

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **041798**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.12.05

(21) Номер заявки
201992210

(22) Дата подачи заявки
2018.05.03

(51) Int. Cl. **A61K 38/45** (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
A61P 17/06 (2006.01)
A61P 17/08 (2006.01)
A61K 31/7105 (2006.01)

(54) ПРЕДОТВРАЩЕНИЕ И/ИЛИ ЛЕЧЕНИЕ ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ЗАБОЛЕВАНИЯ КОЖИ

(31) **17169956.4**

(32) **2017.05.08**

(33) **EP**

(43) **2020.05.15**

(86) **PCT/EP2018/061414**

(87) **WO 2018/206409 2018.11.15**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ЮНИЛЕВЕР ГЛОБАЛ АйПи
ЛИМИТЕД (GB)**

(72) Изобретатель:
**Пардо Кортес Люба Милена (NL),
Джинджер Ребекка Сьюзан, Ганн
Дэвид Эндрю (GB), Нейстен Тамариус
Эдмонд Христоффел, Сандерс
Мартейн Герард Хендрик (NL), Смит
Адриан Майкл (GB)**

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(56) US-A1-2004228884

BORREGAARD JEANETT ET AL.:
"Evaluation of the effect of the specific
CCR1 antagonist CP-481715 on the clinical and
cellular responses observed following epicutaneous
nickel challenge in human subjects", CONTACT
DERMATITIS, vol. 59, no. 4, 2008, pages 212-219,
XP055415503, ISSN: 0105-1873, abstract; tables

WO-A2-03003004

WO-A2-2016073955

WO-A1-2016160721

Luis J. Borda ET AL.: "Seborrheic
Dermatitis and Dandruff: A Comprehensive Review",
1 January 2015 (2015-01-01), XP055415062,
Retrieved from the Internet: URL:https://
www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/artic
les/PMC4852869/pdf/nihms754376.pdf [retrieved on
2017-10-12], the whole document

BICKERS ET AL.: "The burden of skin
diseases: 2004", JOURNAL OF THE AMERICAN
ACADEMY OF DERMATOL, MOSBY, INC, US,
vol. 55, no. 3, 1 September 2006 (2006-09-01), pages
490-500, XP005603426, ISSN: 0190-9622, DOI:
10.1016/J.JAAD.2006.05.048, cited in the application,
the whole document

HOFMAN ALBERT ET AL.: "The
Rotterdam Study: 2016 objectives and
design update", EUROPEAN JOURNAL
OF EPIDEMIOLOGY, TIPOGRAFIA LA
COMMERCIALE, DORDRECHT, NL, vol. 30, no.
8, 19 September 2015 (2015-09-19), pages 661-708,
XP035537665, ISSN: 0393-2990, DOI: 10.1007/
S10654-015-0082-X [retrieved on 2015-09-19], cited
in the application, the whole document

US-B1-6184215

(57) В изобретении раскрыто вещество, подавляющее активность гена MAST или активность продукта транскрипции или трансляции гена MAST, для применения при предотвращении и/или лечении воспалительного состояния кожи у субъекта-млекопитающего.

041798

B1

041798

B1

Область техники

Настоящее изобретение относится к веществу для применения при предотвращении и/или лечении воспалительного состояния кожи у субъекта-млекопитающего, в частности у субъекта-человека, и к способу анализа, подходящему для выявления таких веществ.

Уровень техники

Себорейный дерматит (СД) является распространенным хроническим воспалительным рецидивирующим заболеванием кожи, характеризующимся жирным шелушением, в основном возникающим в богатых кожным салом областях, таких как кожа головы, лицо и грудь. Общий уровень распространения СД плохо подтвержден документально, но по оценкам составляет приблизительно 4% (Gupta A.K., Bluhm R. Seborrheic dermatitis. *J Eur Acad Dermatol.* 2004; 18(1):13-26; Palamaras et al., Seborrheic dermatitis: lifetime detection rates. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2012; 26(4):524-6). СД оказывает большое социально-экономическое влияние, превысившее 1,4 млрд. долларов США в 2004 г. Несмотря на относительно высокий уровень заболеваемости, о патогенезе СД известно исключительно мало (Bickers et al., *J Am Acad Dermatol.* 2006; 55(3): 490-500; Szepietowski et al., *Mycoses.* 2009; 52(4):357-63).

Перхоть представляет собой распространенное состояние, включающее образование кожных чешуек, а проявление симптомов часто похоже на симптомы СД. По этой причине указанные два термина иногда применяют взаимозаменяемо, при этом СД кожи головы считается тяжело протекающей перхотью. Однако в целях настоящего изобретения эти два состояния рассматриваются как различные, и между перхотью и СД отмечают следующие отличия: (i) перхоть возникает только на коже головы, в то время как СД может возникать на других частях тела, таких как лицо и грудь; (ii) перхоть характеризуется участками слабо прилипших мелких кожных чешуек серого или белого цвета, часто сопровождающимися зудом, в то время как при СД кожные чешуйки обильны, часто проявляются в виде прилипших бугорков жирного желтого цвета; (iii) СД может сопровождаться видимым покраснением (эритемой) кожи, которое никогда не присутствует при перхоти. Тем не менее, несмотря на эти различия, указанные два состояния имеют много общих признаков.

По-видимому, значительную роль в патогенезе СД играют дрожжевые грибы *Malassezia*, поскольку устранение дрожжевых грибов приводит к улучшению течения заболевания. Однако эти дрожжевые грибы можно считать комменсалами, которые присутствуют на коже как здоровых, так и пораженных лиц, что указывает на влияние других факторов (Dawson, J. *Investig. Dermatol. Symp. Proc.* 2007; 12(2):15-19). С СД ассоциируют факторы риска хозяина, включая дисфункцию барьера рогового слоя, измененный иммунный ответ на метаболиты *Malassezia* и повышенную секрецию сальных желез (Turner et al., *Int J Cosmet Sci.* 2012; 34(4):298-306; Schwartz et al., *Acta Derm Venereol.* 2013; 93(2):131-7). Кроме того, СД более распространен у мужчин и имеет чрезвычайно высокую частоту распространения при синдроме приобретенного иммунодефицита, у реципиентов трансплантатов и людей, страдающих болезнью Паркинсона (Mastrolonardo et al., *Med Hypotheses.* 2003; 60(6):907-11; Lally et al., *J. Eur Acad Dermatol Venereol.* 2010; 24(5):561-4, Chatzikokkinou et al., *Acta Dermatovenereol Croat.* 2008; 16(4):226-30). Также с СД ассоциируют факторы окружающей среды, образа жизни и гигиены, например стресс, климат, злоупотребление алкоголем и ожирение (Gupta & Bluhm., 2004 цитируется выше).

Генетическая предрасположенность к СД не была исследована, а следовательно, не выявлено потенциальных генов кандидатов, включенных в патогенез СД. Однако можно утверждать, что СД имеет несколько общих с другими хроническими воспалительными заболеваниями кожи клинических признаков, в частности, с псориазом (ПСО) (иногда называемым "себопсориазом") и атопическим дерматитом (АД), которые гораздо лучше охарактеризованы генетически (Genetics E.A., Lifecourse Epidemiology Eczema C, Australian Asthma Genetics C, Australian Asthma Genetics Consortium A. Multi-ancestry genome-wide association study of 21000 cases and 95000 controls identifies new risk loci for atopic dermatitis. *Nat Genet.* 2015; Stuart et al. *Nat Genet.* 2010; 42(11):1000-4). Общими факторами в патогенезе этих трех заболеваний кожи являются дисфункция кожного барьера и нарушенный иммуноопосредованный ответ на внешние воздействия. В недавнем исследовании было обнаружено перекрытие транскрипционных профилей гена тканей кожи головы при перхоти, АД и ПСО, что указывает на возможную общую генетическую предрасположенность (Ginger et al., *J Invest Dermatol.* 2015; 135, S1-S17). Неизвестно, ассоциированы ли известные варианты гена АД и ПСО также с СД.

Целью настоящего изобретения является обеспечение положительной динамики при предотвращении и/или лечении воспалительных состояний кожи или относительно них, в частности, при предотвращении и/или лечении СД и/или перхоти.

Краткое описание изобретения

В соответствии с первым аспектом изобретения предложено вещество, которое подавляет активность гена MAST4 или активность продукта транскрипции или трансляции гена MAST4, для применения при предотвращении и/или лечении воспалительного состояния кожи у субъекта-млекопитающего. (MAST = Microtubule-Associated Serine Threonine kinase, ассоциированная с микротрубочками серин-треониновая киназа).

В дополнение к активности серин-треониновой киназы белки MAST обладают белок-связывающей активностью, опосредованной PDZ-доменом.

Активность гена MAST4 или продукта гена, которую прямо или косвенно подавляют, обычно (но не обязательно) может включать активность серин-треониновой киназы и/или белок-связывающую активность PDZ-домена.

В некоторых вариантах реализации вещество может модулировать специфическую активность гена MAST4 или продукта гена (т.е. уменьшать киназную активность на мг гена MAST4 или продукта гена) или может модулировать активность, вызывая уменьшение количества гена MAST4 или продукта гена MAST4. В других вариантах реализации вещество может косвенно модулировать активность белка MAST4 с помощью модуляции взаимодействия между белком MAST4 и одним или более белок-связывающими партнерами для белков MAST4.

Как указано выше, белки MAST содержат PDZ-домен. PDZ-домены присутствуют в белках из самых разных источников (бактерии, дрожжевые грибы, растения, насекомые и позвоночные). Обычно они связываются с С-концевыми аминокислотными остатками белков или реже с внутренними пептидными последовательностями белков.

Функция PDZ-доменов часто заключается в локализации клеточных белков и/или регуляции клеточных путей метаболизма. Было выявлено несколько сотен различных PDZ-доменов, и, в то время, как они демонстрируют значительное разнообразие с точки зрения их аминокислотной последовательности (около 80-90 остатков в длину), в общем случае они содержат 4-6 β -нитей, одну короткую α спираль и одну длинную α спираль, размещенную в компактной глобулярной структуре.

Субъект-млекопитающее предпочтительно представляет собой человека.

Воспалительное состояние кожи может быть выбрано из группы, состоящей из атопического дерматита (АД), псориаза (ПСО), себорейного дерматита, перхоти, розацеа и акне. Обычно воспалительное состояние кожи представляет собой хроническое воспалительное состояние кожи и предпочтительно включает СД или перхоть.

Известно, что в человеческом геноме присутствуют четыре гена MAST (MAST1, MAST2, MAST3 и MAST4), которые экспрессируются на различном уровне в коже человека. Соединение модулирует активность, по меньшей мере, гена MAST4 или активность продукта транскрипции или трансляции гена MAST4. Из собственных экспериментальных данных авторы изобретения полагают, что ген MAST4 экспрессируется в коже человека на более высоком уровне, чем любой из генов MAST 1-3.

В качестве объяснения авторы настоящего изобретения обнаружили (в результате полногеномного исследования ассоциаций), что однонуклеотидный полиморфизм (ОНП), картируемый в интронной области гена MAST4, строго ассоциирован с себорейным дерматитом в статистически значимой степени. Представляется возможным, что соединение, которое активирует или подавляет активность гена MAST4 на уровне нуклеиновой кислоты и/или полипептида, может оказывать благоприятное профилактическое и/или терапевтическое действие на себорейный дерматит или подобное воспалительное состояние кожи, такое как перхоть, атопический дерматит, псориаз, розацеа или акне.

Вещества могут активировать или подавлять активность гена MAST4 на уровне нуклеиновой кислоты и/или полипептида. В качестве неисчерпывающих показательных примеров активацию можно достичь путем введения веществ, вызывающих увеличение транскрипции и/или трансляции гена(ов) MAST, или введения молекулы нуклеиновой кислоты, которая направляет экспрессию всего или части продукта гена MAST. Например, авторы изобретения выявили сайты связывания для двух транскрипционных факторов в гене MAST4, которые могут усиливать транскрипцию гена MAST4. Модуляция взаимодействия между одним или двумя из этих транскрипционных факторов и геном MAST4 может приводить к модуляции уровня экспрессии гена MAST4.

Во избежание сомнений, модуляция активности гена MAST может охватывать доставку дополнительных кодирующих последовательностей гена MAST для обеспечения эффекта "дозирования гена", вызывая повышение уровня экспрессии гена MAST (в частности, гена MAST4) у субъекта. В равной степени изобретение может охватывать прямое нанесение полипептида MAST (в частности, полипептида MAST4) на кожу субъекта для обеспечения локального увеличения концентрации полипептида MAST в или на коже субъекта, где требуется активация.

На полипептидном уровне подавления активности гена MAST можно достичь с помощью введения соединения, ингибирующего активность или функцию полипептида, экспрессируемого геном MAST. Одним из классов таких соединений являются иммуноглобулины и антигенсвязывающие участки или фрагменты молекул иммуноглобулинов. Иммуноглобулин может представлять собой антитело любого класса (хотя в общем случае предпочтительны IgG, IgA или IgM), которое обладает связывающей активностью к полипептиду, экспрессируемому геном MAST. Альтернативно соединение может представлять собой одну из многих хорошо известных участков или фрагментов молекулы иммуноглобулина, которая сохраняет способность к связыванию с полипептидом, экспрессируемым геном MAST. Они включают Fab, F(ab')₂, одноцепочечный Fv (scFv), однодоменные антитела (dAbs) и тому подобное.

Иммуноглобулин или участок, или фрагмент иммуноглобулина предпочтительно будут иметь константу K_D диссоциации для полипептида MAST 10^{-8} или менее, более предпочтительно 10^{-9} или менее, и наиболее предпочтительно по меньшей мере 10^{-10} или менее. K_D в общем случае находится в диапазоне

от 10^{-8} до 10^{-11} .

Иммуноглобулин или участок, или фрагмент иммуноглобулина предпочтительно будут относительно специфичными в своем связывании с полипептидом MAST. Специалисту в данной области техники известно, что иммуноглобулин, описываемый как "специфичный" для конкретного антигена, относится к тому факту, что антигенсвязывающий сайт, расположенный в вариабельных доменах легкой и тяжелой цепей (определяемых как "паратоп"), будет связываться более или менее исключительно с антигеном, запускающим выработку антитела. Как правило, исключительность включает высокую аффинность связывания, возникающую в результате множества кооперативных молекулярных взаимодействий. Однако существуют другие области молекулы антитела, которые могут связываться другими молекулами, такими как Fc-рецепторы, белки комплемента и различные бактериальные белки, такие как белок-A от *Staphylococcus aureus*. Кроме того, как относительно большой белок, молекула антитела склонна ко всем неспецифическим связывающим взаимодействиям, вызывающим более или менее сильное связывание белков с поверхностями, с которыми они контактируют. В общем случае такие неспецифические связывающие взаимодействия являются общими для всех антител одного и того же класса, независимо от их специфичности к антигену. Таким образом, антитело в общем случае будет связываться со своим распознанным антигеном с афинностью, которая на порядок больше аффинности, с которой оно связывается с большинством других молекул.

В равной степени специалисту в данной области техники известно, что термин "иммуноглобулин" не обязательно указывает на то, что требуется один вид молекул. Скорее этот термин может охватывать гетерогенную смесь или популяцию молекул, а "специфичный иммуноглобулин" может относиться к тому участку смеси, который специфичен к рассматриваемому антигену.

Некоторые иммуноглобулины, специфичные к полипептиду MAST, являются коммерчески доступными и включают, например, ab87734 (от AbCam, Cambridge UK), являющийся кроличьим поликлональным антителом, которое связывается с эпитопом между аминокислотами 1900 и 1905 человеческого полипептида MAST4; ab196777, другое кроличье поликлональное антитело, которое связывается с полипептидом MAST4 человека (доступно от компаний AbCam; а также от Gene Tex GTX87899); PA5-36976 (от ThermoFisher), кроличье поликлональное, специфичное к полипептиду MAST4 человека, и HPA000544 (Sigma), кроличье поликлональное, которое связывается с эпитопом, расположенным в аминокислотных остатках 1545-1652 полипептида MAST4 человека.

Другие молекулы, которые могут ингибировать активность полипептида MAST, в частности полипептида MAST4, включают небольшие органические химические соединения (например, с относительной молекулярной массой ниже 5000, предпочтительно, ниже 4000 и, наиболее предпочтительно, ниже 3000).

В частности, предпочтительная небольшая органическая молекула ингибитора полипептидов MAST включает класс хиноксалинов и их производных. Хиноксалин и производные хиноксалина содержат гетероциклический кольцевой комплекс, состоящий из атома азота в положениях 1 и 4. Структура хиноксалина показана на фиг. 2. Хиноксалин и его производные были рассмотрены Pereira и другими, 2014 (European Journal of Medicinal Chemistry 97, p. 664-672) и Tristan-Manzano и другими, 2015 (Current Medicinal Chemistry 22, p. 3075-3108). Производные хиноксалина легко синтезировать (Porter et al., "Pyrazines and their benzo derivatives", Boulton & McKillop Eds. Compr. Heterocycl. Chem. Pergamon Press, Oxford 1984, 3.; Sato et al., "Pyrazines and their benzoderivatives", Katritzky, Ramsden, Scriven & Taylor Eds. Compr. Heterocycl. Chem. III, Elsevier Oxford 2008, 8).

Было показано, что ряд производных хиноксалина являются мощными ингибиторами белков MAST (см. Li et al., Biorganic & Medicinal Chemistry Letters 2013, 23, p. 5217-5222).

Предпочтительные производные хиноксалина для применения в настоящем изобретении включают имидазохиноксалины. Li и другие (цитируется выше) выявили несколько производных хиноксалина, которые были как мощными, так и относительно селективными ингибиторами киназной активности полипептида MAST. Соответственно, предпочтительные производные хиноксалина для применения в настоящем изобретении включают следующие: имидазо[1,2- α]хиноксалины, в частности 4-хлоримидазо[1,2- α]хиноксалин. Другие предпочтительные ингибиторы киназной активности полипептида MAST на основе производного хиноксалина проиллюстрированы на фиг. 3. Синтез этих соединений раскрыт Li и другими (см. выше).

Алгоритм SUPERFAMILY библиотеки скрытой марковской модели (база данных структурных и функциональных аннотаций для всех белков и геномов) локализует PDZ-домен MAST4, начиная с аминокислотного остатка 1139 и заканчивая аминокислотным остатком 1231 (<http://supfam.org/SUPERFAMILY/cgi-bin/scop.cgi?ipid=SSSES0156>). Другие алгоритмы (Gene 3D, Prosite, Smart и Pfam) выявляют PDZ-домен в MAST4 в той же области молекулы (от остатка около 1137 до 1231).

Кристаллическая структура PDZ-домена MAST4 была определена и опубликована (Elkins et al. 2010 Protein Sci. 2010 Apr; 19(4):731-741).

Выравнивание последовательностей белков семейства MAST показывает, что в то время как PDZ-домен не идентичен, он высокосохранен между членами семейства белков MAST.

Соответственно, можно конструировать небольшие пептиды, которые специфично нацелены на PDZ-домен MAST4, что может нарушать взаимодействия MAST4 с его белками-мишенями, тем самым модулируя его функцию. Исследования с осаждением (Valiente et al., 2005, J. Biol. Chem. 289 (32) 28936-28943) подтверждают потенциал конструирования селективных PDZ-ингибиторов MAST4, поскольку в этих исследованиях PDZ-домен MAST4 не связывался с PTEN, тогда как PDZ-домены MAST2 и MAST3 связывались.

Физиологические белки-мишени, с которыми связывается PDZ-домен MAST4, еще не определены, но анализ с помощью базы данных String (<http://string-db.org/cgi/>), в котором применяют интеллектуальный анализ текстовой информации, анализ коэкспрессии и экспериментальные данные для прогнозирования белок/белковых взаимодействий, выявил в качестве предполагаемых функциональных партнеров для MAST4 следующие: GALNS, DNAJC6, TPTE2, TENC1, ARID4B, SPG21, PTEN, TNS3, SRL и TPTE. Кроме того, Colland и соавторы сообщили о взаимодействии между MAST4 и SMAD1 после дрожжевого двугибридного скрининга взаимодействий белка SMAD (Colland et al 2004 Functional proteomics mapping of a human signaling pathway. Genome Res. 2004 Jul; 14(7):1324-32).

Ввиду вышеизложенного иммуноглобулины или их антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с киназным доменом, или с PDZ-доменом белка MAST4, или близко к ним, должны успешно ингибировать его активность. Точно так же, учитывая, что была определена кристаллическая структура PDZ-домена MAST4, специалисту в данной области техники было бы относительно просто придумать небольшую молекулу, такую как пептид, которая могла бы связываться с PDZ-доменом белка MAST или иным образом ингибировать взаимодействие между PDZ-доменом и его лигандом.

Также было показано, что 27-гидроксистерол регулирует MAST4 (см. Nelson, Molecular and Cellular Endocrinology Volume 466, 5 May 2018, Pages 73-80).

Другие молекулы могут ингибировать активность MAST на уровне нуклеиновой кислоты (например, ингибировать транскрипцию и/или трансляцию генов MAST, в частности гена MAST 4). В качестве примера можно легко получить молекулы короткой интерферирующей РНК (киРНК), обычно около 20-30 п.н. с одним или двумя нуклеотидными выступами на каждом конце, поскольку известна последовательность генов MAST (например, ген MAST4 расположен в прямой нити хромосомы 5 и содержит нуклеотиды от 66596361 до 37169595 (версия человеческого генома GRCh 38: CM 000667.2)). Прогнозируют, что ген MAST4 кодирует 21 транскрипт, многие из которых были подтверждены экспериментально. Транскрипт: MAST4-001 ENST00000403625.6 кодирует самый длинный полипептид (2623 аминокислоты) с 29 экзонами и в настоящее время аннотируется 40 доменами и признаками, и картируется 85 олигонуклеотидами.

Подробные данные других генов MAST следующие.

Локализация гена MAST1: хромосома 19: 12833951-12874951 прямая нить (версия человеческого генома GRCh38: CM000681.2). Синонимы MAST1: SAST170, SAST, KIAA0973.

В продукте гена MAST1 домен протеинкиназы расположен вблизи аминокислотных остатков 372-647, а PDZ-домен - вблизи аминокислотных остатков 958-1057.

Локализация гена MAST2: хромосома 1: 45786987-46036124, прямая нить (версия человеческого генома GRCh38: CM000663.2). Синонимы MAST2: KIAA0807, GN MAST205, KIAA0807, MTSSK, MAST205.

В белке MAST2 домены протеинкиназы расположены в области аминокислотных остатков 510-860, в частности остатков 512-785.

Локализация гена MAST3: хромосома 19: 18097793-18151692, прямая нить (версия человеческого генома GRCh38: CM000681.2). Синонимы MAST3: KIAA0561.

В белке MAST3 домен протеинкиназы расположен вблизи остатков 365-719 и, в частности, в остатках 367-640.

На уровне нуклеиновых кислот увеличения активности генов MAST, в частности гена MAST4, можно достичь путем введения транскрипционного фактора, увеличивающего транскрипцию гена MAST. Транскрипционные факторы, усиливающие или способные к усилению транскрипции генов MAST, включают ССАТ/энхансер-связывающий белок (сокращенно СЕВР-бета), поскольку авторы настоящего изобретения обнаружили, что ген MAST4 включает сайт связывания транскрипционного фактора СЕВР-бета. Альтернативно вещества, модулирующие связывание СЕВР-бета с MAST4, могут активировать или подавлять уровень транскрипции MAST4.

СЕВР-бета доступен из коммерческих источников, либо в виде очищенного белка, либо в виде последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид, например, из Genscript, Cloud-Clone и OriGene. В равной степени специфичные к СЕВР-бета антитела доступны из коммерческих источников, таких как AbCam. Известные белки-агонисты/гены агонисты СЕВР-бета включают INS, EGR2, CDK2, GSK3B, MARK3, ABL1, ABL2 и MARK1. И наоборот, известные антагонисты гены/белки СЕВР-бета включают: GATA3, SOX9, GATA2, SMAD3 и SMAD4.

Соответственно, существует множество веществ, коммерчески доступных или легко получаемых, которые можно применять для активации или подавления экспрессии СЕВР-бета и/или для ингибирования взаимодействия белка с геном MAST4. В частности, антитела (или антигенсвязывающие участки

антител), специфичные к СЕВР-бета, могут ингибировать связывание белка последовательности MAST4.

Авторы изобретения также выявили (путем проверки Открытой базы данных аннотаций регуляторов, также известной как "ORegAnno"), что выявлен другой предсказанный сайт связывания транскрипционного фактора в области гена MAST4, имеющий особое значение. Это транскрипционный фактор SMARCA4 (OReg ID 1274278), также известный как BRG1. SMARCA4 является "модификатором хроматина" и стимулирует экспрессию генов, участвующих в восстановлении эпидермального барьера (Botchkarev, Journal of Invest. Dermatol. Symposium 2015, 17 [18-19]), а также в контроле ремоделирования ткани волосяного фолликула (Xiong et al., Developmental Cell 2013, 25, 169-181). Таким образом, наличие сайта связывания этого транскрипционного фактора подтверждает роль MAST4 в сохранении целостности эпидермиса, которая, как можно предсказать, ассоциирована с чувствительностью к кожному воспалению.

Таким образом, альтернативно или в дополнение к модуляции взаимодействия между СЕВР-бета и MAST4, можно модулировать экспрессию MAST4 путем регулирования взаимодействия между SMARCA4 и геном MAST. Существуют коммерческие источники белка/нуклеиновой кислоты SMARCA4, а также специфичных к SMARCA4 антител, как и для СЕВР-бета. Известные агонисты SMARCA4 включают MYOD1 и MYOG. Известные антагонисты включают PFI3, который является мощным и селективным ингибитором SMARCA4 со значением K_d 89 нМ (Vangamudi et al., Cancer Res. 2015, pii: canres.3798.2015).

В соответствии со вторым аспектом изобретения предложен способ анализа *in vitro* для выявления веществ, обладающих потенциальной эффективностью для лечения и/или предотвращения воспалительного состояния кожи у субъекта-человека, причем способ анализа включает следующие стадии:

приведение в контакт по отдельности множества веществ-кандидатов с геном MAST4 или продуктом гена MAST4 и

выявление тех веществ-кандидатов, которые оказывают подавляющее действие на активность гена MAST4 или продукта гена MAST4.

Вещества-кандидаты могут оказывать прямое или косвенное модулирующее действие на активность гена MAST4 или продукта гена MAST4. В контексте настоящего изобретения моделирующее действие представляет собой подавление. В альтернативном варианте моделирующее действие может представлять собой активацию.

Анализ может включать систему экспрессии *in vitro* для экспрессии гена MAST. В общем случае подходящие системы экспрессии *in vitro* коммерчески доступны и известны специалистам в данной области техники.

Величину активности гена MAST4 или продукта гена MAST4 можно напрямую измерить или вывести любым подходящим способом. Например, существуют многочисленные подходы для определения уровня экспрессии гена, они включают, например, применение сцепленного маркера или репортерного гена, в частности способы оценки на основе люциферазы, флуоресцентного белка (например, GFP) или хлорамфениколацетилтрансферазы (CAT).

Способы анализа количества или активности полипептида MAST включают способы оценки киназной активности полипептида MAST. В общем случае подходящие методы анализа киназы, которые можно применять в этом аспекте изобретения, включают:

(a) измерение продукции АДФ из АТФ в системе, экспрессирующей или содержащей киназу-мишень (например, MAST4). Ее можно оценить с помощью ряда прямых и косвенных репортеров, таких как радиоизотопные метки, флуоресцентные антитела, люминисцентные антитела, например тест-системы Promega ADP-Glo™ Kinase Assay, ADP-Glo™ Kinase Assay ADP-Glo™, в которых АДФ, образующийся в результате киназной реакции, преобразуется в свет люциферазой;

(b) обнаружение фосфосерина в пептидных субстратах после реакции с экспрессированной киназой-мишенью. Для обнаружения можно применять антитела, соединенные с репортерной системой, такой как β -галактозидаза в тест-системе GE LifeSciences Discover-RX, или антитело, соединенное с флуоресцентным репортером с помощью TR-FRET (как на платформе Thermofisher LanthaScreen);

(c) применение модифицированных субстратных пептидов, специфичных к киназе-мишени, соединенной с репортерной системой; а также

(d) анализ клеточного пути метаболизма, например клеточные линии Thermofisher CellSenor®, которые устойчиво разработаны для экспрессии бета-лактамазного репортера под контролем специфичных к пути метаболизма ответных элементов.

Подробный обзор подходов к анализу киназы представлен в табл. 1 в работе Assay Development for Protein Kinase Enzymes by J. Fraser Glickman, M.S.P.H., PhD. Rockefeller University, New York, NY, 10065.

Вещества-кандидаты можно удобным образом исследовать параллельно с положительным контролем, с использованием соединения, как известно, обладающего активностью в отношении модуляции активности гена MAST4 или продукта гена MAST4 (например, специфичного к полипептиду MAST иммуноглобулина; или ингибитора с небольшой молекулой, такого как 4-хлоримидазо[1,2- α]хиноксалин): предпочтительно вещества-кандидаты являются по меньшей мере настолько же эффективными, как и

положительный контроль, при модуляции активности гена MAST или продукта гена MAST, более предпочтительно соединения-кандидаты являются на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90% или даже до 100% более эффективными (при эквивалентной молярной концентрации), чем положительный контроль, при модуляции активности гена MAST или продукта гена MAST.

В соответствии с третьим аспектом изобретения предложено применение продукта гена MAST4 или молекулы нуклеиновой кислоты, экспрессирующей продукт гена MAST4, в скрининговом исследовании для выявления веществ, которые модулируют активность продукта гена MAST4 или молекулы нуклеиновой кислоты, экспрессирующей продукт гена MAST4, и, таким образом, для выявления веществ, которые могут быть подходящими для лечения и/или предотвращения воспалительного состояния кожи у субъекта-человека. В контексте настоящего изобретения модулирующее действие представляет собой подавление. В альтернативном варианте модулирующее действие может представлять собой активацию.

Изобретение может также обеспечить способ изготовления профилактического и/или терапевтического состава для предотвращения и/или лечения при необходимости воспалительного состояния кожи у субъекта-человека, причем способ включает смешивание активных веществ, эффективных при модуляции активности гена MAST4 или продукта гена MAST4 с подходящим разбавителем, вспомогательным веществом или носителем, причем активное вещество выявляют с помощью способа анализа согласно второму аспекту изобретения.

Активное вещество в различных аспектах изобретения может представлять собой сложную смесь (например, натуральный растительный экстракт или тому подобное) или, по существу, очищенное или выделенное соединение. Далее, активное вещество может содержать одно активное соединение или множество активных соединений, которые могут действовать аддитивно или, более предпочтительно, синергетически при модулировании активности гена MAST или продукта гена.

Предпочтительно состав будет содержать одно или более дополнительных активных соединений, которые могут удобным образом содержать известные противовоспалительные соединения, в частности противовоспалительные соединения, известные и одобренные для наружного нанесения. Такие соединения включают кортикостероиды, как описано ниже.

Специалист в данной области техники может установить подходящую дозу активного соединения или соединений и, следовательно, подходящую концентрацию в составе с помощью рутинного метода проб и ошибок, и это не составляет изобретательскую часть настоящего изобретения.

Механизмы доставки.

Механизм доставки активного агента для активации или подавления активности гена MAST, или продукта его транскрипции или трансляции может представлять собой любой механизм, который обеспечивает доставку эффективной дозы активного агента, избегая при этом значимых нежелательных побочных эффектов. В настоящих целях эффективная доза активного агента представляет собой дозу, которая вызывает заметное улучшение состояния при воспалительном заболевании кожи (в частности, СД), для терапевтического действия, или которая предотвращает развитие воспалительного заболевания кожи (в частности, СД), для профилактического действия.

Активный агент можно доставлять перорально или с помощью инъекции (предпочтительно подкожно или менее предпочтительно внутримышечно). Однако наиболее предпочтительно активный агент доставляют с помощью наружного нанесения на кожу субъекта, которая может удобным образом представлять собой область кожи, пораженную воспалительным заболеванием кожи в активном состоянии у субъекта, и/или участок кожи, который чувствителен к воспалительному заболеванию кожи, если у субъекта отсутствуют симптомы при нанесении состава. Например, если заболевание представляет собой СД, активный агент можно наносить наружно на одно или более из кожи головы, лица или груди, но в равной степени можно наносить на другие области кожи, если такие другие области также поражены.

Если активный агент наносят наружно, то желательно, чтобы состав, в котором присутствует активный агент, дополнительно включал бы усилитель проницаемости.

Примеры химических усилителей проницаемости включают усилитель чрескожной абсорбции, такой как изопропилмиристат, поверхностно-активное вещество, спирт или тому подобное, включая C₆-C₂₀ жирные кислоты, жирные спирты, сложные эфиры, амиды и простые эфиры жирных кислот, простые или сложные эфиры ароматических жирных кислот (которые могут быть насыщенными или ненасыщенными, или могут быть циклическими, линейными или разветвленными), в частности сложные эфиры молочной кислоты, сложные эфиры уксусной кислоты, монотерпеновые соединения, сесквитерпеновые соединения, азосоединения, производные азосоединений, 1-(2-децилсульфанилэтил)пирролидин-2-он (pirotiodesecane), сложные эфиры глицерина и жирной кислоты, сложные эфиры пропиленгликоля и жирной кислоты, сложные эфиры сорбита и жирной кислоты (вида спаны), полисорбаты (вида Tween®), сложные эфиры полиэтиленгликоля и жирной кислоты, этоксилированное касторовое масло (вида HCO), алкиловые эфиры полиоксиэтилена, сложные эфиры сахарозы и жирной кислоты, растительные масла и тому подобное. Частные примеры включают каприловую кислоту, каприновую кислоту, капроновую кислоту, лауриновую кислоту, миристиновую кислоту, пальмитиновую кислоту, стеариновую кислоту, изостеариновую кислоту, олеиновую кислоту, линолевую кислоту, линоленовую кислоту, лауриловый спирт, миристиловый спирт, олеиловый спирт, изостеариловый спирт, цетиловый спирт, метиллаурат,

гексиллаурат, диэтилсебагинат, диэтаноламид лауриновой кислоты, триэтаноламин, изопропилмиристат, миристилмиристат, октилдецилмиристат, цетилпальмитат, салициловую кислоту, метилсалицилат, этиленгликольсалицилат, коричную кислоту, метилциннамат, крезол, цетиллактат, лауриллактат, этилацетат, пропилацетат, гераниол, тимол, эвгенол, терпинеол, 1-ментол, борнеол, d-лимонен, изовэгнол, изоборнеол, нерол, dl-камфора, глицерилмонокаприлат, глицерилмонокапринат, глицерилмонолаурат, глицерилмоноолеат, сорбитанмонолаурат, сахарозы монолаурат, полисорбат 20, пропиленгликоль, пропиленгликоля монолаурат, полиэтиленгликоля монолаурат, полиэтиленгликоля моностеарат, полиоксиэтиленовый эфир лаурилового спирта, 1-(2-децилсульфанилэтил)пирролидин-2-он (pyrothiodecane). Чрескожную абсорбцию также можно усилить использованием гидрогелевых носителей, микроэмульсий, наночастиц или твердых липидных наночастиц.

Механизмы доставки включают следующее: прямое нанесение на кожу жидкости (такой как шампунь и/или кондиционер), крема, геля, лосьона, пасты, пластыря или тому подобного, содержащего активный агент; нанесение на кожу состава, содержащего активный агент, включенный в липосомы, этосомы, трансферсомы или аналогичные синтетические везикулы, содержащие липидный бислой; нанесение на кожу состава, содержащего активный агент, загруженный в наночастицы, включенный в них или прикрепленный к ним. Способы получения липосом, этосом, трансферсом и т.п. хорошо известны специалистам в данной области техники. Трансферсома представляет собой особый вид липосом, сильно деформируемых вследствие включения поверхностно-активного вещества и/или другой амфифильной молекулы в билипидный слой. Этосома, в сущности, представляет собой липосому, содержащую относительно большое количество (обычно 20-45 мас.%) этанола. В настоящих целях термин "липидный бислой" включает двухслойные структуры, образованные из модифицированных липидов или содержащие их, такие как фосфолипиды, гликолипиды, фосфогликолипиды.

Механизмы, описанные выше, можно необязательно сочетать с применением химического усилителя проницаемости и/или физического усилителя проницаемости.

Физическое усиление проницаемости может включать одно или более из следующего: ионофорез, электропорацию, ультразвук или применение микроигл или другие методы дермабразии, которые можно применять до, и/или одновременно с, и/или после нанесения состава на кожу субъекта.

Наружную доставку кРНК достигают с использованием вирусных или невирусных способов, и комбинации невирусных способов со способом активного проникания, таким как ионофорез, сонофорез или микроиглы, для лечения воспалений кожи.

Zheng и др. 2012 (<http://www.pnas.org/content/109/30/11975.abstract>) описали применение конъюгатов сферических наночастиц нуклеиновой кислоты ("SNA-NC", ядра золота окружены плотной оболочкой высокоориентированной, ковалентно иммобилизованной кРНК), которые свободно проникают почти через 100% кератиноцитов *in vitro* кожи мыши, и эпидермиса человека в течение нескольких часов после нанесения. Примечательно, что эти структуры можно доставлять в коммерческом увлажняющем средстве или в физиологическом растворе с фосфатным буфером, и они не требуют разрушения барьера или трансфекционных агентов, таких как липосомы, пептиды или вирусы. В дополнение Chong и др. сообщают о выключении генов после доставки кРНК на кожу через стальные микроиглы с покрытием (Chong et al., 2013. *Journal of Controlled Release* 166 (3), pp. 211-219).

Кроме того, недавняя работа с доставкой компонентов Crispr/Cas9 позволяет предположить, что это может стать возможным подходом к доставке соответствующих молекул нуклеиновой кислоты, которые могут прямо или косвенно модулировать активность гена MAST.

Составы.

Осуществление изобретения обычно включает введение одного или более активных агентов (т.е. активных для активирования или подавления активности гена MAST, или продукта транскрипции или трансляции гена MAST) в сочетании с наполнителем, разбавителем, вспомогательным веществом, носителем или тому подобным.

Подходящие разбавители, вспомогательные вещества и носители известны специалистам в данной области техники и включают, среди прочего, водные растворы (такие как физиологический раствор, фосфатно-солевой буфер или другие буферные составы), эмульсии, масла и т.д.

Точная композиция состава будет зависеть, среди прочего, от способа его нанесения. Удобным образом состав может быть адаптирован под наружное нанесение на кожу человека или выполнен с его возможностью, и иметь форму, среди прочего, крема, лосьона, пасты, геля или пластыря, в частности самоклеящегося и/или герметичного пластыря. В некоторых вариантах реализации состав может представлять собой состав шампуня и/или кондиционера, который можно смыть или оставить на волосах. Составы шампуней и/или кондиционеров известны специалистам в данной области техники и обычно включают одно или более из следующего: воду, детергент, поверхностно-активное вещество, загуститель, бетаин, увлажнитель, отдушку или ароматизатор, и краситель или пигмент.

В общем случае предпочтительно, чтобы состав дополнительно содержал один или более известных, обычно используемых противовоспалительных агентов, в частности противовоспалительный агент, известный и одобренный для наружного применения. Большинство таких соединений являются кортикостероидами. Некортикостероидные противовоспалительные агенты включают препараты дегтя. Проти-

воспалительные кортикостероиды включают бетаметазона дипропионат, клобетазола пропионат, дифлоразона диацетат, галобетазола пропионат, амцинонид, дезоксиметазон, флуоцинонид, галцинонид, метазона фураат, флутиказона пропионат, триамцинолона ацетонид, флуоцинолона ацетонид, флурандренолид, бетаметазона валерат, десонид, гидрокортизон, гидрокортизона бутират, гидрокортизона валерат, гидрокортизона ацетат и прамоксина гидрохлорид.

Далее изобретение будет описано с помощью иллюстративного примера и со ссылкой на прилагаемые чертежи, на которых:

на фиг. 1 показана последовательность нуклеотидов части гена MAST4 человека вблизи однонуклеотидного полиморфизма, выявленного авторами изобретения как ассоциированного с предрасположенностью к себорейному дерматиту;

на фиг. 2 показана общая химическая структура хиноксалина и его производных;

фиг. 3 иллюстрирует структуру некоторых производных хиноксалина, которые являются предпочтительными для применения в настоящем изобретении.

Примеры

Пример 1. Исследование ассоциаций генов-кандидатов (CGAS) и полногеномное исследование ассоциаций (GWAS).

В этом примере авторы изобретения провели исследование ассоциаций генов-кандидатов (CGAS), чтобы выяснить, ассоциированы ли генетические варианты, ранее ассоциированные с АД и ПСО, также с повышенным риском развития СД, и провели первое полногеномное исследование ассоциаций (GWAS) для выявления новых генетических вариантов, ассоциированных с СД.

Способы.

Исследуемая популяция.

Роттердамское исследование (РИ) - это продолжающееся проспективное исследование когорты хронических заболеваний, включая кожные заболевания, у пожилых людей. Подробное описание исследования можно найти в источниках (Hofman et al. The Rotterdam Study: 2016 objectives and design update. Eur J Epidemiol. 2015; 30(8):661-708). Вкратце, Роттердамское исследование состоит из основной когорты (РИ-I) и двух расширений (РИ-II и РИ-III). РИ-I началось в 1990 г. и первоначально насчитывало 7983 участника, проживающих в районе Оммурд в Роттердаме, Нидерланды. РИ-II началось в 2000 г. и включает 3011 участников. РИ-III является дальнейшим расширением когорты, начатой в 2006 г., и включает в себя 3932 участника. Всего Роттердамское исследование состоит из 14926 субъектов в возрасте от 45 лет и старше. Когорта состоит преимущественно (90%) из участников североευропейского происхождения.

Роттердамское исследование было одобрено Медицинским этическим комитетом Медицинского центра Университета Эразмус и Министерством здравоохранения, социального обеспечения и спорта Нидерландов. Все участники дали письменное информированное согласие на участие в исследовании и получение информации от своих лечащих врачей.

Определение случая.

В общей сложности 4454 участника Роттердамского исследования с доступными данными по генотипу прошли обследование кожи всего тела (ОКВТ) специально обученными врачами для оценки наличия у участника СД. Клинический диагноз основывался на наличии жирных чешуек, эритемы и характерного распределения кожи головы, лица и/или груди. Участники, у которых не было никаких признаков активного заболевания, и отсутствовала история применения кетоконазола в анамнезе (≥ 3 рецепта с использованием данных аптечной связи), были включены в качестве контрольной группы.

Выбор локуса кандидатов.

В PubMed был проведен поиск мощных европейских GWAS, которые показали ассоциацию между однонуклеотидным полиморфизмом (ОНП) и ПСО или АД. Авторы изобретения выбрали ОНП с уровнем значимости $< 5,0 \times 10^{-8}$. Представленный (основной) ОНП применяли для анализа основанной на ОНП ассоциации и для выбора области локуса для генного исследования ассоциаций с генами-кандидатами.

Для основных ОНП, расположенных внутри гена, была добавлена область 30 т.п.н. (плюс 15 т.п.н. ниже и 15 т.п.н. выше от гена), чтобы включить регуляторные элементы, близкие к гену. Если основной ОНП был межгенным и располагался на расстоянии более 15 т.п.н. от гена, авторы изобретения также добавляли 15 т.п.н. ниже и 15 т.п.н. выше от позиции пары оснований основного ОНП. Ресурс NCBI Variation Viewer (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/variation/view/>) с версией CRCh37 применяли для восстановления геномных координат генов. Эти координаты применяли для восстановления ОНП в соответствующих областях когорт Роттердамского исследования.

Генотипирование и импутация.

Экстракцию ДНК из цельной крови, генотипирование, импутацию и контроль качества проводили в соответствии со стандартными протоколами, как описано ранее (Hofman et al. Eur J Epidemiol. 2015; 30(8):661-708; Verkouteren et al., J Invest Dermatol. 2015; 135(8):2135-8). Для генотипирования когорт РИ-I и РИ-II применяли иммуночипы Illumina Infinium II HumanMap550 BeadChips, тогда как для генотипирования когорты РИ-III применяли иммуночипы Illumina Human610-Quad BeadChips.

Контроль качества однонуклеотидного полиморфизма (ОНП) включал удаление ОНП с отклонениями от равновесия Харди-Вайнберга (p -значение $<5 \times 10^{-6}$), частоту вызовов генотипа $<97\%$, несоответствие пола и высокую среднюю аутосомную гетерозиготность. Родственников первой степени удаляли, а ОНП отфильтровывали, если они имели частоту минорных аллелей менее 1% или качество импутации (Rsq) менее $0,3$.

Исследование гена-кандидата.

Исследование ассоциаций генов-кандидатов (CGAS) проводили в два этапа. Во-первых, было проведено основанное на ОНП исследование ассоциации ранее ассоциированных с ПСО и АД ОНП, а во-вторых, был проведен генный анализ ассоциации для скрининга дополнительных вариантов в интересующих областях.

Основанное на ОНП CGAS для СД-случаев и контрольной группы проводили с использованием замещенных данных дозы каждой когорты Роттердамского исследования с использованием логистической регрессии с аддитивной моделью. Выход по ОНП для каждой когорты Роттердамского исследования подвергали мета-анализу с использованием p -значений, выведенных из теста отношения правдоподобия, в качестве сводной статистики (Wilier et al., METAL: fast and efficient meta-analysis of genomewide association scans).

Bioinformatics. 2010; 26(17):2190-1; Aulchenko et al., ProbABEL package for genome-wide association analysis of imputed data. BMC Bioinformatics. 2010; 11:134).

Наиболее точно предугаданные генотипы применяли в генных CGAS. Генотипы трех когорт Роттердамского исследования оценивали по замещенным данным доз с использованием программного обеспечения GCTA с параметрами по умолчанию (Yang et al., Am J Hum Genet. 2011; 88(1):76-82).

Генную логистическую регрессию проводили с использованием теста на основе множества, реализованного в программе PLINK v.1.90 (параметры: p -значение = $0,05$, максимальное количество ОНП = 15 , $r^2 = 0,5$, пермутации = 10000) (Purcell et al. PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. Am J Hum Genet. 2007; 81(3):559-75). Основанные на ОНП ассоциации и генные ассоциации корректировали с учетом возраста, пола и четырех главных компонентов (ГК).

Полногеномное исследование ассоциации.

Исследование GWAS СД-случаев и контрольной группы проводили с использованием замещенных данных дозы каждой когорты Роттердамского исследования с использованием логистической регрессии с аддитивной моделью. Модель скорректировали с учетом возраста, пола и четырех ГК. Анализы GWAS реализованы в пакете ProbABEL (Aulchenko et al., процитированное выше). Фактор инфляции λ был оценен близко к $1,0$ и в дальнейшем не рассматривался.

Затем сводные статистические данные GWAS по когорте Роттердамского исследования подвергали мета-анализу с использованием p -значений, выведенных из теста отношения правдоподобия. Мета-анализ проводили с использованием METAL (Wilier et al., процитировано ранее). Порог для p -значения значимости полного генома устанавливали на p -значение $\leq 5 \times 10^{-8}$.

Результаты.

Исследуемая популяция.

4050 из 4454 участников были включены в CGAS и GWAS по СД. Из них у 609 (15%) во время ОКВТ врачом-исследователем было диагностировано наличие СД. Мужчины чаще имели СД, чем женщины ($60,4\%$ случаев против $41,8\%$ контрольной группы были мужчины; p -значение $<0,001$) и пациенты с СД были старше по сравнению с пациентами без СД ($68,94$ против $67,97$, p -значение: $0,018$). У пациентов с СД чаще диагностировали псориаз, чем в контрольной группе ($4,8\%$ против $3,0\%$; $p = 0,035$).

Подход генов-кандидатов.

CGAS не дал какого-либо значимого локуса для СД после корректировки для множественного исследования.

Полногеномное исследование ассоциации.

Чтобы обнаружить новые локусы для СД, авторы изобретения выполнили GWAS для случаев СД против контрольной группы и более 7 млн локусов, и обнаружили две значимые полногеномные ассоциации (табл. 1). Наиболее значимым ОНП стал rs58331610, картированный в интронной области гена MAST4 в хромосоме 5 (p -значение: $1,75 \times 10^{-8}$). Второе место занял ОНП rs16944244, картированный в межгенной области в хромосоме 17p12, между генами PIRT и SHISA6 (p -значение: $2,10 \times 10^{-8}$). В дополнение было обнаружено, что 68 ОНП в семи различных локусах значимо ассоциированы с СД с внушительными полногеномными ассоциациями (p -значение $<5 \times 10^{-6}$) в этой относительно небольшой выборке СД-пациентов. Несколько ОНП картированы в белок-кодирующих генах, включая GRM3 (rs6978155, $5,24 \times 10^{-7}$), KIAA1324L (rs73382367, $6,51 \times 10^{-7}$) и SENP2 (rs13081203, $3,64 \times 10^{-6}$), тогда как другие были межгенными. Прежде ни один из этих локусов не был ассоциирован с ПСО или АД.

Таблица 1

Ген	ОНП	Хромосома	Локализация	Аллель		Частота	Р-значение
MAST4	rs58331610	5	66020457	a	g	0,8615	$1,75 \times 10^{-8*}$
Межгенный	rs16944244	17	11026693	c	g	0,9796	$2,10 \times 10^{-8*}$
Межгенный	rs78160483	17	11026297	t	g	0,9818	$8,38 \times 10^{-8}$
Межгенный	rs16944241	17	11026414	a	g	0,9818	$8,38 \times 10^{-8}$
Межгенный	rs6546997	2	75658780	t	c	0,1894	$9,53 \times 10^{-8}$
Межгенный	rs8075550	17	11027059	a	g	0,9594	$1,04 \times 10^{-7}$
Межгенный	rs11870758	17	11015902	a	t	0,9722	$1,21 \times 10^{-7}$
MAST4	rs12188593	5	66030069	t	c	0,1359	$1,27 \times 10^{-7}$
Межгенный	rs182131544	17	11023964	a	g	0,9788	$1,32 \times 10^{-7}$
Межгенный	rs111448323	17	11022815	a	g	0,9786	$1,50 \times 10^{-7}$
Межгенный	rs4791451	17	11027570	c	g	0,9808	$1,54 \times 10^{-7}$
Межгенный	rs77699632	17	11020937	a	t	0,0214	$1,73 \times 10^{-7}$
Межгенный	rs111341744	17	11021220	a	g	0,9784	$1,79 \times 10^{-7}$
Межгенный	rs75205996	17	11021311	t	c	0,9784	$1,79 \times 10^{-7}$
Межгенный	rs58692658	17	11019423	t	c	0,022	$2,32 \times 10^{-7}$
Межгенный	rs77592872	17	11018841	a	t	0,9781	$2,34 \times 10^{-7}$
Межгенный	rs138424360	17	11018089	a	g	0,0219	$2,37 \times 10^{-7}$
Межгенный	rs80298958	17	11016351	c	g	0,9784	$3,39 \times 10^{-7}$
Межгенный	rs76730906	17	11019589	t	g	0,9754	$3,85 \times 10^{-7}$
GRM3	rs6978155	7	86477894	a	t	0,0543	$5,24 \times 10^{-7}$
GRM3	rs6957842	7	86477870	a	t	0,9457	$5,28 \times 10^{-7}$
GRM3	7:86475369:1	7	86475369	d	i	0,9459	$5,63 \times 10^{-7}$
GRM3	rs6960053	7	86473063	a	g	0,0541	$5,68 \times 10^{-7}$
GRM3	rs6974507	7	86472032	t	g	0,9459	$5,75 \times 10^{-7}$
GRM3	rs7801589	7	86470943	t	c	0,9459	$5,76 \times 10^{-7}$
GRM3	rs6465087	7	86470488	t	c	0,9459	$5,78 \times 10^{-7}$
GRM3	rs6954573	7	86472161	a	t	0,9455	$5,86 \times 10^{-7}$
KIAA1324L	rs73382367	7	86525065	a	g	0,9436	$6,51 \times 10^{-7}$
KIAA1324L	rs6465089	7	86564795	t	c	0,0563	$7,17 \times 10^{-7}$
GRM3	7:86478749:1	7	86478749	d	i	0,9453	$7,44 \times 10^{-7}$
GRM3	rs6947778	7	86476124	c	g	0,0545	$8,11 \times 10^{-7}$
GRM3	rs6967992	7	86476311	t	c	0,9455	$8,11 \times 10^{-7}$
GRM3	rs6955565	7	86472484	a	g	0,0545	$8,12 \times 10^{-7}$
GRM3	rs6955452	7	86472584	c	g	0,9455	$8,15 \times 10^{-7}$
GRM3	rs6955917	7	86472763	a	g	0,0545	$8,15 \times 10^{-7}$
KIAA1324L	rs6958716	7	86594383	t	c	0,943	$1,18 \times 10^{-7}$

* Статистически значимо.

Обсуждение.

В этом исследовании авторы изобретения не обнаружили статистически значимых ассоциаций между ранее ассоциированными с ПСО/АД ОНП и СД. Однако в GWAS для СД были обнаружены два ОНП со значимыми полногеномными ассоциациями. В дополнение в других генах были обнаружены внушительные полногеномные ассоциации, которые могут быть релевантными к патогенезу СД, что следует подтвердить в других когортах.

В пилотном GWAS для СД несколько ОНП были значимо ассоциированы (p -значение $\leq 5,0 \times 10^{-8}$) с СД, включая варианты, расположенные в гене MAST4. MAST4 относится к группе протеинкиназ (ПК), которая играет ключевую роль во внутриклеточных каскадах передачи сигнала. Точная функция MAST4 неизвестна, но ген экспрессируется в разных клетках кожи (Garza et al. J Clin Invest. 2011; 121 (2):613-22). Только в 12 млн п.н. выше от MAST4 находится ген CD180, который прямо взаимодействует с сигнальным комплексом TLR4 (Divanovic et al. Nat Immunol. 2005; 6(6):571-8). TLR4 играет важную роль в наследственном иммунитете кожи. Исследования экспрессии показали нарушение экспрессии TLR4 при АД, ПСО и контактном кожном дерматите, пониженную экспрессию TLR4 также обнаружили при лечении СД глюконатом лития (Elewa et al., J Dermatol. 2015; 52 (5): 467-76; Ballanger et al., Arch Dermatol Res. 2008; 300(5):215-23). Также известно, что MAST3, паралог MAST4, влияет на TLR4 (Labbe et al. Genes Immun. 2008; 9(7):602-12).

Ген MAST4 ранее не ассоциировали с какими-либо кожными заболеваниями, такими как ПСО или АД.

ОНП rs58331610 картируется в 9,6 т.п.н. области хромосомы 5 в первом интроне гена MAST4. Последовательность нуклеотидов геномной ДНК непосредственно вокруг ОНП показана на фиг. 1. На этом чертеже локализация полиморфизма обозначена как R (пурин, то есть А или G).

На момент написания заявки наиболее поздняя сборка генома человека (GRCh 38/hg 38) предлагает следующие координаты для последовательности, показанной на фиг. 1: chr5: от 66724129 до 66725129 (1001 п.н.). Эта область генома расположена в гене MAST4, интрон 1 (который имеет координаты от 66597019 до 66759708).

Частота аллеля G в Роттердамской исследовательской группе (которая в основном имеет европеоидное происхождение) составляет 0,139. Согласно результатам полногеномного исследования ассоциаций, аллель G ассоциируется с "защитой" от развития себорейного дерматита.

Интересно, что данные из проекта "1000 геномов" показывают, что частота этого защитного "аллеля G" rs58331610 существенно изменяется между различными наследственными группами по всему земному шару, варьируясь от <10% в некоторых африканских группах до 50% в некоторых восточноазиатских и центрально- и южноамериканских наследственных популяциях.

ОНП строго ассоциирован с СД, поэтому возможно, что уровни экспрессии гена MAST4 ассоциированы с предрасположенностью к развитию состояния. Отсюда следует, что модулирование активности гена MAST4, как вверх, так и вниз, может оказывать благоприятное действие на предотвращение и/или лечение заболевания.

При этом существует три других гена MAST, известные у людей (MAST 1, 2 и 3), каждый из которых экспрессируется в коже. Возможно, активирование или подавление одного или более из MAST 1-3 может также оказывать благоприятное действие на предотвращение и/или лечение СД. Однако MAST4, по-видимому, является геном MAST, который наиболее высоко экспрессируется в коже человека, и поэтому является основным кандидатом для профилактического и/или терапевтического вмешательства при СД.

С использованием инструмента MAPPER (<http://genome.ufl.edu/mapper>) авторы изобретения нашли доказательства того, что ОНП rs58331610 присутствует в предсказанном сайте связывания транскрипционного фактора C/EBP β .

Активность C/EBP- β важна в регуляции генов, вовлеченных в иммунные и воспалительные ответы. Транскрипционный фактор C/EBP- β регулирует IL-17-реактивные гены, и экспрессируется преимущественно в дифференцированных кератиноцитах. Экспрессия C/EBP- β активируется в псориазической по сравнению со здоровой кожей. Сайты связывания C/EBP- β , в частности, обнаружены в регуляторных последовательностях генов, которые ассоциированы с воспалительным ответом (<http://europepmc.org/backend/ptpmcrender.fcgi?accid=PMC4324884&blobtype=pdf>). C/EBP- β впервые был выявлен на основании его способности регулировать транскрипцию генов в ответ на IL-1 и IL-6 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1222736/pdf/12006103.pdf>).

Альтернативные названия включают NF-IL6, TCF5, IL-6DBP, LAP, CRP2, NF-M, AGP/EBP, ApC/EBP.

Соответственно, одна гипотеза состоит в том, что генетическая вариативность в локусе ОНП может влиять на сайт связывания C/EBP- β и изменять аффинность связывания с транскрипционным фактором и, следовательно, модулировать транскрипцию и экспрессию гена MAST.

Пример 2. Демонстрация того, что MAST4-киназа необходима для воспалительного ответа на микробную стимуляцию, и что ингибирование MAST4-киназы может понижать воспалительный ответ в нормальных эпидермальных кератиноцитах человека.

Способ.

Нормальные эпидермальные кератиноциты человека высевали по 40000 клеток на лунку в 24-луночные планшеты и выращивали в течение 16 ч в среде (среда EpiLife® MEP1500CA) + добавка для роста человеческого кератиноцита HKGS (S-001-5) при 37°C, 5% CO₂. Клетки трансфицировали с использованием липофектамина RNAiMAX с 20 нМ либо стерически стабилизированных кнРНК, специфичных к MAST4 мишени (ThermoFisher HSS180104), либо контрольной кнРНК, специфичной к среде GC. Через 48 ч среду удаляли и клетки стимулировали 10 мкг/мл пептидогликана из *Staphylococcus aureus* (Sigma 77140) в течение 24 ч. Среду отбирали из клеток для анализа и суммарную РНК экстрагировали из каждого образца клеток с использованием оборудования Qiagen.

Мини-набор RNeasy и количественно определяли на спектрофотометре NanoDrop. Экспрессию гена MAST4 измеряли с использованием стандартных условий анализа экспрессии гена и количественного определения экспрессии TaqMan® Hs00389519_m1. Дубликаты 100 мкл образцов из каждой экспериментальной лунки анализировали на IL8 с использованием ИФА с двумя планшетами на IL8 от R&D systems.

В приведенной ниже табл. 2 показана относительная количественная оценка (ОК) экспрессии гена MAST4 в образцах клеток по сравнению с контрольным носителем, нормализованная к экспрессии гена "домашнего хозяйства" (актина). кнРНК-нокдаун MAST4 успешно снижал уровни транскриптов MAST4 на >80%.

Стимуляция пептидогликаном индуцировала экспрессию транскрипта MAST4, увеличивая ее на >25% в клетках, трансфицированных контрольной кнРНК. Это демонстрирует, что экспрессия гена MAST4 индуцируется пептидогликаном, который является компонентом бактериальной клеточной стенки, что подтверждает роль MAST4 в воспалительном иммунном ответе эпидермальных кератиноцитов (Wang et al. 2001 Infect. Immun. 69 (4), 2270-2276). Пептидогликан известен как активатор toll-подобного рецептора 2 (TLR2) (Dziarski and Gupta 2005 Infect. Immun. 73 (8), 5212-5216), поэтому эти данные подтверждают роль MAST4 в передаче сигналов, опосредованной TLR2, в нормальных эпидермальных кератиноцитах человека.

Таблица 2

киРНК	Обработка	Относительное количественная оценка экспрессии MAST4	IL-8 (пг/мл)	Индукция IL-8 пептидогликаном (пг/мл)
Контроль	Носитель	1	26,73+/-9,33	нет
MAST4	Носитель	0,166	32,94+/-10,96	нет
Контроль	Пептидогликан	1,257	245,94+/-49,86	219,21
MAST4	Пептидогликан	0,18	175,30+/-24,16	142,36

В табл. 2 также показано получение воспалительного цитокина IL-8 в ответ на стимуляцию пептидогликаном в различных клеточных популяциях. Для контрольных, трансфицированных киРНК, кератиноцитов стимуляция пептидогликаном приводила в результате к >9-кратному увеличению выделения IL-8. Напротив, клетки, трансфицированные дуплексом MAST4-киназа и киРНК, показали более скромное 5-кратное индуцирование IL-8 в ответ на стимуляцию пептидогликаном. Эти данные показывают, что 80% нокдаун MAST4 на уровне экспрессии гена сопровождается 35% снижением на функциональном уровне, в IL-8 ответе на стимуляцию пептидогликаном. Эти данные подтверждают ключевую роль MAST4 в передаче сигналов воспаления эпидермальных кератиноцитов в ответ на TLR2 агонист, и впервые демонстрируют, что ингибирование MAST4-киназы может понижать воспалительный ответ на микробную стимуляцию в *in vitro* эпидермальной модели воспаления кожи.

Пример 3. Эпигенетическое исследование.

В этом примере авторы изобретения провели полногеномное исследование метилирования ДНК в биопсиях кожи головы человека, взятых у здоровых добровольцев и добровольцев с перхотью, чтобы выяснить, существуют ли эпигенетические различия, ассоциированные с перхотью.

Субъекты.

Субъектами были женщины, жители Великобритании северо-европейского происхождения (белой европеоидной расы), в возрасте от 23 до 37 лет. В качестве страдающих перхотью выбирали лиц, которые в настоящий момент пользовались средствами против перхоти, и которые сообщили, что имели перхоть в течение, по меньшей мере, двух лет, а также имели признаки перхоти при визуальной оценке (Harding et al., Arch Dermatol Res (2002) 294: 221-230) после 5 недель применения косметического шампуня против перхоти. В качестве здоровых субъектов выбирали тех, кто не пользовался в настоящий момент шампунем против перхоти, и кто не сообщал о наличии перхоти в течение 2 лет и не имел признаков перхоти после 5 недель применения обычного косметического шампуня.

Образцы и анализ.

4 мм биопсии кожи головы брали у здоровых (n=25) и страдающих перхотью (n=23) субъектов и быстро замораживали на сухом льду. ДНК экстрагировали с использованием стандартного способа с фенол-хлороформом (Molecular Cloning A laboratory manual, 3rd edition. Sambrook and Russell. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001). Метилирование ДНК измеряли вначале с использованием способа бисульфитной конверсии Zymo (количественное определение метилирования EPIC: www.illumina.com) с последующим детальным исследованием на основе чипа Infinium methylation EPIC BeadChip для 850000 количественных определений (Illumina). Статистический анализ данных чипа включал преобразование показателей бета в m-значения (Du et al., BMC Bioinformatics 2010, 11:587). Необработанные данные m-значений нормализовали с использованием квантильной нормализации, а для выявления зондов, которые представляли собой дифференциально метилированные области между страдающими перхотью и здоровыми контрольными субъектами, применяли линейные статистические модели. После статистической фильтрации показатели бета применяли для фильтрации 5-процентной разницы между страдающими перхотью и здоровыми контрольными субъектами.

Результаты.

Дифференциально метилированные сайты выявляли с помощью статистических срезов скорректированного с помощью ожидаемой доли ложного отклонения (FDR) p-значения <0,05 и дельта-бета>=5% (Du et al. 2010). На этом уровне 701 сайт метилирования оказались дифференциально метилированными при перхоти относительно здоровых образцов. Одним из этих дифференциально метилированных сайтов оказался cg13811092, расположенный в нуклеотиде 66010095 на хромосоме 5, а другой - cg03133881, расположенный в нуклеотиде 46467354 на хромосоме 1 в сборке человеческого генома GRCh37/hg37. Первый сайт расположен в интроне 1 гена MAST4 и значимо гипометилирован при перхоти по сравнению со здоровой кожей головы; этот сайт находится в области "открытого хроматина", близко к энхансерному элементу (так что, вероятно, существуют транскрипционные факторы, связывающиеся этим сайтом в коже головы) и 10 т.н.п. выше от rs58331610, генетического варианта, выявленного в полногеномном исследовании ассоциации себорейного дерматита. Второй CpG сайт значимо гипометилирован при перхоти по сравнению со здоровой кожей головы. Сайт расположен в интроне 6 гена MAST2, а также в области "открытого хроматина".

В литературе хорошо подтверждено документально, что гипометилирование в регуляторной области гена может ассоциироваться с измененной экспрессией гена и, как следствие, его функцией (Bonder et

al. Nat Genet. 2017 Jan; 49(1):131-138). Поэтому наличие дифференциально метилированных сайтов в генах MAST4 и MAST2 является убедительным доказательством того, что эти данные играют роль в этиологии перхоти, в частности, когда они совпадают с регуляторной областью, такой как сайт открытого хроматина.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Применение вещества, которое подавляет активность гена MAST4 при предотвращении и/или лечении воспалительного состояния кожи у субъекта-млекопитающего, причем указанное вещество представляет собой нуклеиновую кислоту и подавляет транскрипцию гена MAST4 и/или трансляцию транскрипта гена MAST4.

2. Применение по п.1, отличающееся тем, что состояние кожи включает перхоть.

3. Применение по пп.1 и 2, отличающееся тем, что вещество содержит молекулу короткой интерферирующей РНК, которая идентична по последовательности участку транскрипта гена MAST4.

4. Применение по п.3, отличающееся тем, что вещество содержит последовательность из от 20 до 30 нуклеотидов, идентичную участку транскрипта гена MAST4.

5. Состав для местного применения для предотвращения и/или лечения воспалительного состояния кожи у субъекта-человека, при этом состав содержит эффективное количество активного вещества, представляющего собой нуклеиновую кислоту и подавляющего транскрипцию гена MAST4 и/или трансляцию транскрипта гена MAST4, в смеси с дерматологически приемлемым наполнителем, разбавителем, носителем или вспомогательным веществом.

6. Состав по п.5, содержащий усилитель проницаемости кожи.

7. Состав по любому из пп.5 или 6 в форме жидкости, крема, геля, лосьона, пасты или пластыря.

8. Состав по любому из пп.5-7 в форме шампуня и/или кондиционера.

9. Способ анализа *in vitro* для выявления веществ, обладающих потенциальной эффективностью для лечения и/или предотвращения воспалительного состояния кожи у субъекта-человека, при этом способ анализа включает стадии приведения в контакт по отдельности множества веществ-кандидатов с геном MAST4 или продуктом гена MAST4 и выявления тех веществ-кандидатов, которые оказывают подавляющее действие на активность гена MAST4 или продукта гена MAST4.

10. Применение продукта гена MAST4 или молекулы нуклеиновой кислоты, экспрессирующей продукт гена MAST4, в скрининговом исследовании для выявления веществ, которые подавляют активность продукта гена MAST4 или молекулы нуклеиновой кислоты, экспрессирующей продукт гена MAST4, и, таким образом, для выявления веществ, которые могут быть подходящими для лечения и/или предотвращения воспалительного состояния кожи у субъекта-человека.

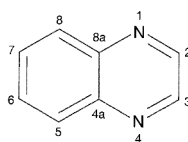
11. Способ по п.9 или применение по п.10, отличающиеся тем, что вещества исследуют параллельно с положительным контролем, который включает соединение, как известно обладающее активностью в отношении подавления активности гена MAST4 или продукта гена MAST4.

```

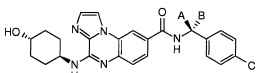
CCCACTTTAC CARGCAAGGT ATTAATTTTC TTCTAGCAG AGGAAAGAGC TCAGTTCAC
GTATTCCTCT TCTTTTACAC ACAGTTACAA CAACATTGA TTCGTGATAT TTAGTTGTA
GGTTGTTGAT TTAAAAATAC ACTTAGAAGG TGTGGAGCAC AGAGGAATAC AGGGCATGAT
TTTGTGTATT GACCTGTCAA CCTGGTTAA CTAGCATGTC ACAAAACAAG TTCTAATCTC
AAATACAGTA AATTATCCAG GTGGGATTCG GCCCACTGTG GATGAGTTAC GGAATTTGAT
TTGATGCTTT CTGGCCCTAG CTGTGTACAA GGGGAGTGTA TTATGTATT ATGAATGTG
AGACCTTTTC AATAGTATT ATGGTCATGT GTCACTCATG AATGGGATA TGTCTGAGA
AGCATGTGAT TAAGCAATTT TGTCAATTCG CAACATCAT GGAGTGTACT TCTACAACT
TAGATGGTGT AGCTTACTAC
R
TACCTAGGCT ATATGGTATA GCTATTGCT ACTGGGCTAC AAACCTGTAT AGCTTGTAC
TCTACTGAT ACTGCAAGCA GTGTACAC AATCATAGT ATTTTATAT CTAAATGTAT
CCAAACAGAG AALAGGTACA GCAAAAGAT GTATATATA TCTTTTAA TATAAATGA
TAATATATGT GGGCTGTGCT TGGTTGAAC ATTATACAGC ACTGACTGTA TCTAATGG
TCATAATTT TTACTTAAAG AATCTTACT AGTTGATGCG TTCAGAGATT AGGCTCCCTC
TATAGGCCAC AGCCATCCCT TTGTTCTTT TTGCATGTT TTTCTTTT GAGATGCTT
AATATTATA TTCTTTATT TTTCAGTAA TCTGCTTG TCTTAATGA AATATTATT
CAITTTAAG AATAGTGT GTTCTGGTC ATATGATTT TCTGTTTTT TAATTTTAA
ATTCTGCA ATTTTGTCA

```

Фиг. 1



Фиг. 2



Производное	A	B	C
23	Me	H	H
19	H	Me	H
24	Et	H	H
25	H	Et	H
26	CH ₂ OH	H	H
27	H	CH ₂ OH	H
28	H	CH ₂ CH ₂ CH ₃	H
29	H	iPr	H
30	H	Ph	H
31	H	CH ₂ CH ₂ OH	H
32	H	CH ₂ OCH ₃	H
33	Me	Me	H
34	Et	Et	H
35		CH ₂ CH ₂	H
36		CH ₂ CH ₂ CH ₂	H
37		CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂	H
38		CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂	H
39		CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂	H
40		CH ₂ CH ₂	Me
41		CH ₂ CH ₂	Cl
42		CH ₂ CH ₂	F

Фиг. 3

