией клиндамицина, 32 мг/кг, за один день до заражения. Заражение выполняли штаммом *C. difficile* VPI 10463 (ATCC 43255) 10^7 КОЕ/мышь в бульоне для бруцелл через желудочный зонд.

Проточная цитометрия.

Толстые кишки и брыжеечные лимфатические узлы (БЛУ) помещали в буфер RPMI/FBS, содержащий коллагеназу (300 Ед/мл) и ДНКазу (50 Ед/мл) для расщепления. После фильтрации полученных суспензий отдельных клеток, иммунные клетки очищали с помощью градиента Перколла. Клетки метили смесью внеклеточных (CD45, CD3, CD4, CD8, CD19, NK1.1, CD25, F4/80, CD11b, CX3CR1, CD64) и внутриклеточных (Tbet, ROR γ T, FOXP3, ИФН γ , ИЛ17, ИЛ10) антител с последующим окрашиванием живых клеток в 96-луночных плашках. Данные были получены с использованием проточного цитометра FACS Celesta с программным обеспечением FACSDiva.

Генная экспрессия.

Совокупную РНК из толстой кишки и клеток получали с использованием мини-набора Qiagen RNeasy. кДНК получали с использованием набора для синтеза кДНК BioRad iScript. Стандартные кривые были получены путем серийного разбавления очищенного продукта из стандартной реакции ПЦР с ДНК-полимеразой Taq с последующей очисткой с использованием набора для очистки Qiagen MinElute PCR. Уровни экспрессии были получены используя количественную ПЦР в реальном времени с супермиксом SybrGreen на термоциклере BioRad CFX96 с последующей нормализацией относительно экспрессии β -актина, как описано ранее [12].

Гистопатология.

Окрашенные ГЭ срезы толстой кишки готовили из частей толстых кишок, собранных в 10% забуференный формалин и помещенных в парафин. Препараты были изучены сертифицированным ветеринарным патологоанатомом с помощью микроскопа Olympus, и изображения были получены с помощью программного обеспечения Image-Pro. Образцы были оценены (0-4) на лейкоцитарную инфильтрацию, эпителиальную эрозию и утолщение слизистой оболочки.

Перевыделение бактерии

Содержимое толстой кишки собирали из вырезанных толстых кишок. Образцы гомогенизировали в среде-бульоне Brucella и инкубировали при 68 °C в течение одного часа. Образцы центрифугировали при 10000 об/мин в течение 30 секунд и супернатант

собирали. Супернатант серийно разбавляли (1:10, 1:100, 1:1000) и высевали на чашки с агаром Oxoid Clostridium difficile, содержащие селективную для Clostridium difficile добавку. Чашки инкубировали в анаэробных условиях с использованием набора анаэробной системы контейнеров BD EZ в течение 2 дней при 37 °С. Колонии подсчитывали и сравнивали с массой образца для нормализации.

Результаты

LANCL2 влияет на желудочно-кишечный микробиом.

Активация LANCL2 у мышей, инфицированных *C. difficile*, значительно увеличивает содержание baiCD на 4 dpi по сравнению с носителем (Фиг. 8, панель А). Доминирующие семейства бутирогенных, Lachnospiraceae и Ruminococcaceae, уменьшаются с потерей LANCL2 у неинфицированных мышей (Фиг. 8, панель В). Дополнительно, было обнаружено, что экспрессия антимикробных пептидов DefB1 и S100A8 повышается при CDI [11]. Следовательно, динамику комменсального микробиома замедляет воспаление, присутствующее в ответе на *C. difficile*, что указывает на то, что основанные на иммунорегуляции лекарственные средства оказывают положительный эффект на опосредованное микробиотой ингибирование экспансии и колонизации *C. difficile* [9].

BT-11 не обладает антимикробными свойствами в отношении C. difficile.

C. difficile инкубировали в анаэробных условиях в измельченной мясной среде, содержащей BT-11, носитель или ванкомицин в качестве положительного контроля. BT-11 испытывали при 1 мкг/мл, 10 мкг/мл и 100 мкг/мл. Результаты представлены на Фиг. 9. Ни одна концентрация испытанного BT-11 не вызывала уменьшение количества колониеобразующих единиц через 24 часа после инокуляции. Между тем, 10 мкг/мл ванкомицина уменьшили количество колониеобразующих единиц на 95%, с 4 миллионов до 200000. Воздействие BT-11 не изменило продуцирование токсина А или токсина В, или способность *C. difficile* образовывать споры.

BT-11 снижает тяжесть заболевания и защищает от летальности.

Инфицированным *C. difficile* мышам вводили 8 мг/кг/день BT-11 после заражения. Результаты представлены на Фиг. 10А-10С. Начиная со второго дня, у мышей, обработанных BT-11, наблюдались более низкие уровни симптомов, что приводило к снижению оценок активности заболевания. BT-11 обеспечивает полную защиту от летальности, наблюдаемой на уровне 60% выживаемости в контрольных группах, обработанных носителем. Однако, BT-11 не вызывал снижения нагрузки *C. difficile* в толстой кишке. BT-11 уменьшает патологию толстой кишки, включая уменьшение инфильтрации лейкоцитов в толстой кишке. В пределах собственной пластинки, BT-11 уменьшал уровень нейтрофилов, клеток Th1 и Th17, одновременно обеспечивая увеличение уровня регуляторных Т-лимфоцитов.

Обсуждение

LANCL2 был обнаружен в качестве терапевтической мишени для иммуноопосредованных [8] и инфекционных [9] заболеваний. LANCL2 экспрессируется в

эпителиальных и иммунных клетках желудочно-кишечного тракта (ЖКТ). Активация LANCL2 и обработка ВТ-11 модулируют ответы в интерфейсе иммунитета и метаболизма, и эти иммунометаболические механизмы оказывают терапевтические воздействия. Эти данные демонстрируют осуществимость активации иммунометаболических механизмов с помощью ВТ-11 для облегчения CDI. Учитывая, что патогенез заболевания при CDI частично вызван ее токсинами, а также дисрегуляцией провоспалительных иммунных реакций, мы оценили эффективность поражения LANCL2 с помощью ВТ-11 в качестве противовоспалительной *S. difficile* терапии. Данные указывают на то, что пероральное лечение ВТ-11 обеспечивает полную защиту от летальности, снижает активность заболевания и уменьшает воспаление у мышей с CDI.

Первоочередным среди иммунологических составляющих патогенеза заболевания при CDI является дисбаланс между воспалительными, повреждающими ткани Th17 лимфоцитами и регуляторными Трег лимфоцитами. Важно отметить, что мы продемонстрировали в данном документе то, что ВТ-11 влияет на иммунометаболические пути в CD4+ Т-лимфоцитах, способствуя дифференцировке и стабильности регуляторных типов клеток. Эти иммунометаболические пути повышения стабильности экспрессии FOXP3 являются критически важными для обеспечения терапевтических активностей во время CDI. Из-за сильнодействующих токсинов бактериального происхождения, слизистая оболочка желудочно-кишечного тракта становится все более воспалительной средой. Этот сдвиг в среде приводит к тому, что клетки, вовлеченные в гомеостаз и толерантность к микробиому, теряют эти способности, что усугубляет аномалии в комменсальном микробиоме. Посредством ВТ-11 и иммунометаболических механизмов, обработка ВТ-11 способствует развитию регуляторных клеток, которые сохраняют подавляющую функцию при наличии воспалительных патологий и предотвращают заболевание. При ускоренном возобновлении комменсальной флоры после антибиотиков, сам микробиом способен превзойти и подавить рост *S. difficile*.

Мы предсказываем, что введение животному подготовленных клеток согласно данному изобретению будет имитировать эффекты прямого введения ВТ-11, показанные в этом примере.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Johnson, S. and D.N. Gerding, Clostridium difficile--associated diarrhea. Clin Infect Dis, 1998. 26(5): p. 1027-34; quiz 1035-6.
2. Butterworth, S.A., et al., Recent trends in diagnosis and treatment of Clostridium difficile in a tertiary care facility. Am J Surg, 1998. 175(5): p. 403-7.
3. Bartlett, J.G., Management of Clostridium difficile infection and other antibiotic-associated diarrhoeas. Eur J Gastroenterol Hepatol, 1996. 8(11): p. 1054-61.
4. Pothoulakis, C. and J.T. LaMont, Clostridium difficile colitis and diarrhea. Gastroenterol Clin North Am, 1993. 22(3): p. 623-37.
5. Fekety, R. and A.B. Shah, Diagnosis and treatment of Clostridium difficile colitis. JAMA, 1993. 269(1): p. 71-5.

6. Pepin, J., et al., Increasing risk of relapse after treatment of *Clostridium difficile* colitis in Quebec, Canada. *Clin Infect Dis*, 2005. 40(11): p. 1591-7.
7. Musher, D.M., et al., Relatively poor outcome after treatment of *Clostridium difficile* colitis with metronidazole. *Clin Infect Dis*, 2005. 40(11): p. 1586-90.
8. Lu, P., et al., Lanthionine synthetase component C-like protein 2: a new drug target for inflammatory diseases and diabetes. *Curr Drug Targets*, 2014. 15(6): p. 565-72.
9. Leber, A., et al., Modeling new immunoregulatory therapeutics as antimicrobial alternatives for treating *Clostridium difficile* infection. *Artif Intell Med*, 2017. 78: p. 1-13.
10. Buffie, C.G., et al., Precision microbiome reconstitution restores bile acid mediated resistance to *Clostridium difficile*. *Nature*, 2014. 517(7533): p. 205-208.
11. Leber, A., et al., Systems Modeling of Interactions between Mucosal Immunity and the Gut Microbiome during *Clostridium difficile* Infection. *PLoS One*, 2015. 10(7): p. e0134849.
12. Bassaganya-Riera J, Reynolds K, Martino-Catt S, et al. Activation of PPAR gamma and delta by conjugated linoleic acid mediates protection from experimental inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2004;127:777-91.
13. Chen X, Katchar K, Goldsmith JD, Nanthakumar N, Cheknis A, Gerding DN, et al. (2008) A Mouse Model of *Clostridium difficile*-Associated Disease. *Gastroenterology* 135: 1984-1992.
14. Viladomiu M, Hontecillas R, Pedragosa M, Carbo A, Hoops S, Michalak P, et al. (2012) Modeling the role of peroxisome proliferator-activated receptor gamma and microRNA-146 in mucosal immune responses to *Clostridium difficile*. *PLoS One* 7: e47525.

ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ АКТИВНОСТИ ВТ-11 ПРИ ЛЕЧЕНИИ КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА

Колоректальный рак является третьим по распространенности раком в мире, поразившим более 9,4 миллиона человек в 2015 году. В развитии рака, метаболизм вносит вклад, как в собственное поведение опухолевых клеток, так и в взаимодействие между опухолевыми клетками и иммунной системой. Хорошо известной характеристикой опухолевых клеток является эффект Варбурга, а именно предпочтение анаэробному гликолизу даже в присутствии кислорода. Этот метаболизм от глюкозы к лактату имеет комплексную пользу для раковых клеток: обеспечивает быстрые источники энергии для роста и пролиферации клеток, подкисляет микроокружение и расходует метаболический субстрат, необходимый для цитотоксических иммунных клеток. Недавно выяснилось, что целенаправленное воздействие на этот процесс является эффективным средством контроля прогрессирования, роста и метастазирования опухоли. Раковые клетки способны вызывать анемию и апоптоз в иммунных клетках, предотвращая переключение на окислительное фосфорилирование, которое способствует уничтожению раковых клеток после распознавания. Это переключение в метаболическом профиле обеспечивает развитие Т-лимфоцитов памяти, которые могут усиливать противоопухолевые реакции клеток CD8⁺. Следовательно, целенаправленное воздействие на иммунометаболизм представляет собой лечение, которое ограничивает рост опухолевых клеток при

одновременном обеспечении иммуноопосредованного уничтожения раковых клеток.

BT-11 предлагает безопасный, нецитотоксичный вариант для лечения колоректального и других видов рака. В отличие от других способов лечения, которые прямо направлены на уничтожение раковых клеток, BT-11 способен вызывать мощные иммунометаболические эффекты, которые ограничивают пролиферацию клеток, стимулируя при этом реакции запоминания со стороны иммунной системы. Введение BT-11 в клетки снижает активность лактатдегидрогеназы и продуцирование лактата при одновременном усилении путей окислительного фосфорилирования. BT-11-опосредованное ингибирование метаболизма лактата дополнительно связано с уменьшением клеточной пролиферации, что ограничивает экспансию развития опухолевых клеток. Кроме того, эти метаболические эффекты предотвращают модуляцию микроокружения опухоли, уменьшая вероятность полностью выстроенных иммуноэнвазивных стратегий. Дополнительно, прямое влияние BT-11 на метаболизм иммунных клеток увеличивает окислительное фосфорилирование и позволяет переходить клеткам в состояние запоминания. Было продемонстрировано, что BT-11 индуцирует развитие CD4⁺ Т-лимфоцитов памяти. В комбинации с опухолевой и иммунной активностью клеток, BT-11 является жизнеспособной альтернативой химиотерапии при лечении колоректального и других видов рака. Мы предсказываем, что введение животному подготовленных клеток согласно данному изобретению будет имитировать эффекты BT-11, описанные в этом примере.

ПРОФИЛАКТИКА ФОРМИРОВАНИЯ БЛЯШЕК И АРТЕРИАЛЬНОГО ВОСПАЛЕНИЯ ПРИ АТЕРОСКЛЕРОЗЕ

Атеросклероз - это сердечно-сосудистое заболевание, характеризующееся уменьшением просвета артерий из-за фиброзных бляшек внутри артериальной стенки. Атеросклероз является основной причиной смерти в Соединенных Штатах в результате ожирения, высокого кровяного давления и неправильного питания и способствует возникновению сердечного приступа, инсульта и почечной недостаточности. Атеросклероз является основным иммунометаболическим заболеванием, вызванным активацией лейкоцитов из-за медиаторов воспаления, секретируемых эндотелиальными клетками, и высокой концентрацией липопротеинов низкой плотности. Со временем эта активация приводит к отложению тромбоцитов, холестерина и кристаллизованного кальция в стенке артерии. Постоянное воздействие модифицированных липопротеинов в условиях гиперлипидемии приводит к поляризации воспалительных макрофагов вследствие хронического накопления внутриклеточного стресса. Измененная стимуляция ключевых факторов транскрипции, таких как SREBP, LXR и PPAR, приводит к активации NF-κB, NLR и других воспалительных путей. Другим ключевым регулятором иммунометаболизма при сердечно-сосудистых заболеваниях является AMPK. Повышенная экспрессия медиаторов воспаления вторичными иммунными клетками снижает активность AMPK в иммунных клетках и снижает скорость окисления липидов. Снижение активности AMPK приводит к прямому нарушению полезных иммунных

реакций, таких как активация активности транскрипционного фактора CREB и противовоспалительного продуцирования ИЛ-10. Нарушение сигналинга также прямо способствует формированию бляшек, путем уменьшения использования жирных кислот для производства энергии и дерегулирования клеточного баланса кальция.

LANCL2 является восходящим сигнальным элементом, связанным с активностью AMPK и CREB, а также продуцированием ИЛ-10 и регуляцией сигналинга кальция. Обнаружена связь между его естественного происхождения лигандом, абсцисовой кислотой, и модуляцией активности PPAR и противовоспалительными реакциями во время богатого жирами кормления. При введении в мононуклеарные клетки периферической крови человека, ВТ-11 способен снижать экспрессию провоспалительных цитокинов, ассоциированных с атеросклерозом, ИФН γ и ФНО α , а также увеличивать продуцирование ИЛ-10. Переплетаясь с этими эффектами, ВТ-11 увеличивает окислительную способность иммунных клеток, что свидетельствует о способности поддерживать метаболический гомеостаз в условиях избытка калорий. Воздействуя как на иммунные, так и на метаболические пути, пораженные атеросклерозом, ВТ-11 лечит патологию и заболевание при атеросклерозе и предотвращает дальнейшее привлечение и отложение клеток, клеточных фрагментов и метаболитов в стенках артерий. Мы предсказываем, что введение животному подготовленных клеток согласно данному изобретению будет имитировать эффекты ВТ-11, описанные в этом примере.

МОДУЛЯЦИЯ МЕТАБОЛИЗМА ГЛИКОГЕНА ПРИ БОЛЕЗНИ АНДЕРСЕНА

Болезнь Андерсена - это врожденный дефект метаболизма, связанный с дефектами в накоплении гликогена. Это вызвано изъянами и мутациями в гене GBE1, который кодирует фермент, ответственный за разветвление гликогена. Неразветвленный гликоген имеет более низкую растворимость, что приводит к отложению и накоплению в сердце и печени. Дополнительные данные указывают на то, что иммунные клетки начинают реагировать на этот атипичный гликоген. Антитела, активные в отношении полиглюкозана, были выделены из ткани сердца и печени пациентов с болезнью Андерсена и болезнью Лафора. Поглощение иммунными клетками полиглюкозанов и реакция на них может усугубить повреждение сердца и ткани печени, ускоряя ухудшение здоровья пациента. Это также подтверждается повышением уровня хитотриозидазы у пациентов с болезнью Андерсена. Хитотриозидаза является ферментом и маркером воспаления, продуцируемым макрофагами во время защитных реакций и хронического заболевания печени.

ВТ-11 и другие родственные лиганды LANCL2 связаны с эффективным и контролируемым окислением глюкозы, тогда как активация LANCL2 связана с гомеостазом глюкозы. Активация LANCL2 с помощью ВТ-11 или других лигандов снижает накопление гликогена у пациентов с болезнью Андерсена. Также в преимущества ВТ-11 или других родственных лигандов входит модуляция защитного ответа. Продуцирование антител и хитотриозидазы позволяет предположить, что иммунная

система распознает разветвленный гликоген как чужеродный, что приводит к усилению воспаления. ВТ-11 и другие родственные лиганды способны индуцировать толерантность к типичным антигенам. При поддержании иммунной толерантности, не разветвленный гликоген может секретироваться и выводиться из организма. Мы предсказываем, что введение животному подготовленных клеток согласно данному изобретению будет имитировать эффекты ВТ-11, описанные в этом примере.

ВОССТАНОВЛЕНИЕ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ И ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ НАРУШЕНИЙ ПРИ ФИБРОМИАЛГИИ

Фибромиалгия - это нарушение, которое вызывает обширную боль во всем теле. Болезнь поражает более 3 миллионов человек в Соединенных Штатах и не лечится. Современные способы лечения включают в себя ингибиторы поглощения серотонина, обезболивающие и нестероидные противовоспалительные препараты, которые направлены на уменьшение хронической боли, усталости и изменений настроения, вызванных заболеванием. Недавно у пациентов с фибромиалгией были выявлены повышенные уровни воспалительных маркеров, таких как нейтрофил-привлекающий хемокин, ИЛ-8 и маркер выраженного воспаления - С-реактивный белок. В частности, глиальные клетки пациентов с фибромиалгией формируют измененные профили хемокинов и цитокинов, что указывает на участие иммунной системы в симптомах и патогенезе заболевания. Кроме того, метаболизм иммунных клеток у пациентов с фибромиалгией смещен по сравнению со здоровыми контролями. Мононуклеарные клетки при фибромиалгии имели снижение митохондриального мембранного потенциала и коэнзима Q10 в комбинации с повышенным образованием супероксида и перекисным окислением липидов. Эти изменения являются типичными для сильно воспалительных иммунных клеток и общего окислительного стресса. Кроме того, тяжесть боли и других симптомов обратно коррелировала у пациентов с фибромиалгией с субпопуляциями моноцитов, связанными с регуляторными ответами.

ВТ-11 и другие родственные соединения, которые нацелены на LANCL2 или другие иммунометаболические пути, уменьшают окислительный стресс, вызванный определенными метаболическими путями в иммунных клетках. Это снижение окислительного стресса и продуцирование супероксида может снизить гиперактивацию нервных клеток и стимуляцию глиальных клеток для образования воспалительных хемокинов. Также, активация LANCL2 может влиять на поляризацию моноцитов и других мононуклеарных клеток в сторону регуляторных субпопуляций. Эти субпопуляции клеток связаны с противовоспалительными реакциями, тканевым гомеостазом и заживлением ран. Комбинированные воздействия на метаболические профили иммунных клеток и поляризацию регуляторных субпопуляций моноцитов, делают ВТ-11 новым и идеальным кандидатом для лечения фибромиалгии и других хронических болевых нарушений. Мы предсказываем, что введение животному подготовленных клеток согласно данному изобретению будет имитировать эффекты ВТ-11, описанные в этом примере.

EX VIVO ОБРАБОТКА CD4+ Т-ЛИМФОЦИТОВ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ

ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ЗАБОЛЕВАНИЯ

BT-11 посредством иммунометаболического сигналинга изменяет фенотипический профиль клеток *in vitro* и иммунные ответы *in vivo*. В частности, BT-11 вынуждает CD4⁺ Т-лимфоциты увеличивать экспрессию FOXP3, увеличивать подавляющую способность и увеличивать стабильность этих регуляторных клеток в условиях воспаления. Следовательно, адоптивный перенос клеток, обработанных *ex vivo* BT-11, полезен в лечении воспалительных заболеваний и нарушений с некорректными реакциями CD4⁺ Т-лимфоцитов, таких как воспалительное заболевание кишечника, болезнь отторжение трансплантированного органа и других, описанных в данном документе.

Способы

Наивные CD4⁺ Т-лимфоциты выделяли из селезенки мышей с помощью магнитной сортировки. Выделенные клетки инкубировали в 96-луночных плашках покрытых анти-CD3/анти-CD28, в среде для дифференцировки Трег. Средой для дифференциации Трег была среда Дульбекко в модификации Искова (IMDM) (ThermoFisher Scientific), дополненная фетальной бычьей сывороткой, NERES, пенициллином/стрептомицином, L-глутамином и дифференцирующими агентами. Трег дифференцирующие агенты представляли собой 10 нМ полностью-трансретиноевой кислоты и 5 нг/мл ТФР-β. Были проведены дополнительные эксперименты по сравнению дифференцировки в среде дифференцировки Трег с или без добавления 10 нг/мл ИЛ-2 или ИЛ-12. Клетки инкубировали с носителем, 10 нМ или 100 нМ BT-11 в среде для дифференцировки в течение 48 часов до анализа. Перед анализом клетки стимулировали ФМА и иономицином в течение 6 часов.

В экспериментах по переносу, селезенки доноров измельчали и обогащали фракцией CD4⁺ путем магнитной сортировки. Клетки CD4⁺CD45RB^{hi}CD25⁻ (Тэфф) и CD4⁺CD45RB^{lo}CD25⁺ (Трег_g) сортировали с помощью сортировщика клеток FACSAria. Выделенные Трег культивировали в течение 12 часов в присутствии носителя или BT-11 (100 нМ). Выделенные Тэфф культивировали в течение 12 ч в носителе. Основываясь на указанной экспериментальной группе, мыши-реципиенты Rag2^{-/-} получали 4x10⁵ клеток Тэфф и 1x10⁵ Трег от групп, обработанных носителем или BT-11, путем внутрибрюшинной инъекции. Мышей взвешивали и оценивали еженедельно до эвтаназии которую проводили через 5 недель после переноса.

Лимфоциты собственной пластинки толстой кишки и культивируемые клетки высевали в 96-луночные плашки (6x10⁵ клеток/луночка) и обрабатывали для иммунофенотипирования с помощью проточной цитометрии, как описано ранее. Вкратце, клетки инкубировали с конъюгированными с флуорохромом антителами к внеклеточным маркерам: CD45, CD4, CD3, CD25, CD8. Образцы, нуждающиеся во вторичном окрашивании, инкубировали с вторичными антителами или флуорохромом, конъюгированным с стрептавидином. Затем образцы были зафиксированы и пермеабелизованы. Клетки инкубировали с антителами к внутриклеточным маркерам: Tbet, ИФН_γ, ИЛ10, FOXP3, ИЛ17, ROR_γT. Данные были получены с помощью проточного

цитометра BD FACS Celesta и проанализированы с использованием программного обеспечения FACS Diva (BD Pharmingen).

Результаты

Учитывая важность CD25⁺ FOXP3⁺ регуляторных CD4⁺ Т-лимфоцитов для эффективности ВТ-11, мы стремились определить прямое влияние ВТ-11 на их дифференцировку и способность сохранять фенотип при воспалительных патологиях. Наивные CD4⁺ Т-лимфоциты дифференцировали в Трег *in vitro* в присутствии или в отсутствие ИЛ-2 в соответствии с способами, описанными выше. Обработка ВТ-11 (100 нМ) значительно увеличивала формирование подтипа CD25⁺ FOXP3⁺ в отсутствие ИЛ-2, отличие дополнительно усиливалось при добавлении ИЛ-2 (Фиг. 11А, панель А). При концентрациях, таких низких как 10 нМ, ВТ-11 индуцировал значительно большее количество CD25⁺ FOXP3⁺ клеток в присутствии ИЛ-2. В этих условиях дифференцировки наблюдались только низкие уровни смешанного CD25⁺ Tbet⁺ подтипа, и это не изменялось статистически ВТ-11 (Фиг. 11В, панель В). Следует отметить, что незначительное численное увеличение наблюдалось в контролях, обработанных носителем, с добавлением ИЛ-2, которое отсутствовало в присутствии ВТ-11. В то же время ВТ-11 сохранил значительно более высокие уровни клеток CD25⁺ FOXP3⁺ в образцах, обработанных ИЛ-12 (Фиг. 11А, панель С). Это контрастирует с подавлением клеток CD25⁺ FOXP3⁺ в образцах, обработанных ИЛ-12, в отсутствие ВТ-11 (Фиг. 11А, панель С). Добавление ИЛ-12 также вызывало увеличение количества клеток CD25⁺ Tbet⁺ во всех группах, хотя ВТ-11 обеспечивал дозозависимую защиту от этой смешанной субпопуляции (Фиг. 11В, панель D).

Чтобы идентифицировать сигнальные пути, модулированные ВТ-11 *in vivo*, мы выделили CD4⁺ Т-лимфоциты толстой кишки из мышей *Mdr1a*^{-/-}, обработанных носителем и ВТ-11, при проявлении колита в возрасте 10 недель. В CD4⁺ Т-лимфоцитах пероральная обработка ВТ-11 приводила к значительно более высокой экспрессии *Stat5a* (Фиг. 12А, панель А) и *Foxo1* (Фиг. 12А, панель С), двух членов сигнального пути ИЛ-2. Между тем, экспрессия *Pten* (Фиг. 12А, панель В) и *Phlpp1* (Фиг. 12А, панель D) была немного, но незначительно, увеличена. *In vitro* STAT5a фосфорилируется в большем соотношении в образцах, обработанных ВТ-11, в основной среде дифференцировки Трег, а также в среде дифференцировки Трег, дополненной либо ИЛ-2, либо ИЛ-12 (Фиг. 12В, панель Е). На FOXO1 одинаково влияют как базовая среда дифференцировки Трег, так и среда дифференцировки Трег, содержащая ИЛ-2, но не среда дифференцировки Трег, содержащая ИЛ-12 (Фиг. 12В, панель F). Клетки также дифференцировали в присутствии ингибиторов PTEN (SF1670) или STAT5 (STAT5i). В среде дифференцировки Трег, содержащей как ИЛ-2 (Фиг. 12С, панели G, H), так и ИЛ-12 (Фиг. 12D, панели I, J), добавление STAT5i предотвращало эффекты ВТ-11 на клетки CD25⁺ FOXP3⁺ и CD25⁺ Tbet⁺. Напротив, SF1670 только предотвращал эффекты ВТ-11 на клетки CD25⁺ Tbet⁺ в среде, содержащей ИЛ-2 (Фиг. 12С, панель H).

У мышей *Rag2*^{-/-} отсутствуют зрелые Т и В лимфоциты. Следовательно, эти мыши

не способны развить механизмы ауто толерантности, микробного гомеостаза и общей иммунорегуляции. Перенос наивных CD4⁺ Т-лимфоцитов в мышью Rag2^{-/-} вызывает воспаление кишечника, вызванное отсутствием этих механизмов, путем экспансии *in vivo* перенесенных клеток и дифференцировки в воспалительные фенотипы способом, подобным тем, которые наблюдаются при активных воспалительных аутоиммунных заболеваниях, включающих, но не ограничивающихся воспалительным заболеванием кишечника. Мы предположили, что перенос регуляторных клеток, обработанных *ex vivo* ВТ-11, обеспечит механизмы гомеостаза и иммунорегуляции у животных-реципиентов, что, как мы обнаружили, имеет место быть.

Адоптивный перенос Трег, обработанных *ex vivo* ВТ-11 (100 нМ), уменьшал общую тяжесть заболевания и обеспечивал поддержание полезных иммунных эффектов вплоть до испытанного предельного срока 5 недель после переноса (Фиг. 13). В дополнение к общему улучшению заболевания, *ex vivo* обработка Трег с помощью ВТ-11, приводила к измененным фенотипам клеток собственной пластинки толстой кишки. В Трег-группах, обработанных ВТ-11, уровень продуцирующих ИФН γ и ИЛ-17⁺ ROR γ T⁺ CD4⁺ Т-лимфоцитов был понижен. Между тем, уровень CD25⁺ Трег был повышен, что указывает на повышенную стабильность и увеличенную способность быть основателем популяции регуляторных клеток. Дополнительно, взаимодействие с сигнальной осью ИЛ-2/STAT5 способствует важным изменениям в микроокружении цитокинов и хемокинов, что усиливает эффекты переносимых клеток.

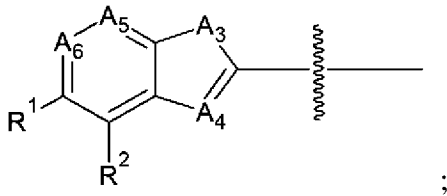
Эти результаты показывают, что эффекты ВТ-11 на иммунные клетки при введении *in vivo* могут быть воспроизведены при обработке иммунных клеток *ex vivo*. Мы предсказываем, что введение животному подготовленных клеток согласно данному изобретению, будет эффективным в лечении любой из патологий, описанных в данном документе, помимо воспалительных заболеваний, таких как ВЗК.

ИЛЛЮСТРАТИВНЫЕ ВАРИАНТЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ АСПЕКТОВ ДАННОГО ИЗОБРЕТЕНИЯ

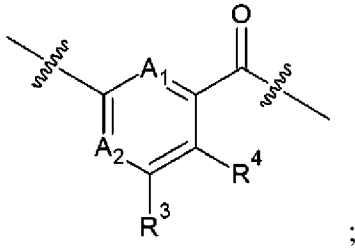
1. Способ лечения патологии у животного с помощью соединения или подготовленной клетки, полученной путем приведения в контакт клетки-предшественника с соединением, включающий в себя введение животному эффективного количества соединения или подготовленной клетки, причем патология включает в себя по меньшей мере одно из: инфекционное заболевание, гиперпролиферативное нарушение, врожденный дефект метаболизма, хроническое иммунометаболическое заболевание, аутоиммунное заболевание, отторжение трансплантированного органа, воспалительное нарушение и хроническую боль, и при этом соединение содержит:

соединение формулы Z-Y-Q-Y'-Z', или его фармацевтически приемлемую соль или сложный эфир, где:

Z представляет собой:

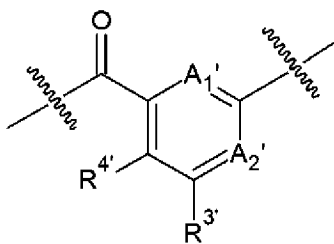


Y представляет собой:



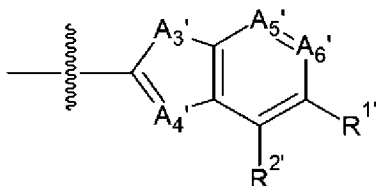
Q представляет собой пиперазин-1,4-диил; 2,5-диазабицикло[2.2.1]гептан-2,5-диил; 2,5-диазабицикло[2.2.2]октан-2,5-диил; 1,4-дiazепан-1,4-диил; бензол-1,4-диамин-N¹,N⁴-диил; этан-1,2-диамин-N¹,N²-диил; N¹,N²-диалкилэтан-1,2-диамин-N¹,N²-диил; пропан-1,3-диамин-N¹,N³-диил; N¹,N³-диалкилпропан-1,3-диамин-N¹,N³-диил; 1,4-диаминоантрацен-9,10-дион-1,4-диил; C₆ арен-1,4-диамин-N¹,N⁴-диил, где арен замещен от одного до четырех заместителями в 2, 3, 5 или 6 позициях, и где заместители независимо выбраны из группы, состоящей из -C(O)O(от C₁ до C₆)алкила, OH, O(от C₁ до C₆)алкила, (от C₁ до C₆)алкила, CF₃, F, Cl, и Br; или замещенный пиперазин-1,4-диил, где пиперазин замещен от одного до восьми заместителями в 2, 3, 5 или 6 позициях и где заместители независимо выбраны из группы, состоящей из (от C₁ до C₆)алкила, арила, арил(от C₁ до C₆)алкила, C(O)OH, и C(O)O(от C₁ до C₆)алкила;

Y' представляет собой:



или одинарную связь; и

Z' представляет собой:



или R⁵;

где:

Y' представляет собой одинарную связь, только когда Z' представляет собой R⁵;

A₁ и A_{1'}, если присутствуют, каждый независимо представляет собой N, N(от C₁ до C₆)алкил, O, S, или CR⁶;

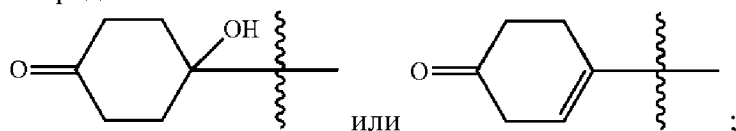
A_2 и A_2' , если присутствуют, каждый независимо представляет собой N или CR^7 ;
 A_3 и A_3' , если присутствуют, каждый независимо представляет собой NR^8 , O, или S;
 A_4 и A_4' , если присутствуют, каждый независимо представляет собой N или CR^9 ;
 A_5 и A_5' , если присутствуют, каждый независимо представляет собой N или CR^{10} ;
 A_6 и A_6' , если присутствуют, каждый независимо представляет собой N или CR^{11} ;
 $R^1, R^{1'}, R^2, R^{2'}, R^3, R^{3'}, R^4, R^{4'}, R^5, R^6, R^7, R^8, R^9, R^{10}$ и R^{11} , если присутствуют, в каждом случае независимо выбраны из группы, состоящей из водорода; алкила; галогена; трифторметила; диалкиламина, где каждый алкил выбран независимо; $-NH_2$; алкиламина; арилалкила; гетероарилалкила; гетероциклоалкила; замещенного гетероциклоалкила, замещенного 1-2 заместителями, независимо выбранными из группы, состоящей из $-C(O)OH$, $-C(O)O$ (от C_1 до C_6)алкила, (от C_1 до C_6)алкила, $-CF_3$, F, Cl, и Br; и замещенного гетероарилалкила;

где замещенный гетероарилалкил замещен 1-3 заместителями, независимо выбранными из группы, состоящей из $-NH_2$; $-NH$ (от C_1 до C_6)алкила; $-N$ ((от C_1 до C_6)алкила) $_2$, где каждый алкил выбран независимо; алкила; галогена; арила; замещенного арила, замещенного 1-3 заместителями, независимо выбранными из группы, состоящей из $-SO_2R^{12}$, $-OR^{13}$, -галогена, $-CN$, $-CF_3$, аминоалкила-, $-S(O)R^{14}$, и алкила; гетероциклоалкила; гетероарила; замещенного арила, замещенного 1-3 заместителями, независимо выбранными из группы, состоящей из алкила, $-CF_3$, F, Cl, и Br; алкиламина-; гетероциклоалкил-алкил-амин-; алкиламиноалкиламина-; $-NHC(O)OR^{15}$; $-NHC(O)NR^{16}R^{17}$; $-C(O)NR^{16}R^{17}$; и замещенного гетероарила, замещенного 1-3 заместителями, выбранными из группы, состоящей из алкила, галогена, CN, NH_2 , $-NH(C_1-C_6$ алкила), $-N(C_1-C_6$ алкила) $_2$, где каждый алкил выбран независимо, $-CF_3$, и замещенного арила, замещенного 1-3 заместителями, независимо выбранными из группы, состоящей из $-S(O)_2R^{15}$ и $-CN$;

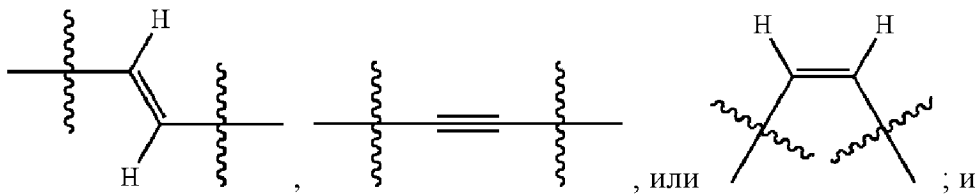
где $R^{12}, R^{13}, R^{14}, R^{15}, R^{16}$, и R^{17} каждый независимо выбран из группы, состоящей из C_1-C_6 алкила, диалкиламина, содержащего независимо выбранный C_1-C_6 алкил, $-NH_2$, алкиламина, гетероциклоалкила, и замещенного гетероциклоалкила, замещенного от одного до двух заместителями, независимо выбранными из группы, состоящей из $-C(O)O(C_1-C_6$ алкила) и $-C_1-C_6$ алкила; или

соединение, содержащее формулу А-В-С, или его фармацевтически приемлемую соль или сложный эфир, где:

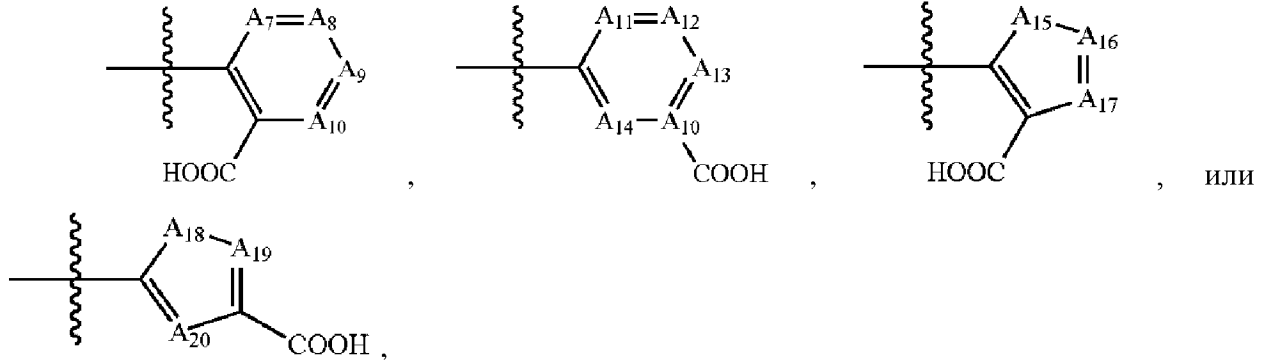
А представляет собой:



В представляет собой:



C представляет собой:



где:

$A_7, A_8, A_9, A_{10}, A_{11}, A_{12}, A_{13},$ и A_{14} каждый независимо выбран из $\text{CH}, \text{CR}^{18}$, и N ;

$A_{15}, A_{16}, A_{17}, A_{18}, A_{19},$ и A_{20} каждый независимо выбран из $\text{CH}, \text{CR}^{19}, \text{N}, \text{NR}^{20}, \text{O},$ и S , с условием, что только один из $A_{15}, A_{16},$ и A_{17} может представлять собой $\text{N}, \text{NR}^{20}, \text{O},$ или S , и только один из $A_{18}, A_{19},$ и A_{20} может представлять собой $\text{N}, \text{NR}^{20}, \text{O},$ или S ;

R^{18} и R^{19} каждый независимо выбран из $\text{C}_1\text{-C}_6$ алкила; $\text{C}_1\text{-C}_6$ диалкиламина, где каждый $\text{C}_1\text{-C}_6$ алкил выбран независимо; $-\text{NH}_2$; алкиламина; гетероциклоалкила; и замещенного гетероциклоалкила, где замещенный гетероциклоалкил замещен от одного до двух заместителями, независимо выбранными из группы, состоящей из: $-\text{C}(\text{O})\text{O}(\text{C}_1\text{-C}_6$ алкила) и $\text{C}_1\text{-C}_6$ алкила; при этом в соединениях с более чем одним CR^{18} каждый R^{18} выбран независимо, и в соединениях с более чем одним CR^{19} каждый R^{19} выбран независимо; и

R^{20} представляет собой $\text{C}_1\text{-C}_6$ алкил.

2. Способ по варианту осуществления 1, отличающийся тем, что инфекционное заболевание включает в себя бактериальное заболевание.

3. Способ по варианту осуществления 2, отличающийся тем, что бактериальное заболевание включает в себя инфекцию *C. difficile*.

4. Способ по варианту осуществления 1, отличающийся тем, что гиперпролиферативное нарушение включает в себя рак.

5. Способ по варианту осуществления 4, отличающийся тем, что рак включает в себя рак желудочно-кишечного тракта.

6. Способ по варианту осуществления 5, отличающийся тем, что рак желудочно-кишечного тракта включает в себя колоректальный рак.

7. Способ по варианту осуществления 1, отличающийся тем, что гиперпролиферативное нарушение включает в себя семейный аденоматозный полипоз.

8. Способ по варианту осуществления 1, отличающийся тем, что врожденный дефект метаболизма включает в себя болезнь накопления гликогена.

9. Способ по варианту осуществления 8, отличающийся тем, что болезнь накопления гликогена включает в себя болезнь Андерсена.

10. Способ по варианту осуществления 1, отличающийся тем, что хроническое иммунометаболическое заболевание включает в себя сердечно-сосудистое заболевание.

11. Способ по варианту осуществления 10, отличающийся тем, что сердечно-сосудистое заболевание включает в себя атеросклероз.

12. Способ по варианту осуществления 1, отличающийся тем, что хроническое иммунометаболическое заболевание включает в себя гипертонию.

13. Способ по варианту осуществления 1, отличающийся тем, что аутоиммунное заболевание включает в себя по меньшей мере одно из следующего: волчанку и рассеянный склероз.

14. Способ по варианту осуществления 1, отличающийся тем, что аутоиммунное заболевание включает в себя аутоиммунное заболевание, вызванное иммунотерапией рака.

15. Способ по варианту осуществления 14, отличающийся тем, что аутоиммунное заболевание, вызванное иммунотерапией рака, включает в себя ревматическое заболевание, вызванное иммунотерапией рака.

16. Способ по варианту осуществления 1, отличающийся тем, что воспалительное нарушение включает в себя острый дивертикулит толстой кишки.

17. Способ по варианту осуществления 1, отличающийся тем, что воспалительное нарушение включает в себя вызванное облучением воспаление желудочно-кишечного тракта.

18. Способ по варианту осуществления 17, отличающийся тем, что вызванное облучением воспаление желудочно-кишечного тракта включает в себя по меньшей мере одно из следующего: лучевой проктит, лучевой энтерит и лучевой проктосигмоидит.

19. Способ по варианту осуществления 1, отличающийся тем, что хроническая боль включает в себя фибромиалгию.

20. Способ по варианту осуществления 1, отличающийся тем, что патология включает в себя воспалительное заболевание кишечника.

21. Способ по варианту осуществления 1, отличающийся тем, что патология включает в себя болезнь Крона.

22. Способ по варианту осуществления 1, отличающийся тем, что патология включает в себя язвенный колит.

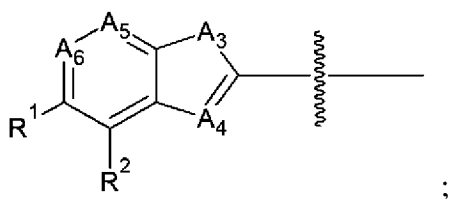
ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения *in vitro* подготовленных клеток из клеток-предшественников, включающий в себя *in vitro* приведение в контакт указанных клеток-предшественников с соединением в количестве и в течение времени, которые эффективны для индуцирования зависящего от соединения отличия в подготовленных клетках по отношению к клеткам-предшественникам, в котором:

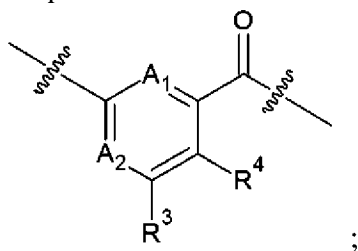
указанные клетки-предшественники включают в себя иммунные клетки; и

указанное соединение представляет собой соединение формулы Z-Y-Q-Y'-Z', или его фармацевтически приемлемую соль или сложный эфир, где:

Z представляет собой:

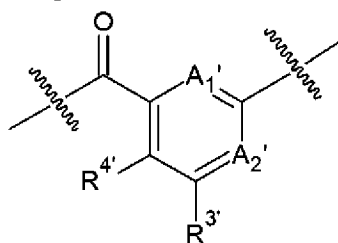


Y представляет собой:



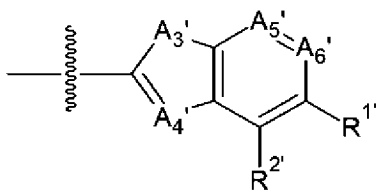
Q представляет собой пиперазин-1,4-диил; 2,5-диазабицикло[2.2.1]гептан-2,5-диил; 2,5-диазабицикло[2.2.2]октан-2,5-диил; 1,4-дiazепан-1,4-диил; бензол-1,4-диамин-N¹,N⁴-диил; этан-1,2-диамин-N¹,N²-диил; N¹,N²-диалкилэтан-1,2-диамин-N¹,N²-диил; пропан-1,3-диамин-N¹,N³-диил; N¹,N³-диалкилпропан-1,3-диамин-N¹,N³-диил; 1,4-диаминоантрацен-9,10-дион-1,4-диил; C₆ арен-1,4-диамин-N¹,N⁴-диил, где арен замещен от одного до четырех заместителями в 2, 3, 5 или 6 позициях, и где заместители независимо выбраны из группы, состоящей из -C(O)O(от C₁ до C₆)алкила, OH, O(от C₁ до C₆)алкила, (от C₁ до C₆)алкила, CF₃, F, Cl, и Br; или замещенный пиперазин-1,4-диил, где пиперазин замещен от одного до восьми заместителями в 2, 3, 5 или 6 позициях и где заместители независимо выбраны из группы, состоящей из (от C₁ до C₆)алкила, арила, арил(от C₁ до C₆)алкила, C(O)OH, и C(O)O(от C₁ до C₆)алкила;

Y' представляет собой:



или одинарную связь;

Z' представляет собой:



или R^5 ;

Y' представляет собой одинарную связь, только когда Z' представляет собой R^5 ;

A_1 и A_1' , если присутствуют, каждый независимо представляет собой N, N(от C_1 до C_6)алкил, O, S, или CR^6 ;

A_2 и A_2' , если присутствуют, каждый независимо представляет собой N или CR^7 ;

A_3 и A_3' , если присутствуют, каждый независимо представляет собой NR^8 , O, или S;

A_4 и A_4' , если присутствуют, каждый независимо представляет собой N или CR^9 ;

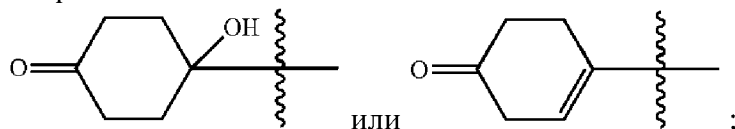
A_5 и A_5' , если присутствуют, каждый независимо представляет собой N или CR^{10} ;

A_6 и A_6' , если присутствуют, каждый независимо представляет собой N или CR^{11} ; и

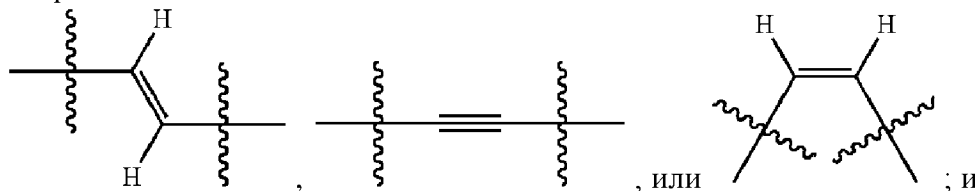
$R^1, R^1', R^2, R^2', R^3, R^3', R^4, R^4', R^5, R^6, R^7, R^8, R^9, R^{10}$ и R^{11} , если присутствуют, в каждом случае независимо выбраны из группы, состоящей из водорода; алкила; галогена; трифторметила; диалкиламина, где каждый алкил выбран независимо; $-NH_2$; алкиламина; арилалкила; гетероарилалкила; гетероциклоалкила; замещенного гетероциклоалкила, замещенного 1-2 заместителями, независимо выбранными из группы, состоящей из $-C(O)OH$, $-C(O)O$ (от C_1 до C_6)алкила, (от C_1 до C_6)алкила, $-CF_3$, F, Cl, и Br; и замещенного гетероарилалкила; или

соединение представляет собой соединение формулы A-B-C, или его фармацевтически приемлемую соль или сложный эфир, где:

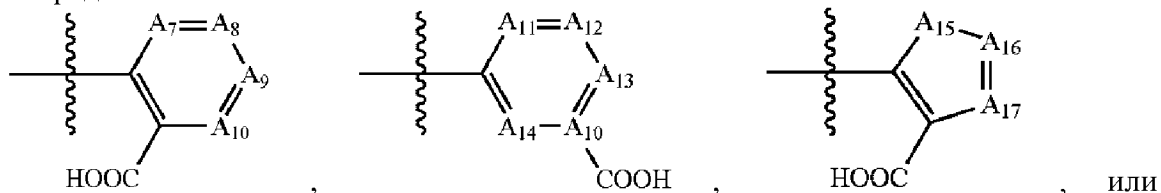
A представляет собой:

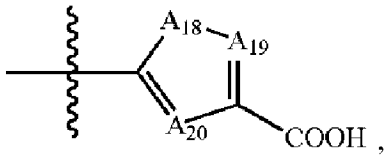


B представляет собой:



C представляет собой:





$A_7, A_8, A_9, A_{10}, A_{11}, A_{12}, A_{13},$ и A_{14} каждый независимо выбран из $\text{CH}, \text{CR}^{18},$ и N ;

$A_{15}, A_{16}, A_{17}, A_{18}, A_{19},$ и A_{20} каждый независимо выбран из $\text{CH}, \text{CR}^{19}, \text{N}, \text{NR}^{20}, \text{O},$ и S , с условием, что только один из $A_{15}, A_{16},$ и A_{17} может представлять собой $\text{N}, \text{NR}^{20}, \text{O},$ или S , и только один из $A_{18}, A_{19},$ и A_{20} может представлять собой $\text{N}, \text{NR}^{20}, \text{O},$ или S ;

R^{18} и R^{19} каждый независимо выбран из $\text{C}_1\text{-C}_6$ алкила; $\text{C}_1\text{-C}_6$ диалкиламина, где каждый $\text{C}_1\text{-C}_6$ алкил выбран независимо; $-\text{NH}_2$; алкиламина; гетероциклоалкила; и замещенного гетероциклоалкила, где замещенный гетероциклоалкил замещен от одного до двух заместителями, независимо выбранными из группы, состоящей из: $-\text{C}(\text{O})\text{O}(\text{C}_1\text{-C}_6$ алкила) и $\text{C}_1\text{-C}_6$ алкила; при этом в соединениях с более чем одним CR^{18} каждый R^{18} выбран независимо, и в соединениях с более чем одним CR^{19} каждый R^{19} выбран независимо; и

R^{20} представляет собой $\text{C}_1\text{-C}_6$ алкил.

2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанное соединение представляет собой соединение формулы $\text{Z-Y-Q-Y}'\text{-Z}'$, или его фармацевтически приемлемую соль или сложный эфир.

3. Способ по любому из пп. 1-2, отличающийся тем, что приведение в контакт включает в себя приведение в контакт клеток-предшественников с соединением и агентом, содержащим одно или большее количество из: полностью-трансретиноевой кислоты, ТФР- β , фобол-миристан-ацетата, иономицина, рапамицина и ИЛ-2.

4. Способ по любому из пп. 1-3, отличающийся тем, что указанное приведение в контакт включает в себя приведение в контакт клеток-предшественников с указанным соединением и ИЛ-2.

5. Способ по любому из пп. 1-4, отличающийся тем, что клетки-предшественники содержат лейкоциты.

6. Способ по любому из пп. 1-5, отличающийся тем, что указанные клетки-предшественники содержат клетки, выбранные из группы, состоящей из моноклеарных клеток периферической крови и моноклеарных клеток собственной пластинки.

7. Способ по любому из пп. 1-6, отличающийся тем, что указанные клетки-предшественники содержат Т-лимфоциты.

8. Способ по любому из пп. 1-7, отличающийся тем, что указанные клетки-предшественники содержат наивные CD4^+ Т-лимфоциты.

9. Способ по любому из пп. 1-8, отличающийся тем, что указанные подготовленные клетки содержат Трег лимфоциты.

10. Способ по любому из пп. 1-9, отличающийся тем, что указанную подготовленную клетку дифференцируют из указанной клетки-предшественника.

11. Способ по любому из пп. 1-10, отличающийся тем, что указанное зависимое от

соединения отличие включает в себя отличие в экспрессии генов в подготовленных клетках по отношению к клеткам-предшественникам.

12. Способ по любому из пп. 1-11, отличающийся тем, что указанное зависимое от соединения отличие включает в себя по меньшей мере одно из: увеличение экспрессии ИЛ-10 или его ортолога, увеличение экспрессии FOXP3 или его ортолога, уменьшение экспрессии ФНО α или его ортолога, уменьшение экспрессии ИФН γ или его ортолога, уменьшение экспрессии Tbet или его ортолога, увеличения экспрессии Lag3 или его ортолога, увеличение экспрессии Socs2 или его ортолога, увеличение экспрессии Irf7 или его ортолога, увеличения экспрессии P2rx7 или его ортолога, увеличение экспрессии Carn3 или его ортолога, увеличение экспрессии Ikzf2 или его ортолога, увеличение экспрессии Stat5a или его ортолога, увеличение экспрессии Pten или его ортолога, увеличение экспрессии Foxo1 или его ортолога, увеличение экспрессии Phlpp1 или его ортолога, увеличение фосфорилирования STAT5a или его ортолога, увеличение фосфорилирования FOXO1 или его ортолога, и увеличение активности пируват киназы.

13. Выделенные клетки, содержащие подготовленные клетки по любому из пп. 1-12.

14. Способ лечения патологии у животного с помощью выделенных клеток по п. 13, включающий в себя введение клеток животному в количестве, достаточном для лечения патологии, причем патология включает в себя воспалительное нарушение, инфекционное заболевание, гиперпролиферативное нарушение, врожденный дефект метаболизма, хроническое иммунометаболическое заболевание, аутоиммунное заболевание, отторжение трансплантированного органа и хроническую боль.

15. Способ по п. 14, отличающийся тем, что указанная патология содержит воспалительное заболевание кишечника.

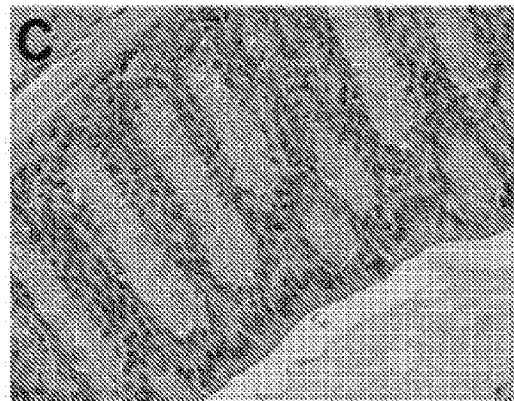
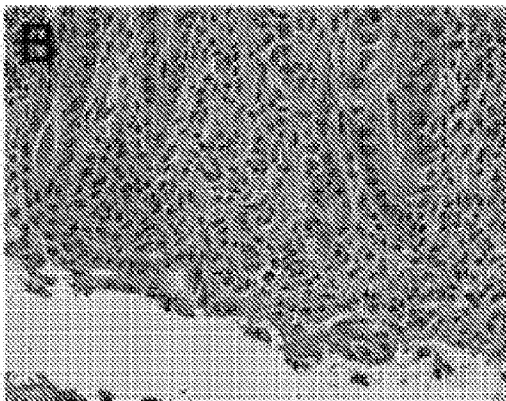
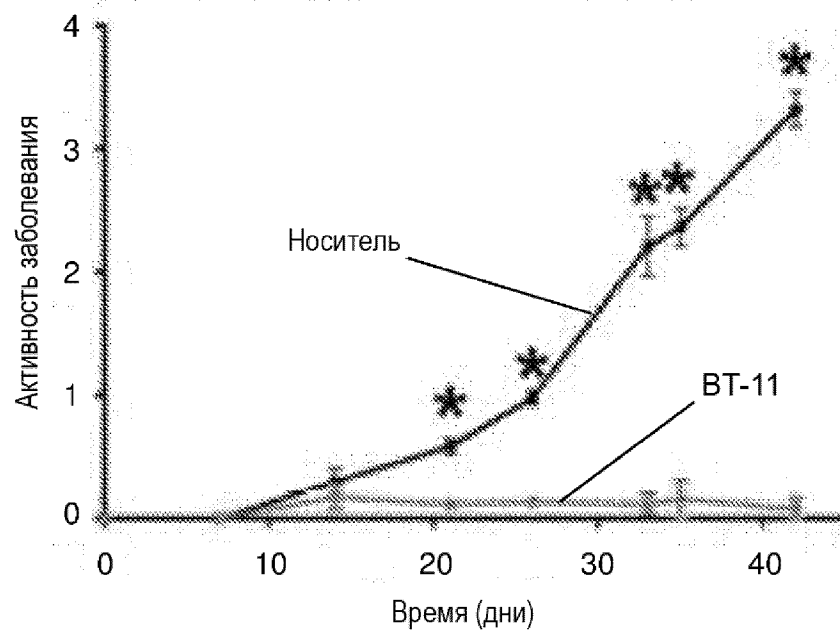
16. Способ по любому из пп. 14-15, отличающийся тем, что указанное введение включает в себя парентеральное введение клеток животному.

17. Способ по п. 16, отличающийся тем, что указанное парентеральное введение включает в себя инъекцирование или вливание клеток в кровотоки животного.

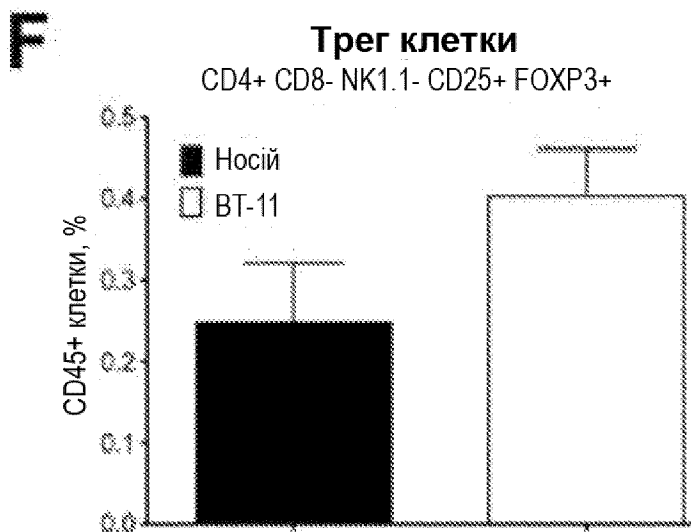
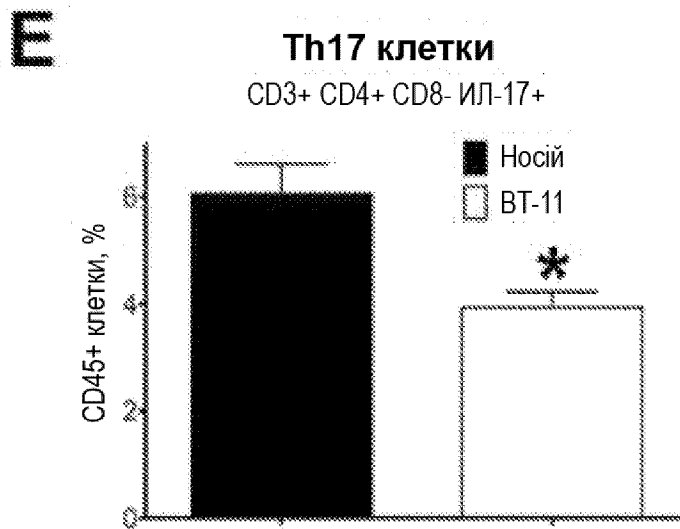
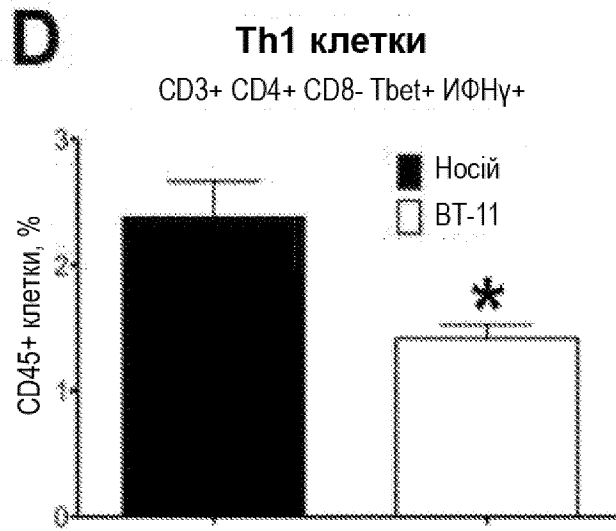
18. Способ по любому из пп. 14-17, отличающийся тем, что указанное введение включает в себя энтеральное введение клеток животному.

19. Способ по любому из пп. 14-18, отличающийся тем, что указанные клетки содержат подготовленные клетки, произведенные из аутологичных клеток-предшественников, полученных из животного.

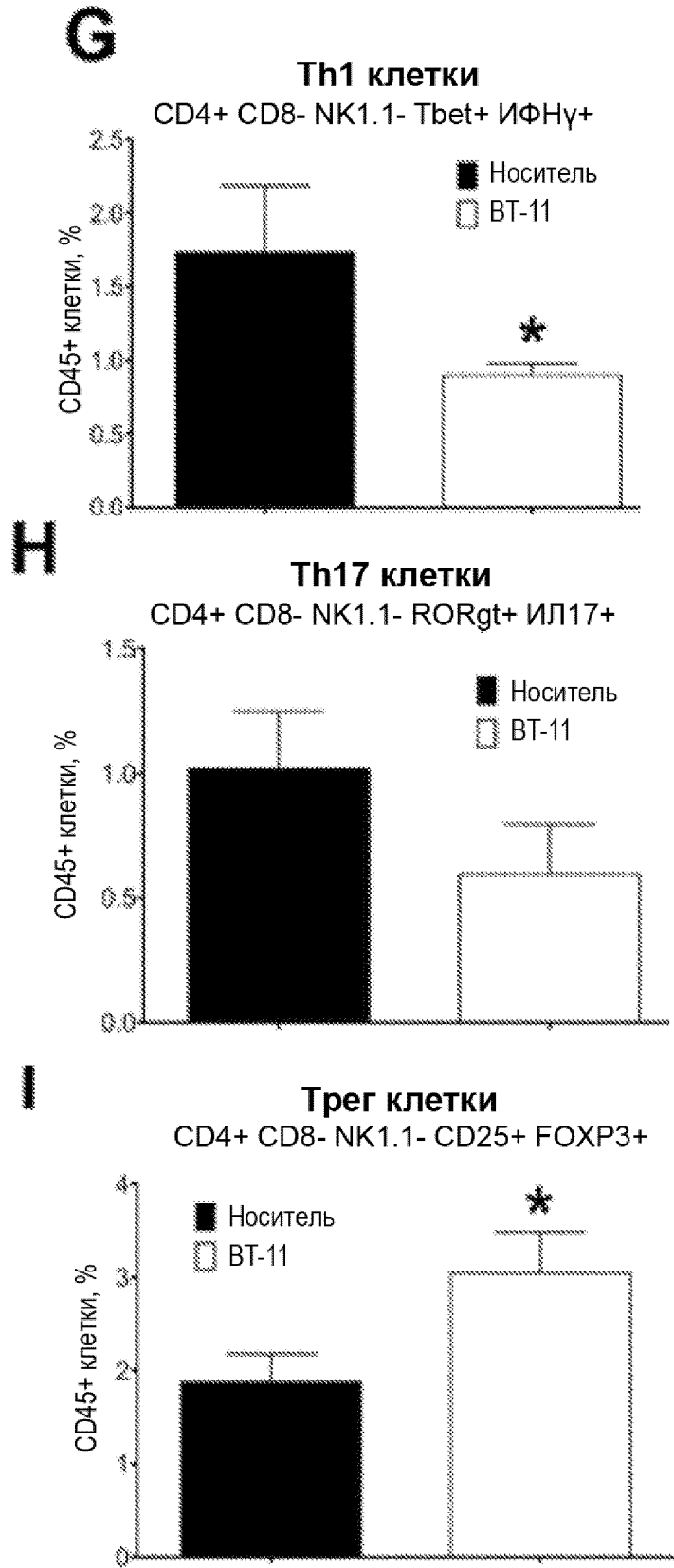
По доверенности

А Индекс активности заболевания

Фиг. 1А

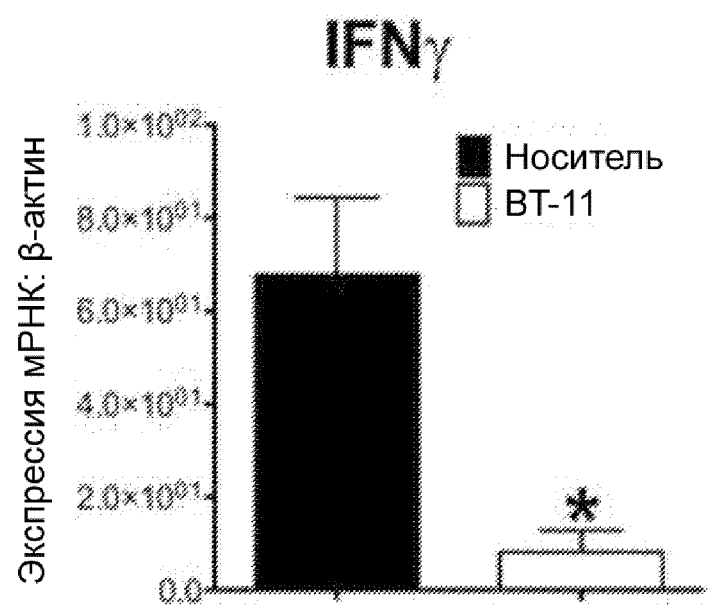


Фиг. 1В

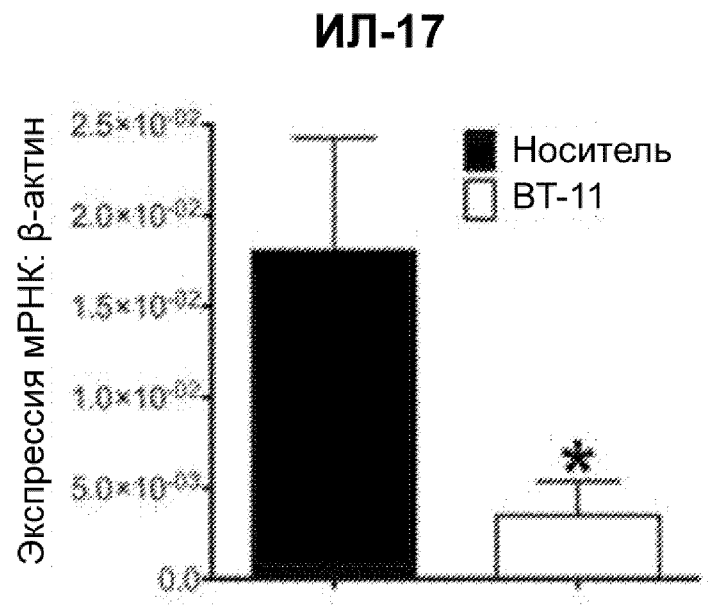


Фиг. 1С

У

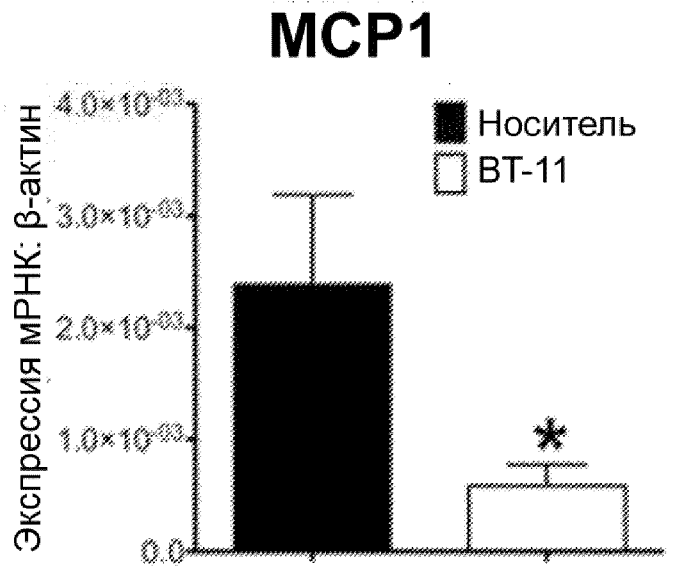


К

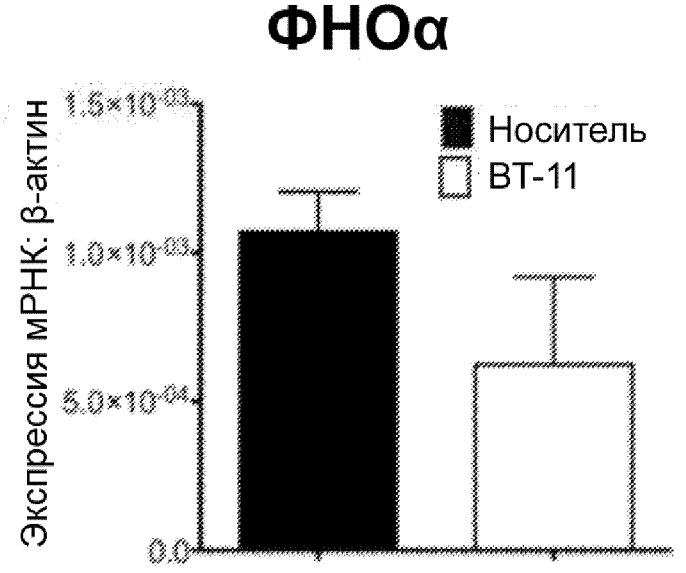


Фиг. 1D

L

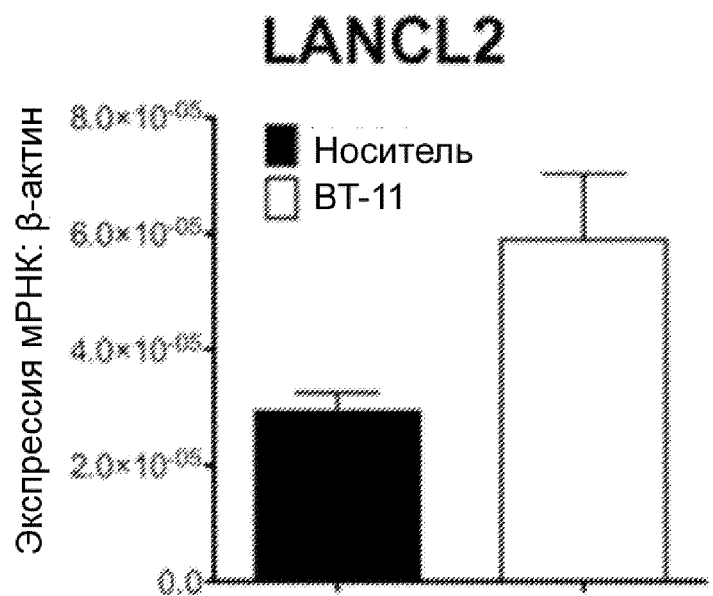


M

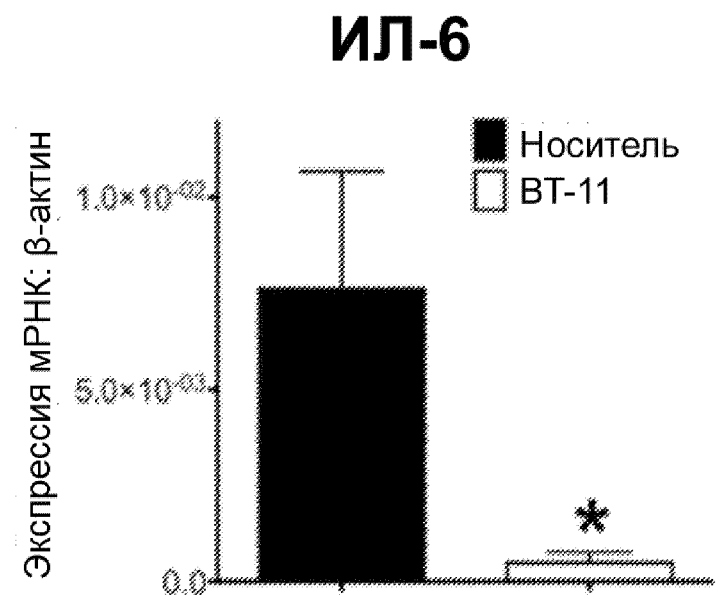


Фиг. 1E

N



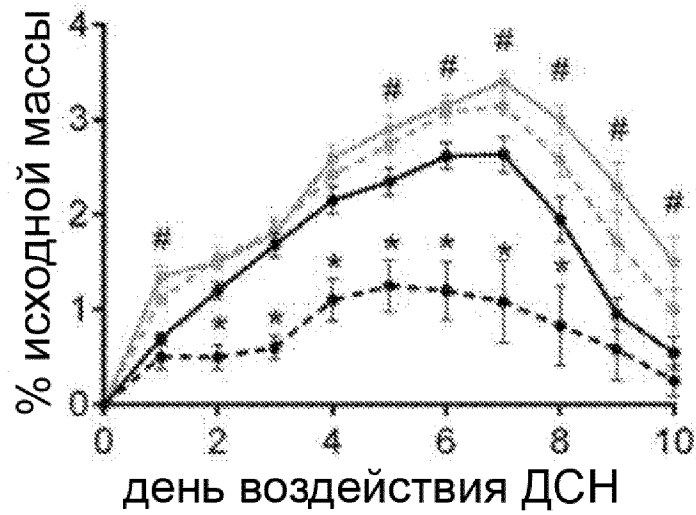
O



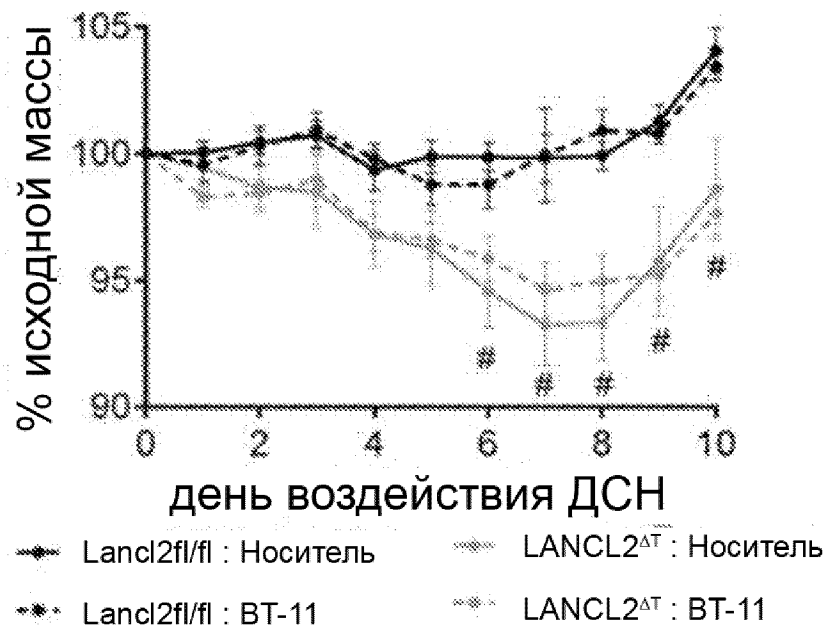
6/35

Фиг. 1F

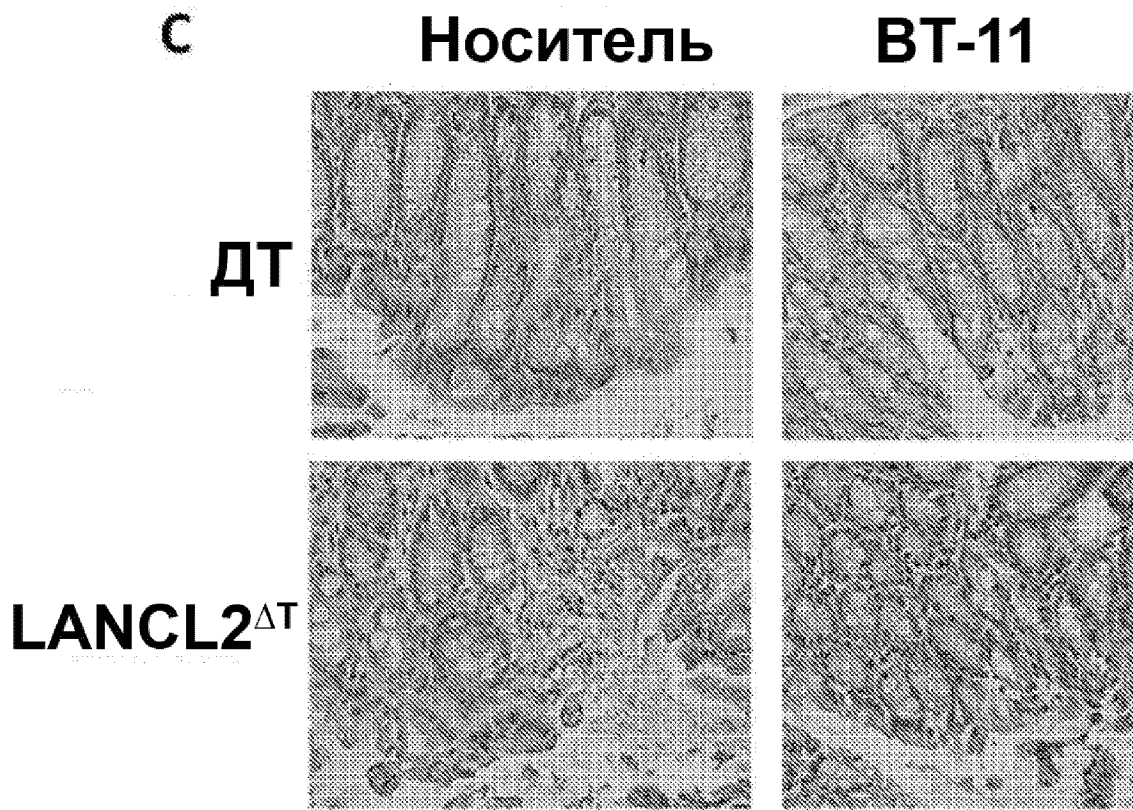
A Индекс активности заболевания



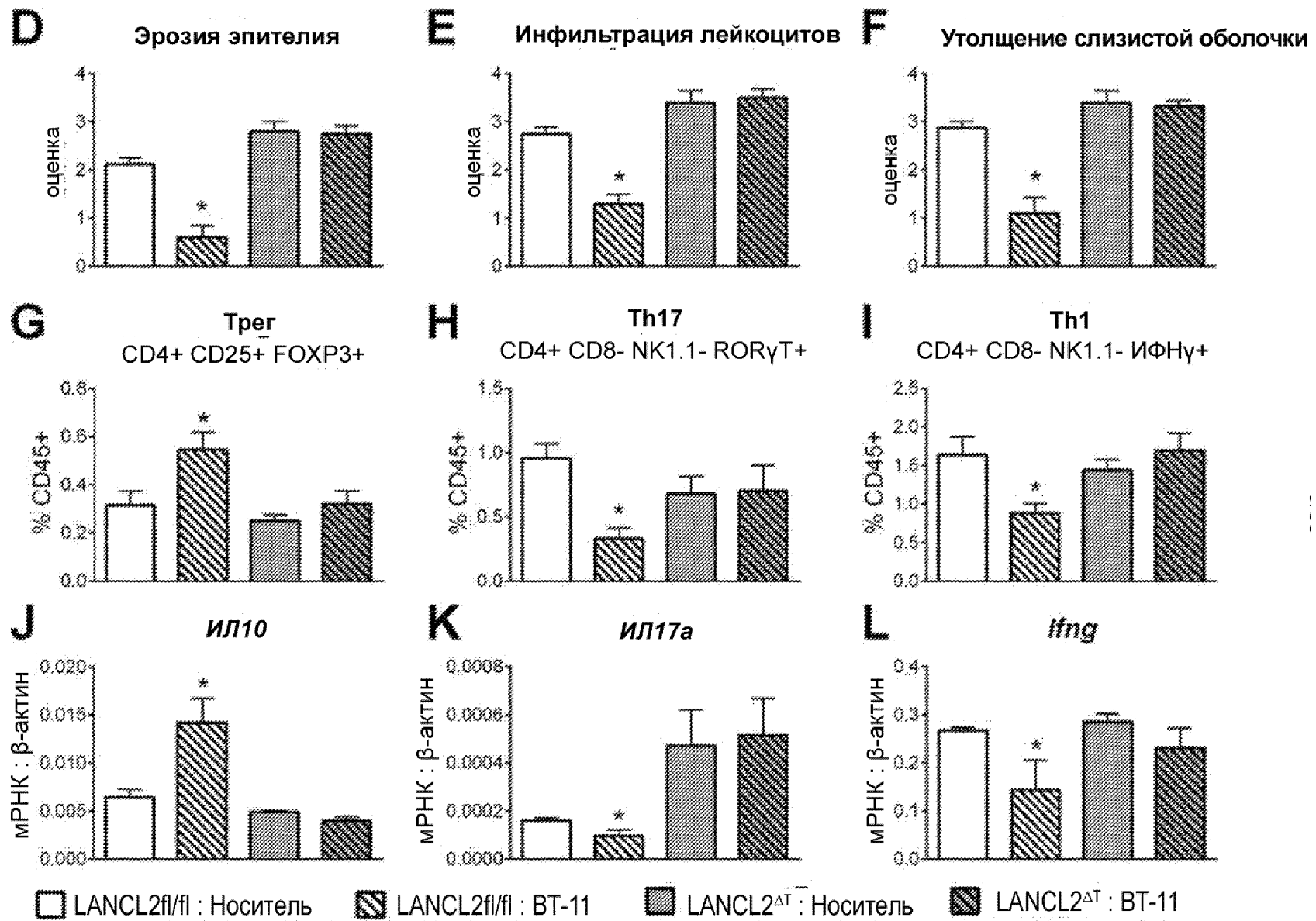
B Масса



Фиг. 2А

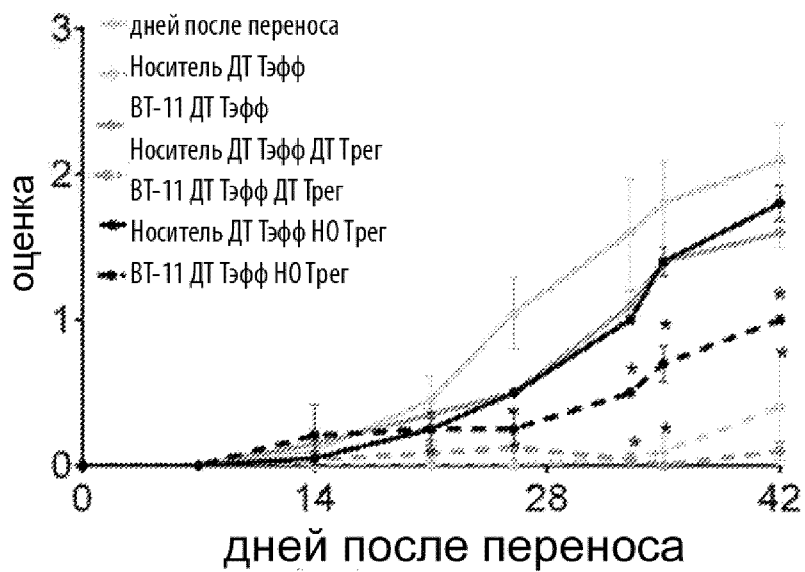


Фиг. 2В

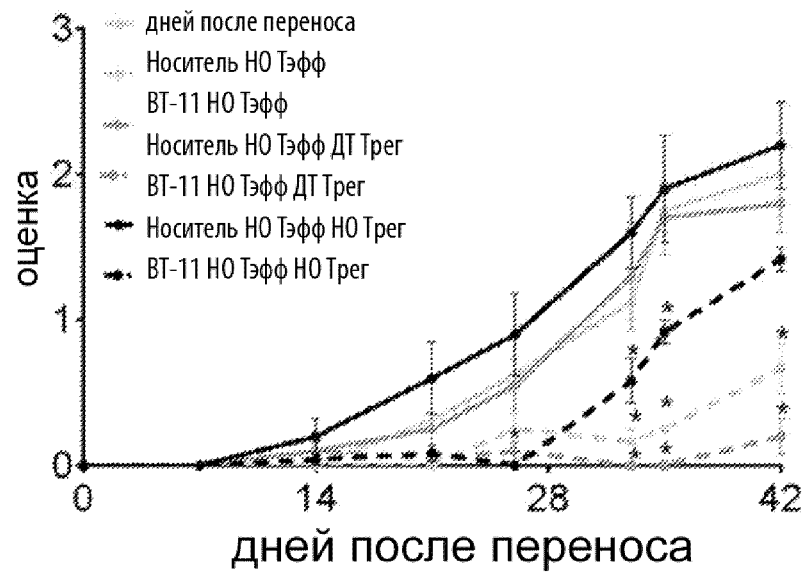


Фиг. 2С

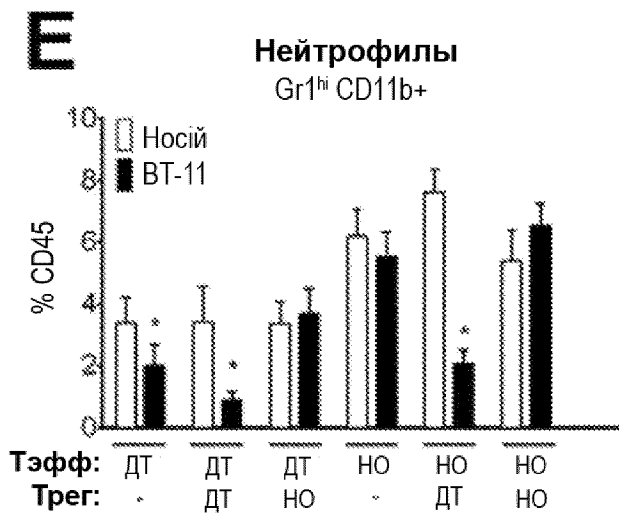
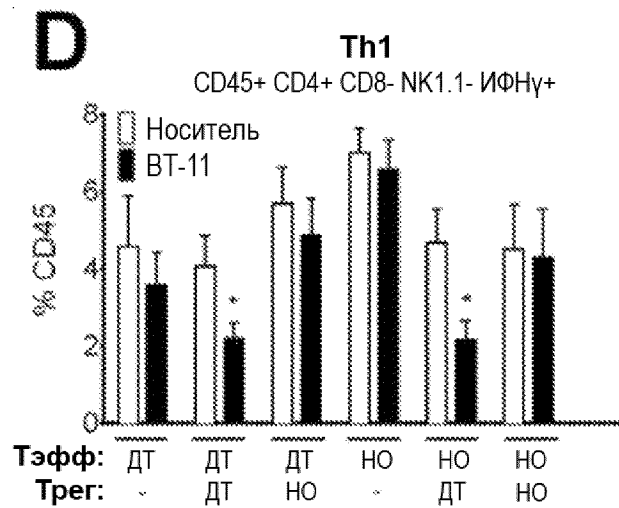
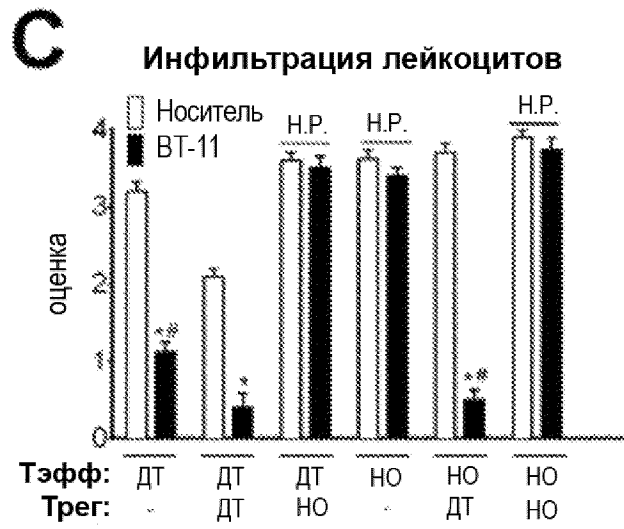
А Индекс активности заболевания оценка



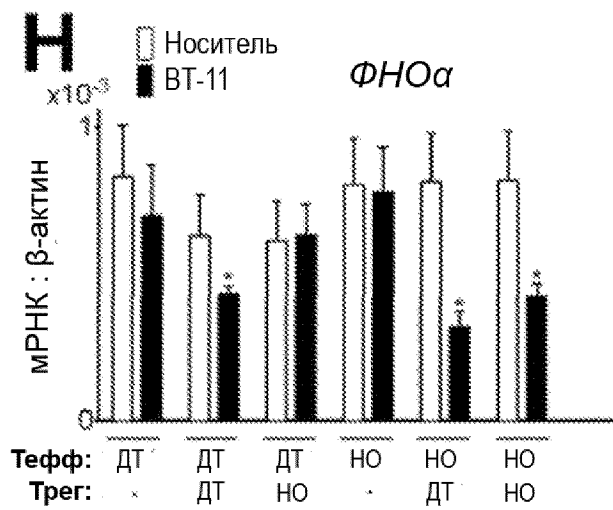
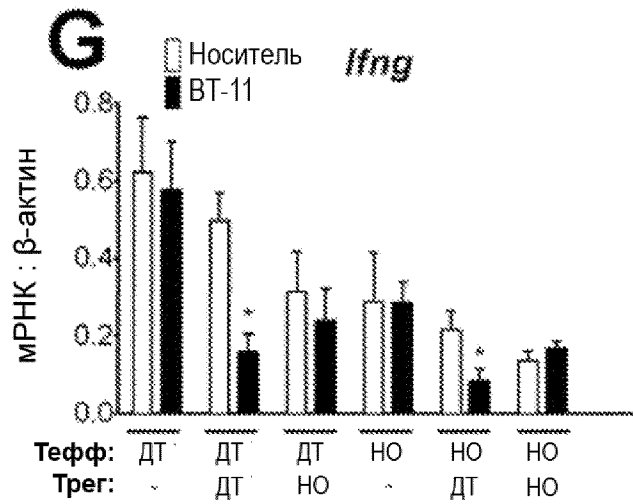
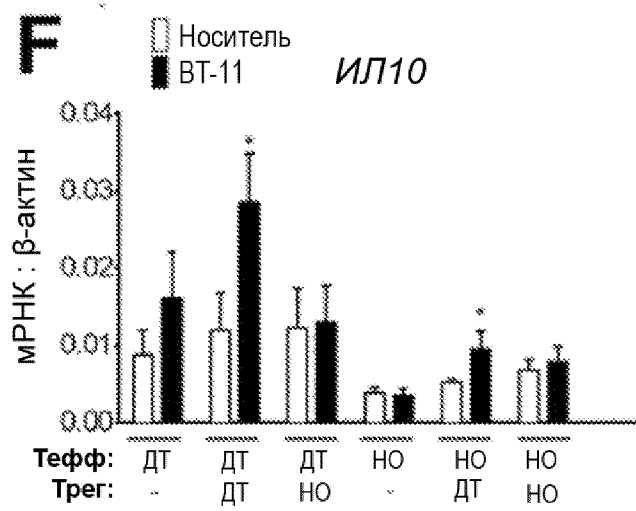
В Индекс активности заболевания



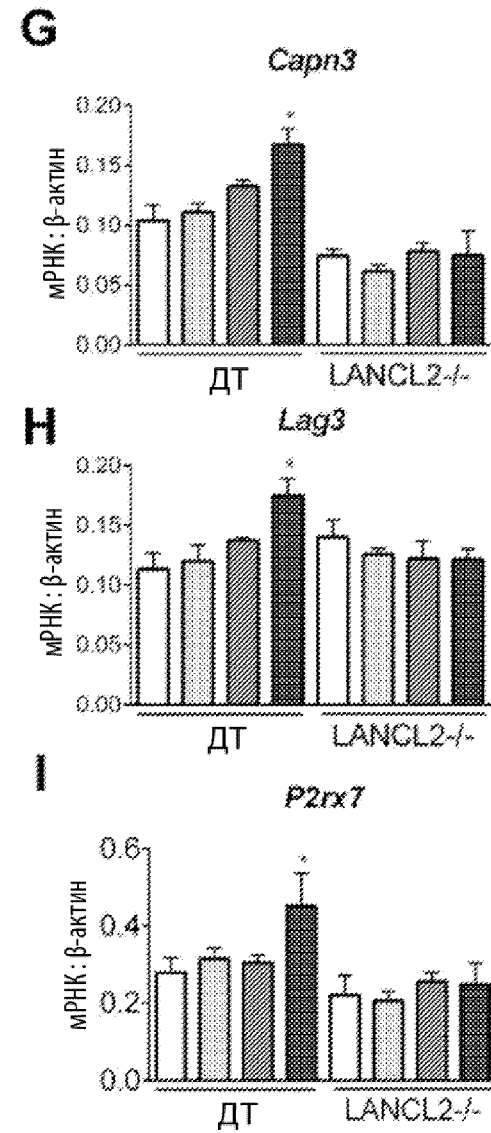
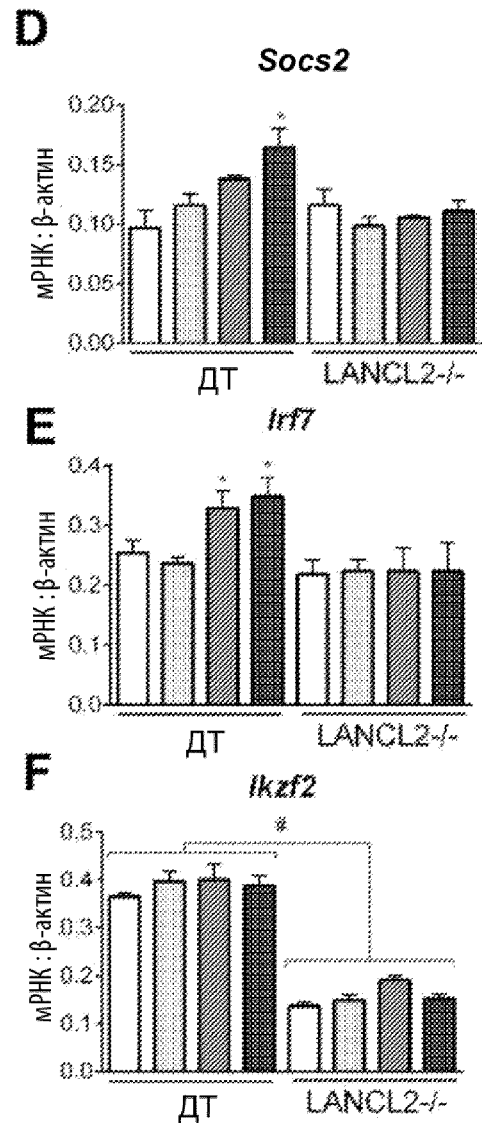
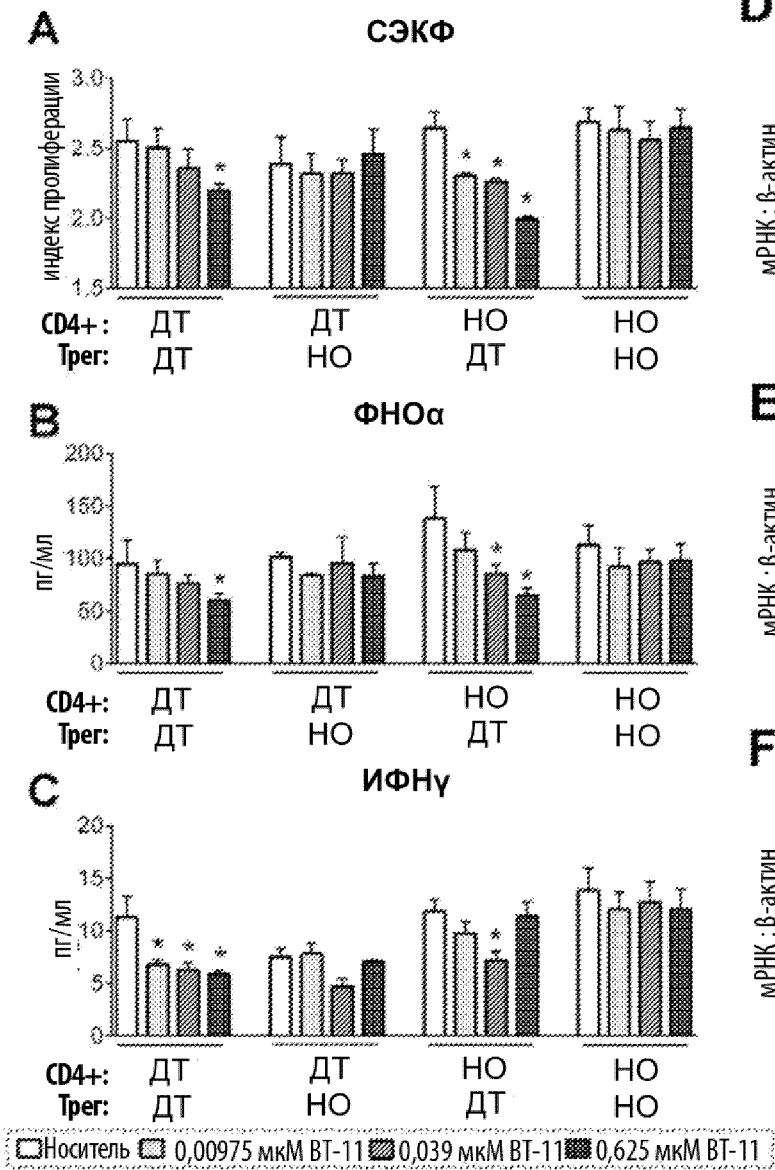
Фиг. 3А



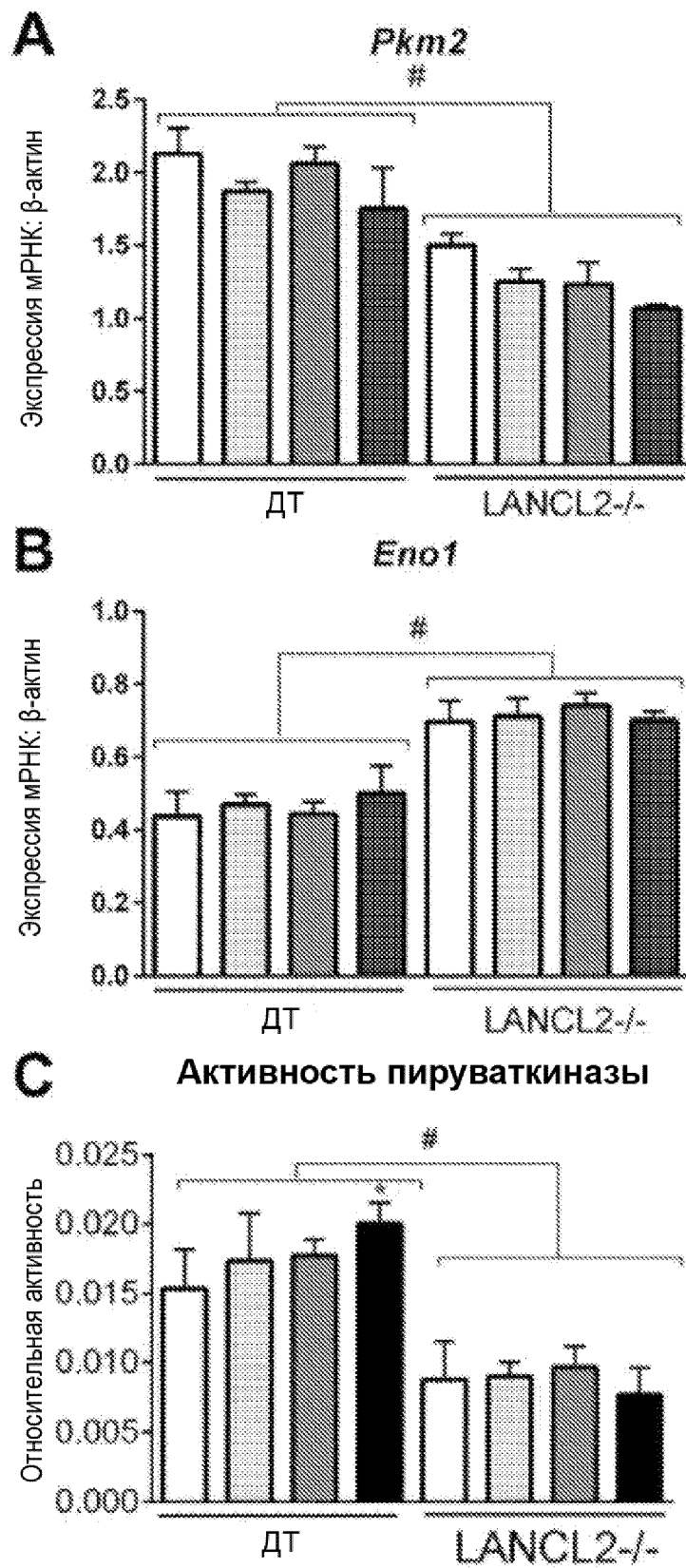
Фиг. 3В



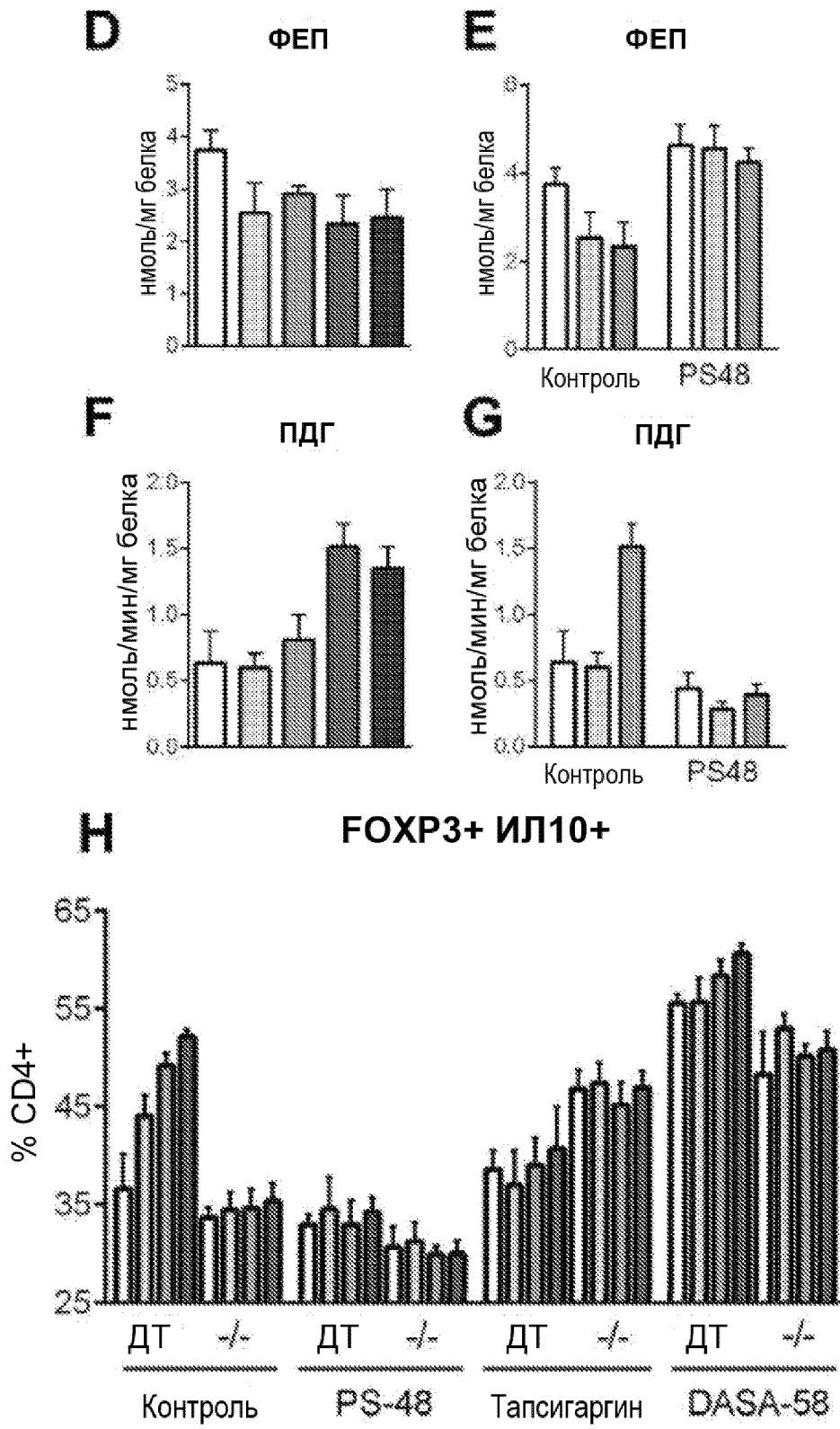
ФИГ. 3С



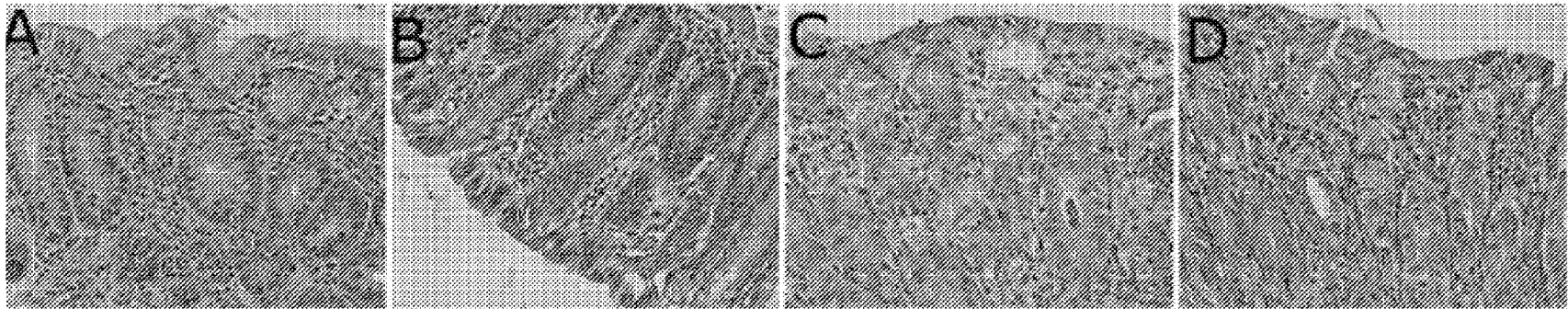
Фиг. 4



Фиг. 5А

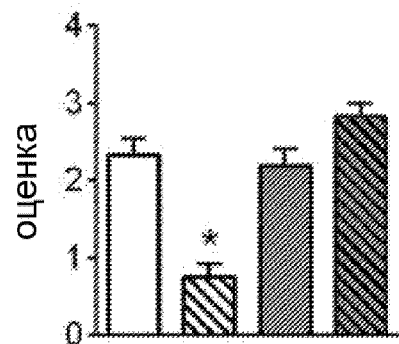


Фиг. 5В

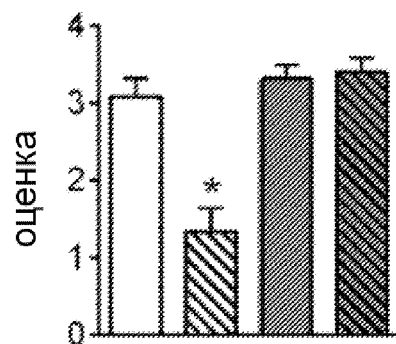


Фиг. 6А

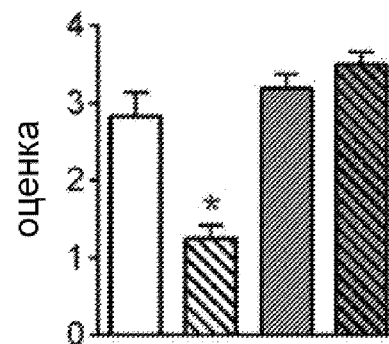
Е Эрозия эпителия



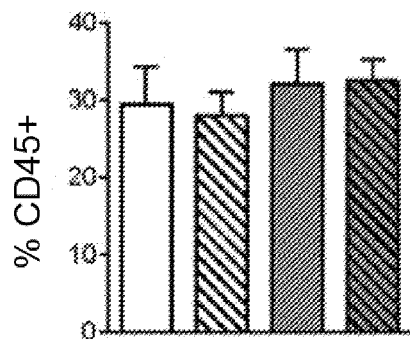
Ф Инфильтрация лейкоцитов



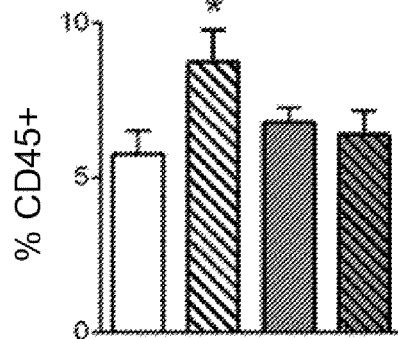
Г Утолщение слизистой оболочки



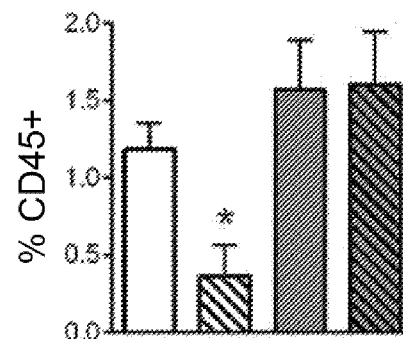
Н CD4+



И иТрег
CD4+ CD8- NK1.1- FOXP3+ ИЛ10+

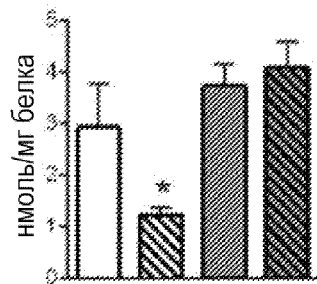


Ж Th17
CD4+ CD8- RORgt+ ИЛ17+

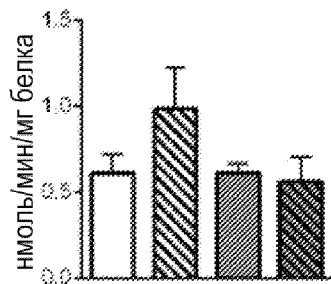


Фиг. 6В

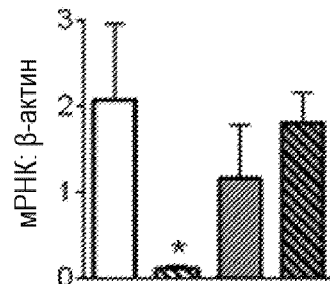
К ФЕП



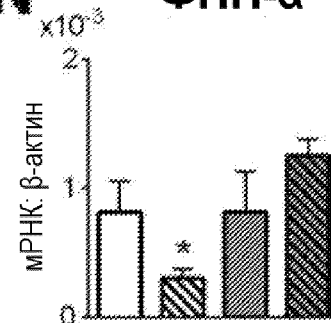
Л Активность ПДГ М



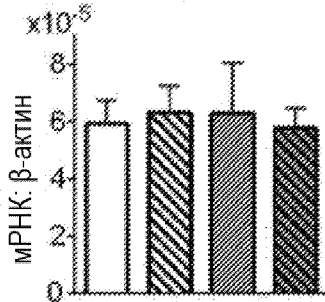
lfnг



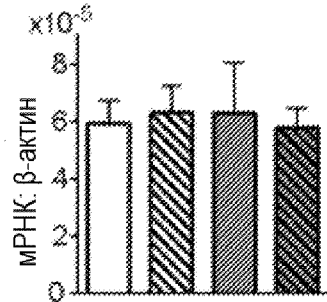
Н ФНП-α



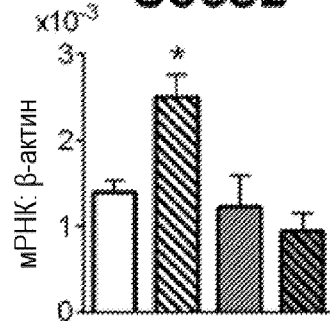
О *Foxp3-E2*



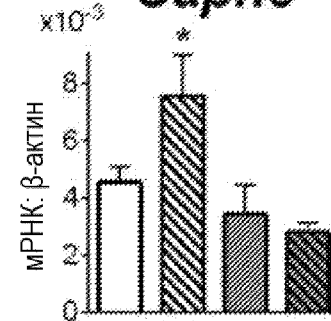
Р *Foxp3* (совокупный)



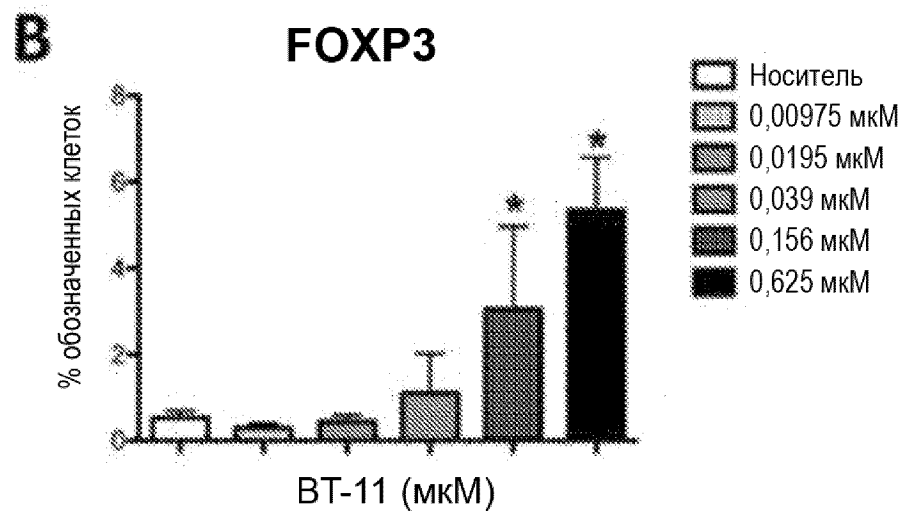
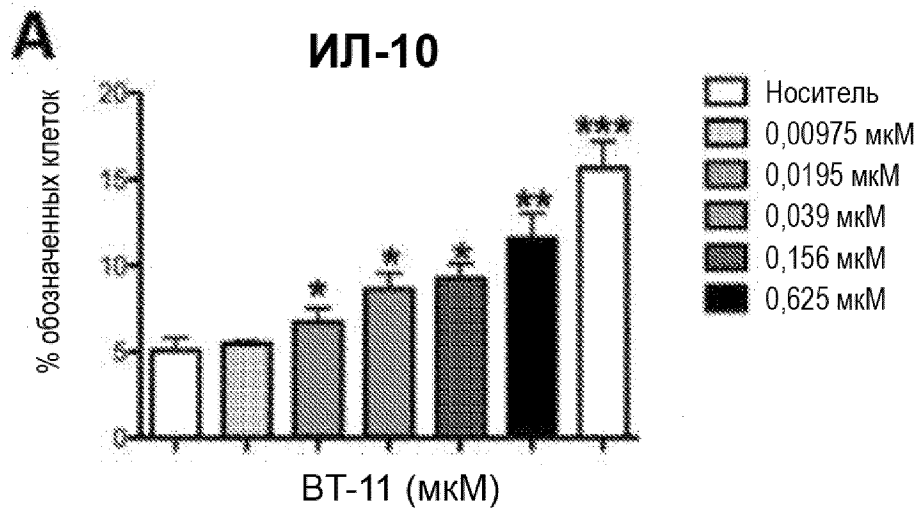
Q *Socs2*



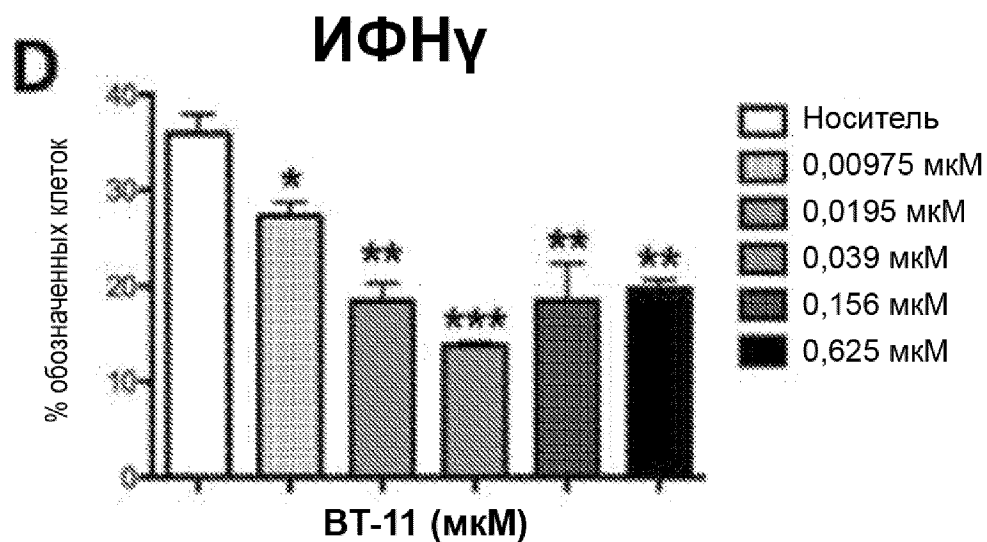
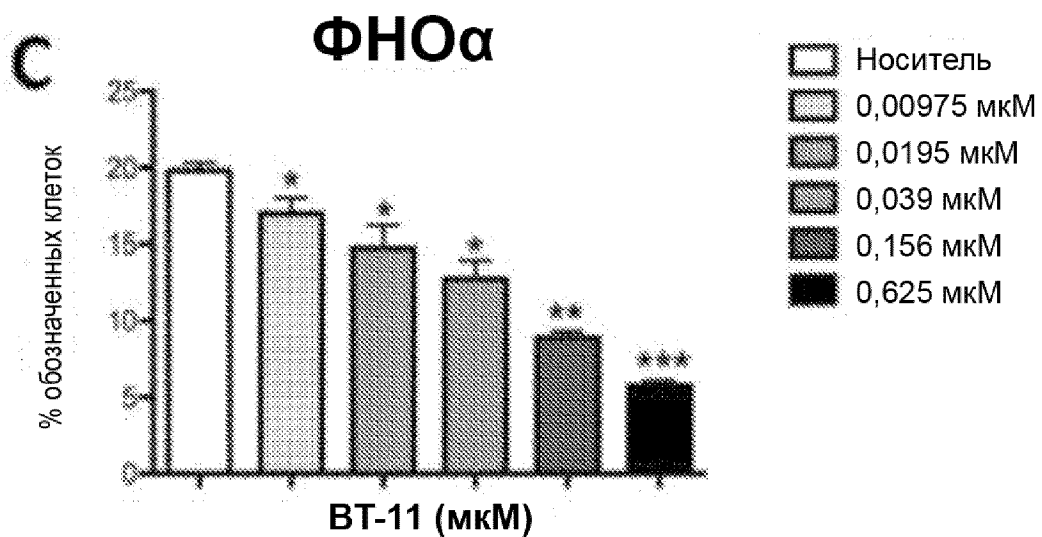
Р *Capn3*



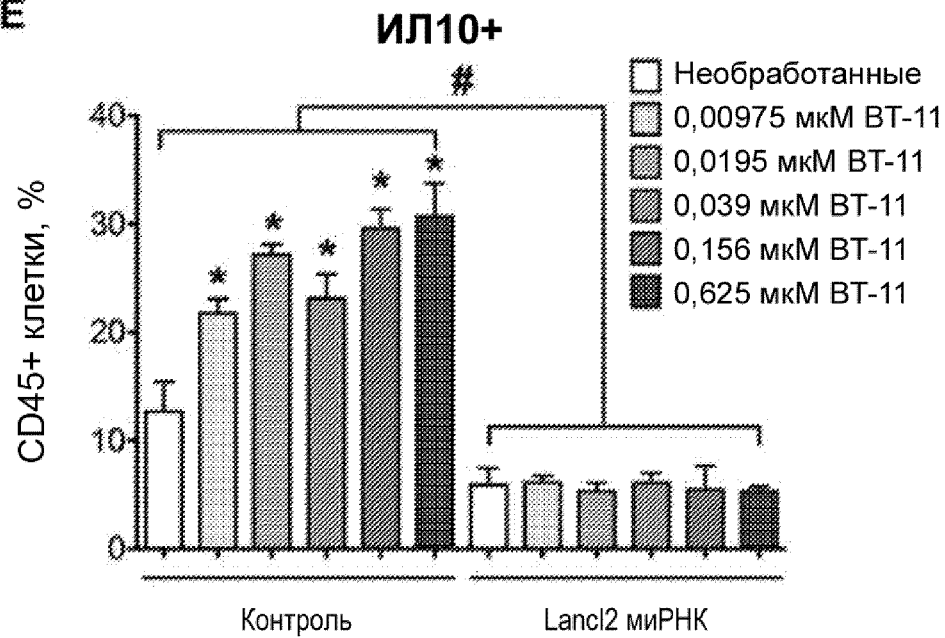
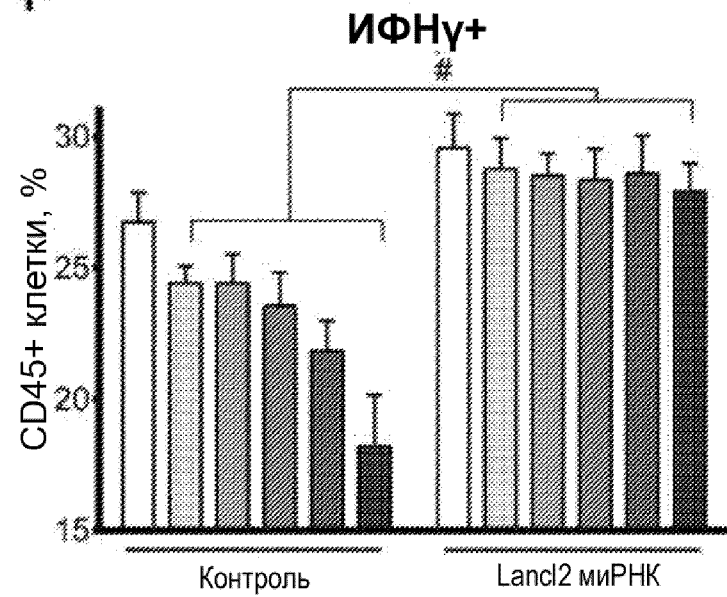
Фиг. 6С



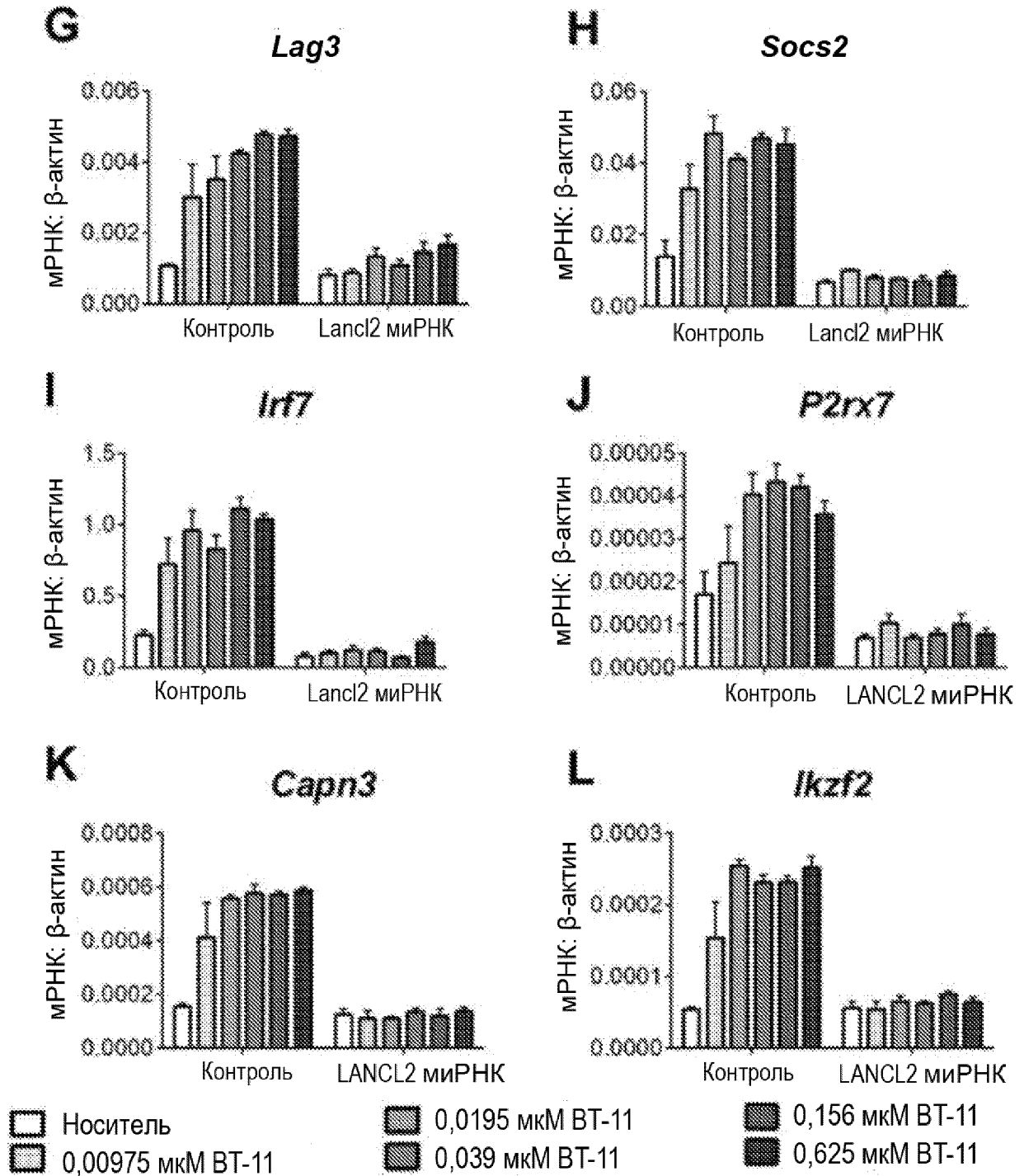
Фиг. 7А



Фиг. 7В

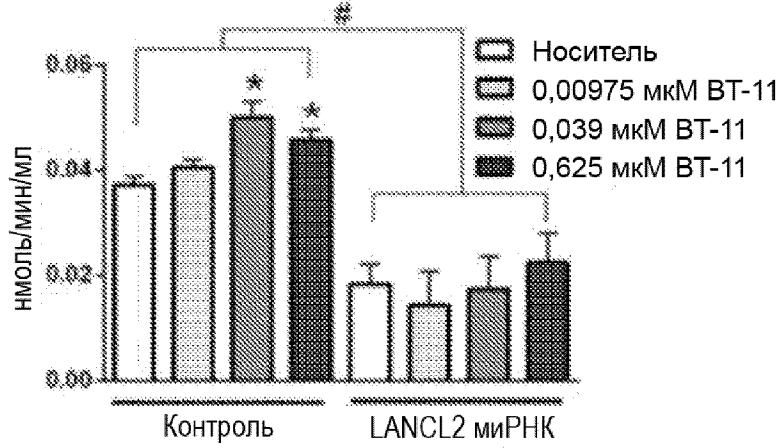
Г**В**

Фиг. 7С

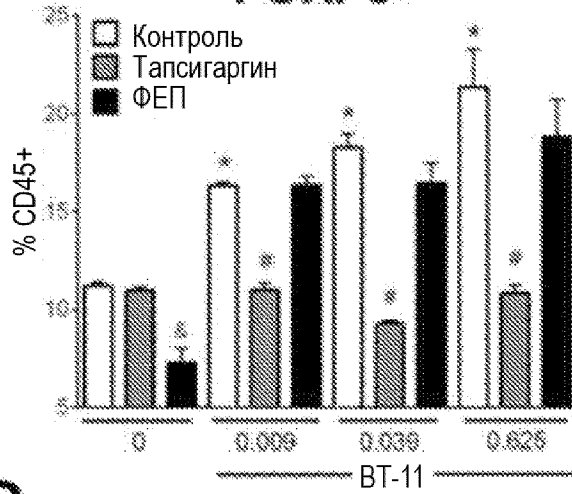


Фиг. 7D

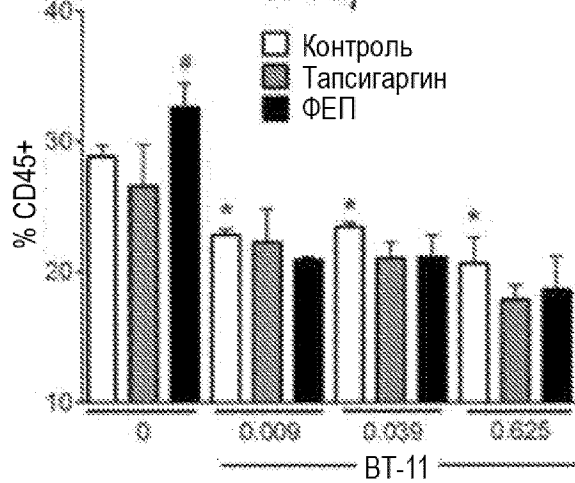
M Активность пируваткиназы



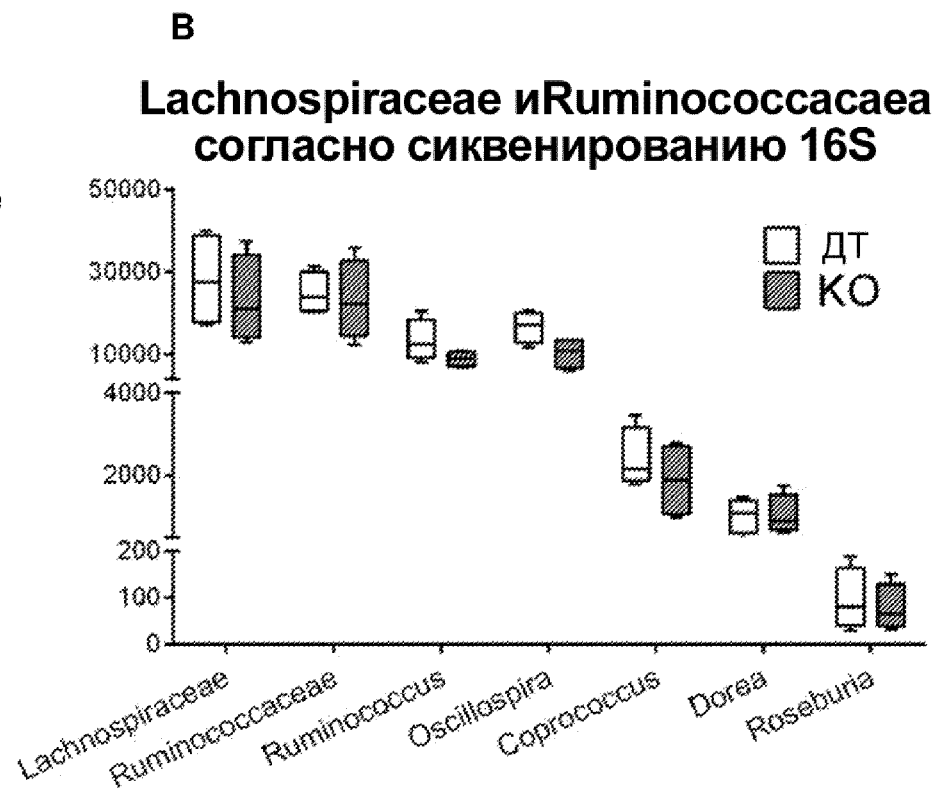
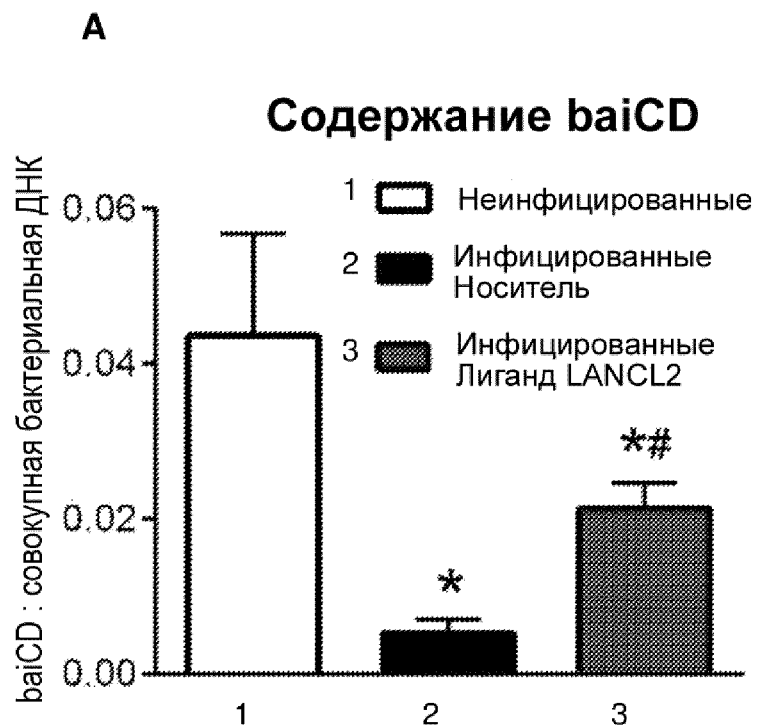
N FOXP3+



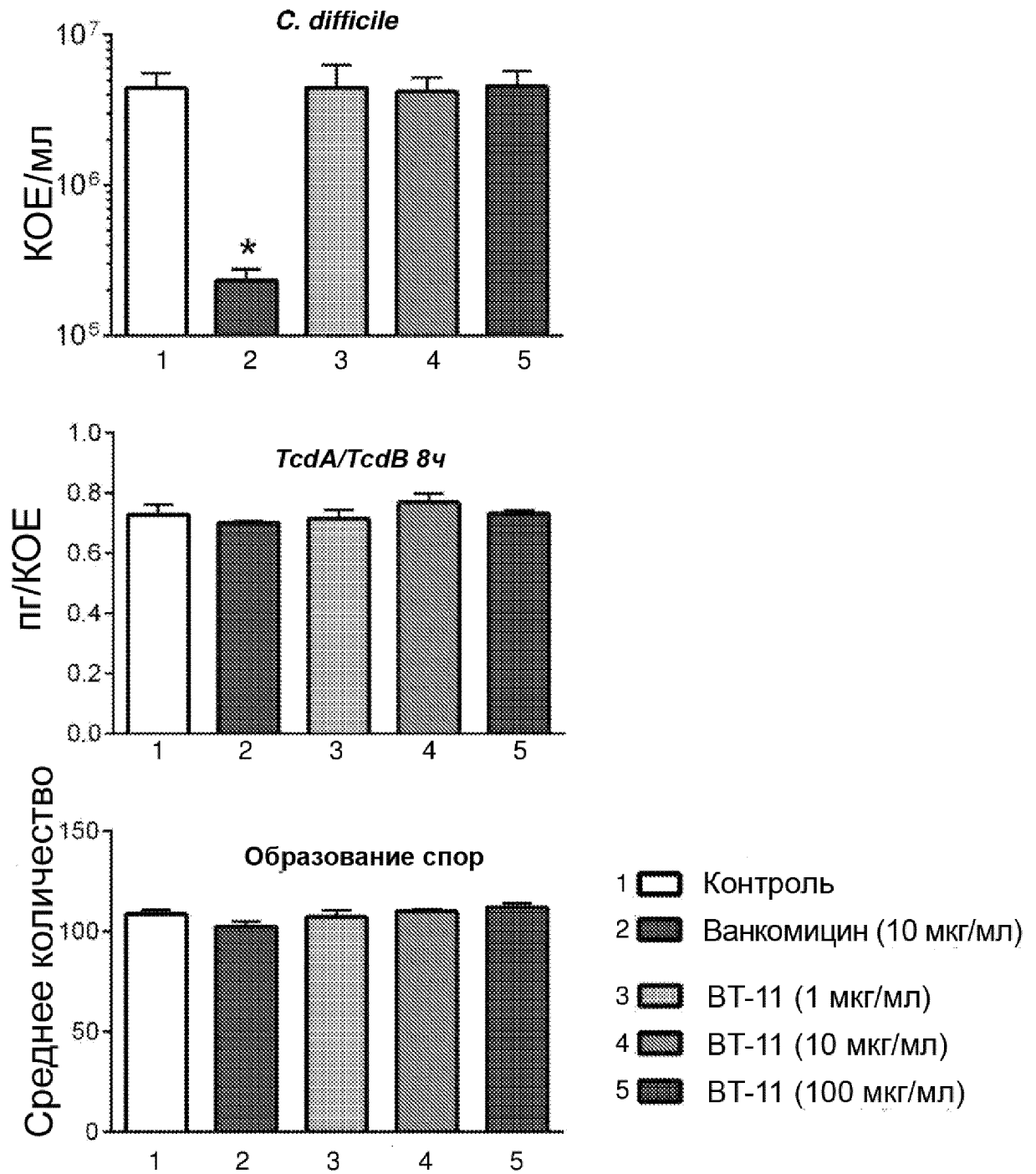
O IFN γ +



Фиг. 7E



Фиг. 8

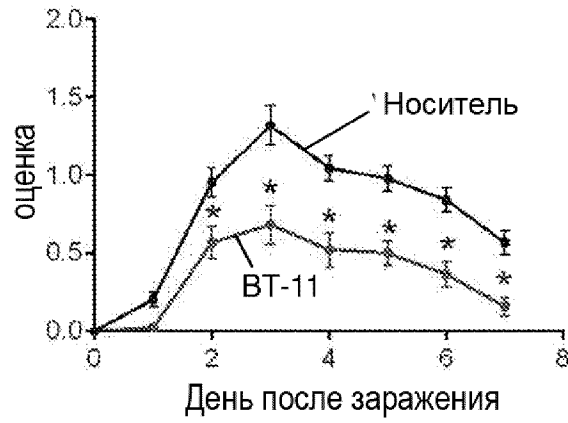


Фиг. 9

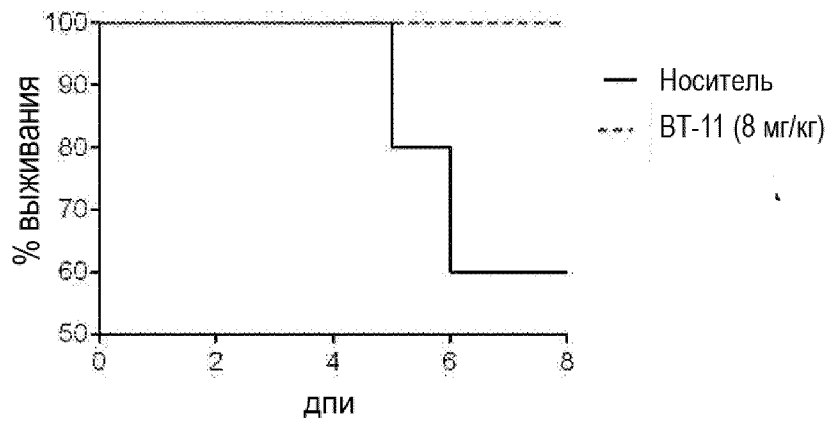
Масса



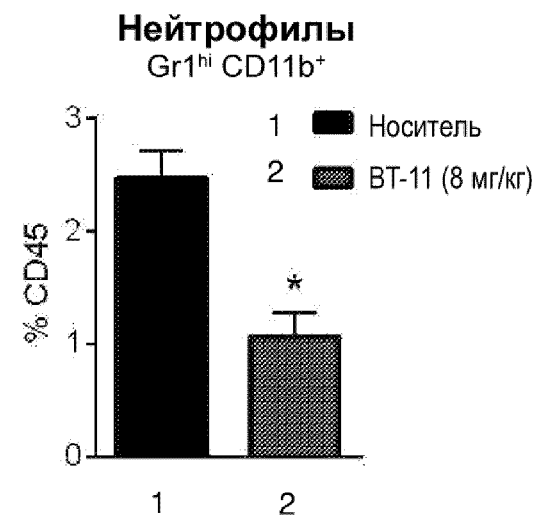
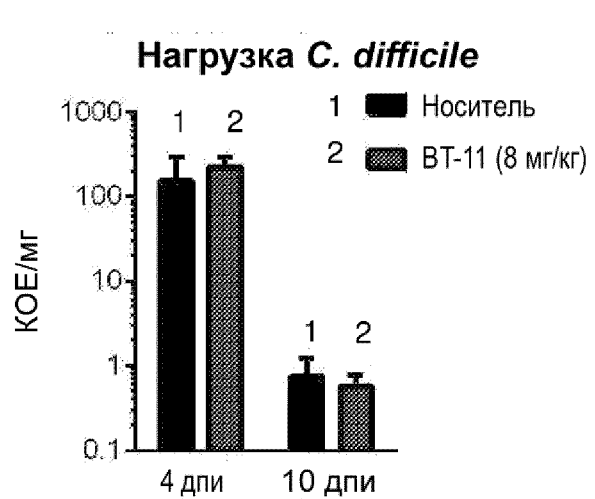
ИАЗ



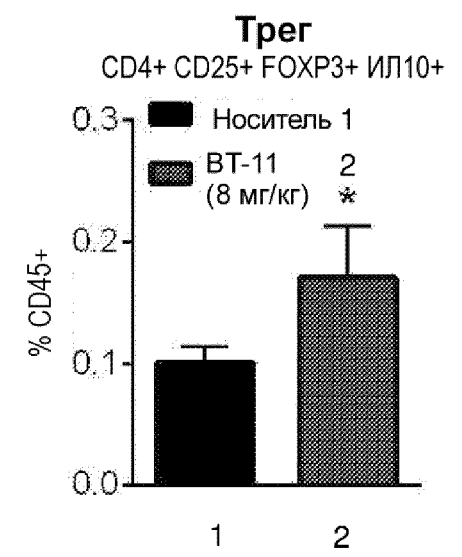
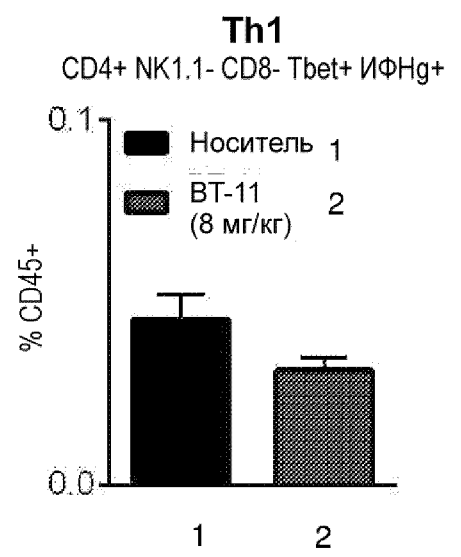
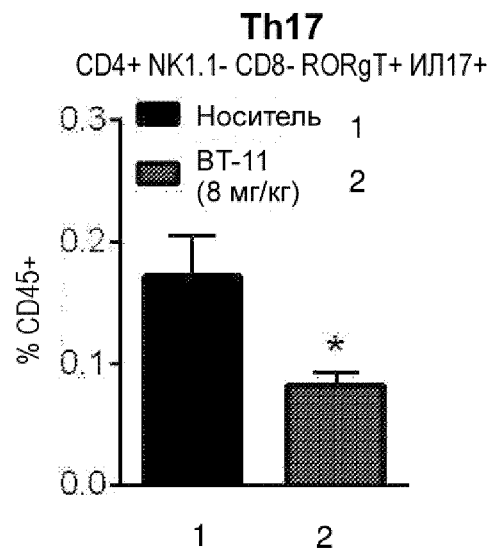
Смертность



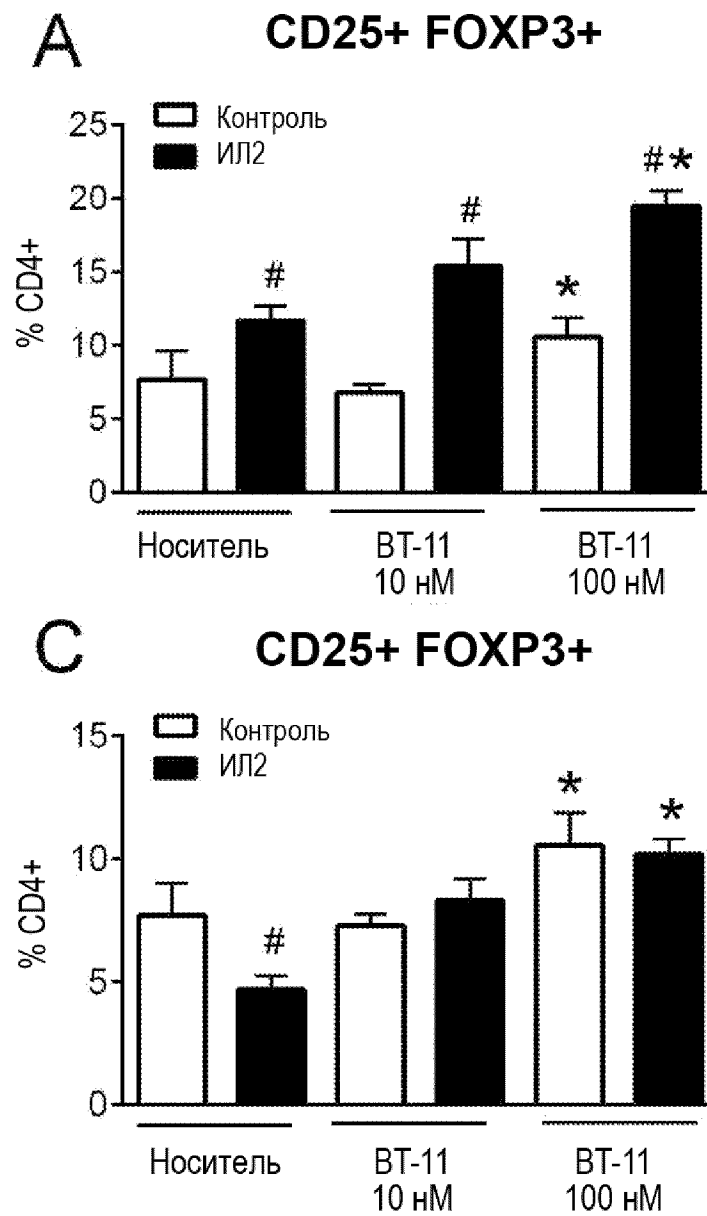
Фиг. 10А



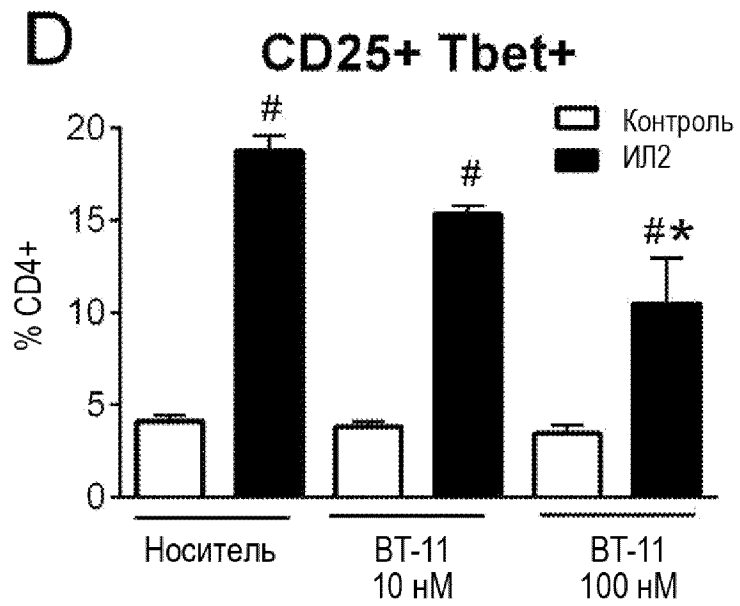
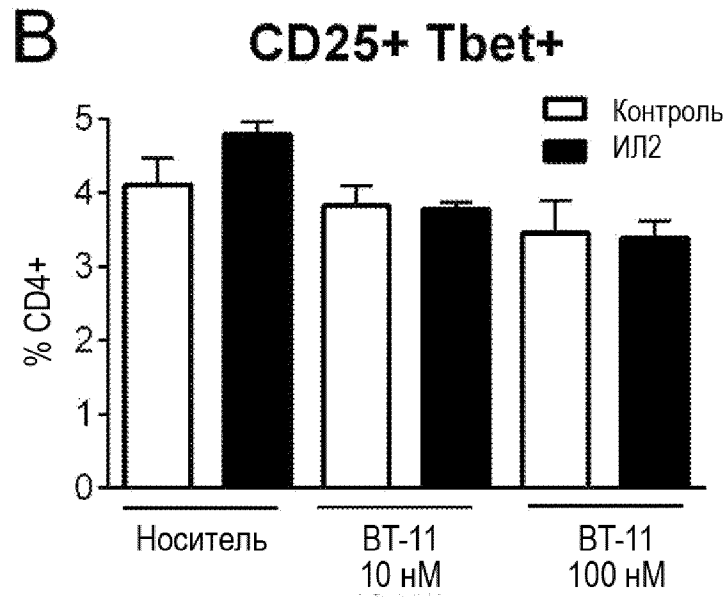
Фиг. 10В



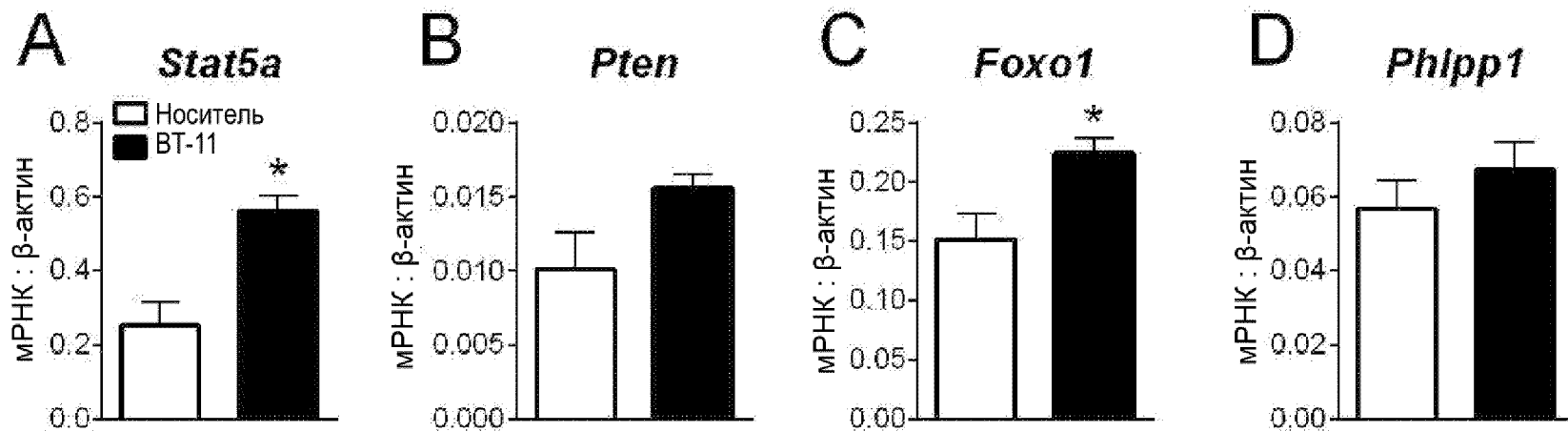
Фиг. 10С



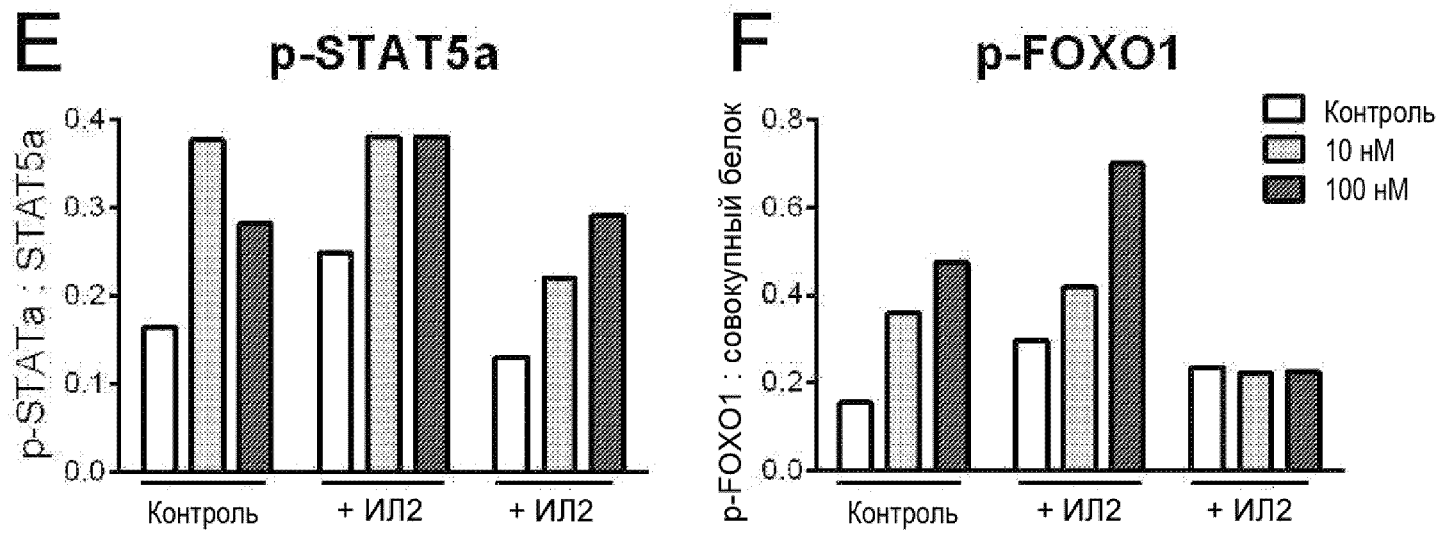
Фиг. 11А



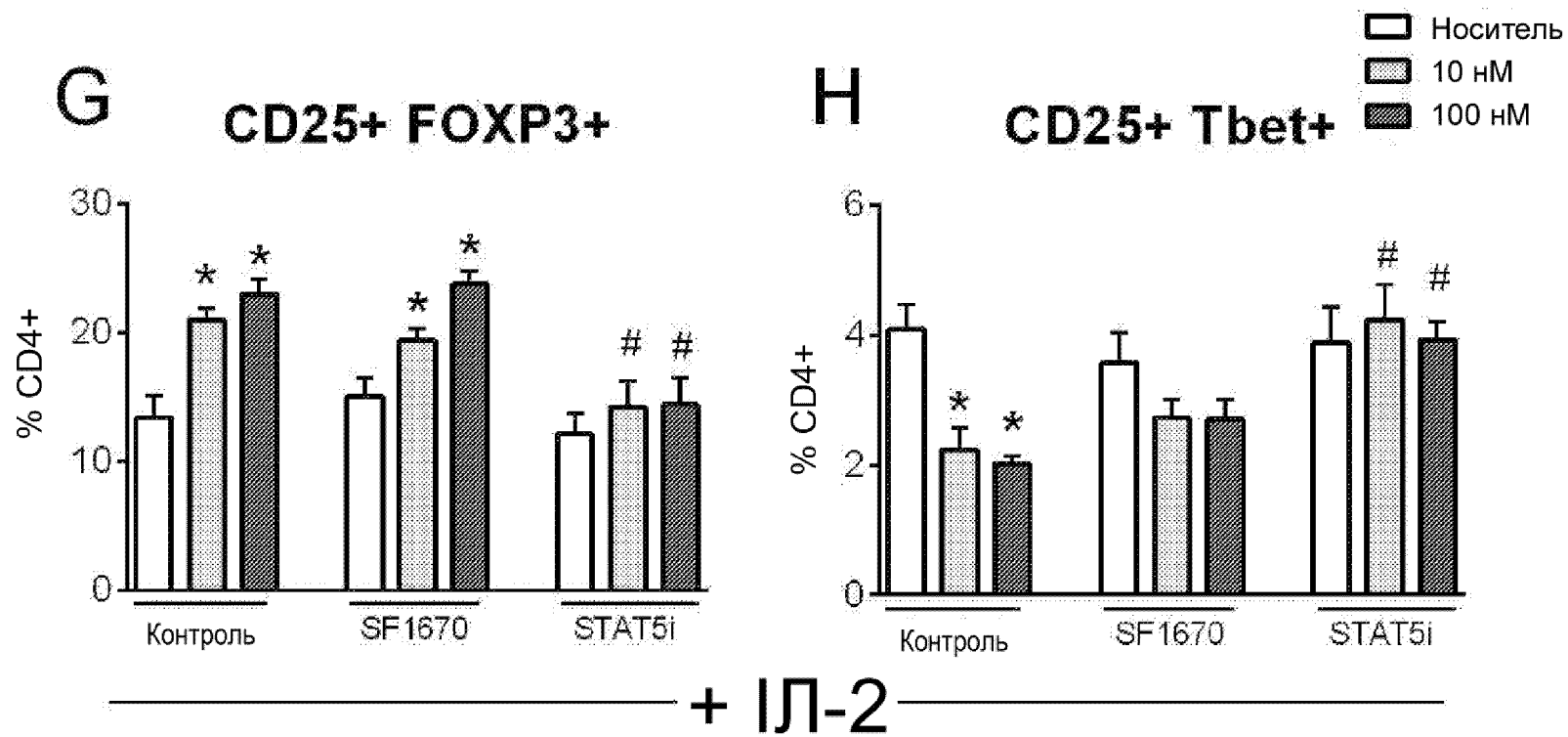
Фиг. 11В



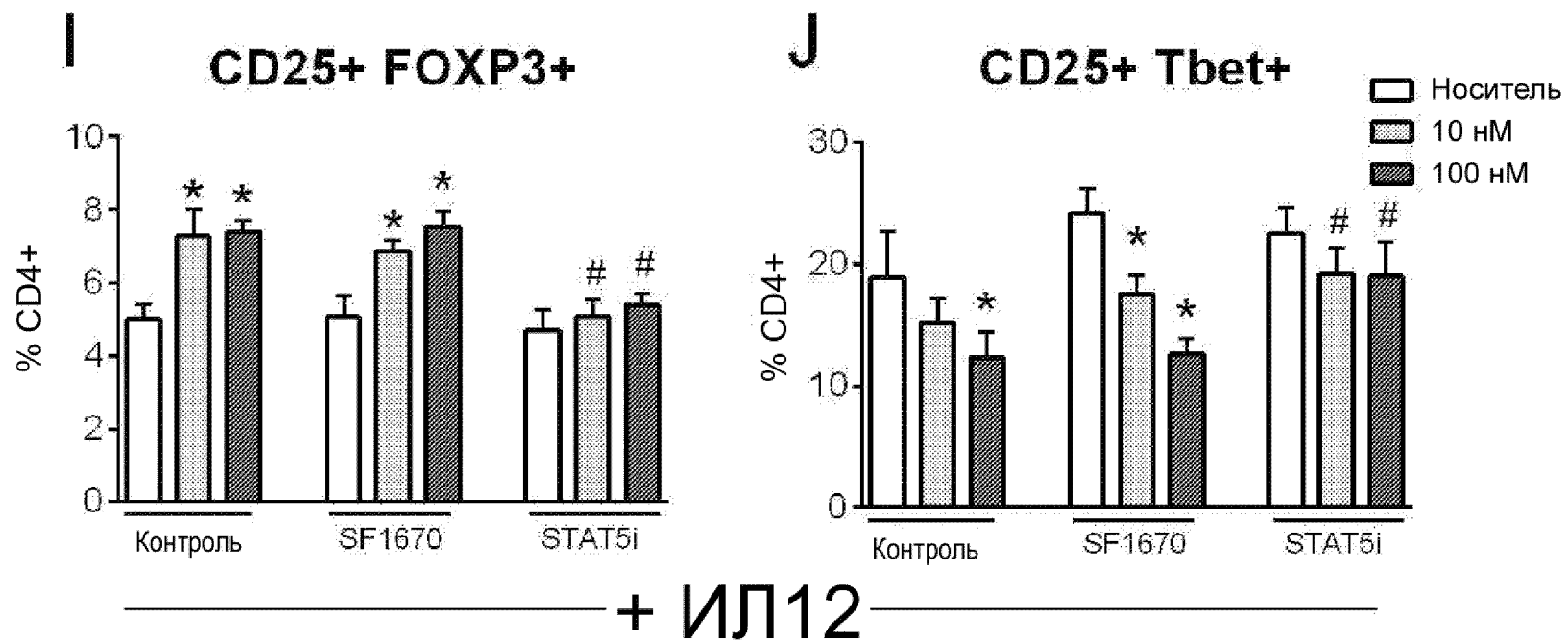
Фиг. 12А



Фиг. 12В

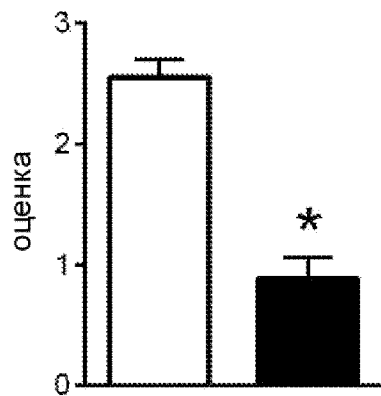


Фиг. 12С

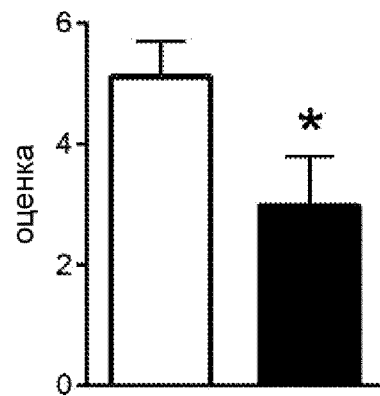


Фиг. 12D

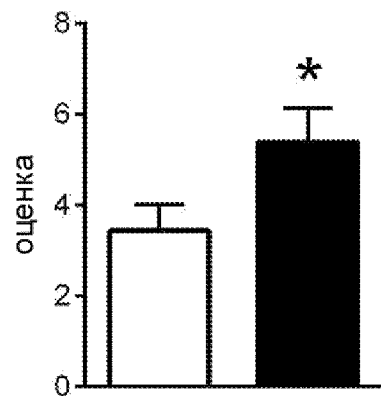
Кумулятивная активность заболевания
5 неделя



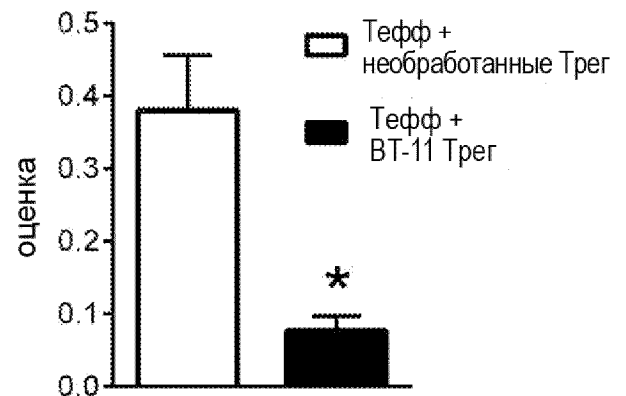
CD4+ ИФН γ +



CD4+ CD25+ FOXP3+



CD4+ IL17+ ROR γ T+



Фиг. 13