

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202292483** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.01.02

(22) Дата подачи заявки
2021.04.22

(51) Int. Cl. *A61K 31/551* (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
A61P 11/00 (2006.01)
G01N 33/00 (2006.01)

**(54) ИНГИБИТОРЫ ROCK ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В ЛЕЧЕНИИ ИЛИ ПРЕДУПРЕЖДЕНИИ
ОТЕКА ЛЕГКИХ**

(31) **LU101746**

(32) **2020.04.22**

(33) **LU**

(86) **PCT/EP2021/060490**

(87) **WO 2021/214200 2021.10.28**

(71) Заявитель:
**АТРИВА ТЕРАПЬЮТИКС ГМБХ
(DE)**

(72) Изобретатель:

**Кузнецова Ирина, Херольд Сюзанн,
Цибур Йон, Плешка Стефан,
Петерандерль Кристин (DE)**

(74) Представитель:

**Поликарпов А.В., Соколова М.В.,
Путинцев А.И., Черкас Д.А., Игнатьев
А.В., Билык А.В., Дмитриев А.В.,
Бучака С.М., Бельтюкова М.В. (RU)**

(57) Изобретение относится к ингибитору ROCK для применения в лечении или предупреждении отека легких, ассоциированного с вирусной инфекцией. Настоящее изобретение, кроме того, касается применения системы анализа *in vitro* или определения эффективности ингибиторов в предупреждении или уменьшении апикальной локализации натрий-калиевой АТФазы (НКА) в эпителиальных клетках легкого. Также предложен способ выявления молекул, эффективных в профилактике и/или лечении отека легких. Наконец, данное изобретение относится к системе анализа.

A1

202292483

202292483

A1

PCT/EP2021/060490

МПК: A61K 31/551 (2006.01) A61P 11/00 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01) G01N 33/00 (2006.01)

**ИНГИБИТОРЫ ROCK ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В ЛЕЧЕНИИ ИЛИ
ПРЕДУПРЕЖДЕНИИ ОТЕКА ЛЕГКИХ
ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

Настоящее изобретение относится к ингибитору ROCK (ассоциированная с Rho протеинкиназа) для применения в лечении или предупреждении отека легких, ассоциированного с вирусной инфекцией. Настоящее изобретение, кроме того, касается применения системы анализа *in vitro* или определения эффективности ингибитора в предупреждении или уменьшении апикальной локализации натрий-калиевой-АТФазы (НКА) в эпителиальных клетках легкого. Также предложен способ выявления молекул, эффективных в профилактике и/или лечении отека легких. Наконец, данное изобретение относится к системе анализа.

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Отек легких может быть вызван многими разными факторами. Он может быть связан с сердечной недостаточностью, называясь кардиогенным отеком легких, или может быть связан с другими причинами, такими как вирусные инфекции, называясь некардиогенным отеком легких. Например, инфекция людей вирусом гриппа А (IAV) может приводить к повреждению легких и «острому респираторному дистресс-синдрому» (ARDS), который вызывается избыточным накоплением жидкости (отек легких) в альвеолярном пространстве легкого и может без лечения приводить к гипоксемии и смерти.

Для эффективного лечения требуется быстрая диагностика и раннее вмешательство. Следовательно, на протяжении последних 2 столетий предпринимались сосредоточенные усилия для разработки клинических средств для быстрой диагностики отека легких и отслеживания ответа на лечение. Идеальные свойства такого средства включали бы высокую чувствительность и специфичность, легкую доступность и способность диагностировать раннее накопление воды в легких перед развитием полного клинического проявления. Кроме того, практикующие врачи высоко ценят способность точно количественно измерять накопление внесосудистой легочной воды и отличать гидростатические этиологии отека легких от этиологий, связанных с высокой проницаемостью.

Следовательно, в данной области все еще существует потребность в терапиях

отека легких.

Решение по настоящему изобретению описывается далее, иллюстрируется в примерах, иллюстрируется в графических материалах и отражается в формуле изобретения.

Настоящее изобретение относится к ингибитору ROCK для применения в лечении или предупреждении отека легких посредством:

1) предупреждения апикальной локализации НКА в эпителиальных клетках легкого или

2) уменьшения апикальной локализации НКА в эпителиальных клетках легкого по сравнению с апикальной локализацией НКА до введения ингибитора ROCK,

где отек легких ассоциирован с вирусной инфекцией, и где указанный вирус принадлежит к порядку *Articulavirales* (например, *Orthomyxoviridae*), *Mononegavirales* (например, *Pneumoviridae*) и/или *Bunyavirales* (например, *Hantaviridae*).

Настоящее изобретение также относится к композиции, содержащей ингибитор ROCK, для применения в способе профилактики и/или лечения отека легких посредством:

1) предупреждения апикальной локализации НКА в эпителиальных клетках легкого или

2) уменьшения апикальной локализации НКА в эпителиальных клетках легкого по сравнению с апикальной локализацией НКА до введения ингибитора ROCK,

где отек легких ассоциирован с вирусной инфекцией, и где указанный вирус принадлежит к порядку *Articulavirales*, *Mononegavirales* и/или *Bunyavirales*.

Данное изобретение также относится к применению системы анализа *in vitro*, содержащей культивируемые эпителиальные клетки легкого, инфицированные вирусом порядка *Articulavirales*, *Mononegavirales* и/или *Bunyavirales*, для определения ингибиторов, эффективных в предупреждении или уменьшении индуцированной вирусом апикальной локализации НКА в эпителиальных клетках легкого.

Кроме того, настоящее изобретение касается способа выявления молекул, эффективных в профилактике и/или лечении отека легких, включающего приведение системы анализа *in vitro*, содержащей культивируемые эпителиальные клетки легкого, инфицированные вирусом порядка *Articulavirales*, *Mononegavirales* и/или *Bunyavirales*, в контакт с представляющим интерес соединением, где указанное представляющее интерес соединение уменьшает апикальную локализацию НКА в эпителиальных

клетках легкого по сравнению с данной системой анализа *in vitro* до указанного приведения в контакт.

Настоящее изобретение также относится к способу лечения субъекта, имеющего отека легких или подверженного риску отека легких, посредством предупреждения ассоциированной с РНК-вирусом апикальной локализации НКА в эпителиальных клетках легкого.

Настоящее изобретение также относится к системе анализа, содержащей: 1) ингибитор ROCK; 2) эпителиальные клетки легкого; 3) вирус порядка *Articulavirales*, *Mononegavirales* и/или *Bunyavirales*; и 4) средства для выявления НКА.

Графические материалы демонстрируют следующее.

Фиг. 1: ингибирование ROCK предотвращает апикальную локализацию натрий-калиевой АТФазы (НКА). Контроль: базолатеральное распределение НКА (светло-серый) в неинфицированных клетках Calu3. PR8: апикальное распределение НКА в клетках Calu3, инфицированных вирусом гриппа A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) через 20 ч п.и. (после инфицирования). PR8+Rho XIII: распределение НКА в клетках Calu3, инфицированных вирусом гриппа A/Puerto Rico/8/34 и обработанных ингибитором ROCK (20 ч после инфицирования (п.и.)). НКА α - (темно-серый), вирусный нуклеопротеин (NP) (светло-серый), ядро (темно-серый). Толщина среза: 0,25 мкм, масштабная линейка: 10 мкм.

Фиг. 2: ингибирование ROCK улучшает направленный транспорт воды в поляризованных (инфицированных) клетках Calu3: Имитация: направленный транспорт воды (VWT) через необработанные и неинфицированные поляризованные клетки Calu3 измеряли и принимали за 100%. PR8: VWT через необработанные и инфицированные вирусом гриппа A/Puerto Rico/8/34 (H1N1, MOI (множественность заражения) равна 2) клетки Calu3. Rho XIII + PR8: VWT через обработанные (ингибитор ROCK: XIII, 5 мкМ) и инфицированные вирусом гриппа A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) клетки Calu3. VWT через обработанные амилоридом (блокирует ENaC) и неинфицированные клетки Calu3 (негативный контроль, показывает ENaC-зависимую часть). А) 8 часов п.и., Б) 16 часов п.и.

Фиг. 3: ингибирование ROCK увеличивает жизнеспособность неинфицированных и инфицированных клеток Calu3. Имитация: клетки Calu3 инкубировали в течение 0, 6, 16, 24 часов, определяли жизнеспособность (анализ МТТ (анализ с тетразолием в микрокультуре)) и принимали за 100%. Rho XIII: клетки Calu3

обрабатывали в течение 0, 6, 16, 24 часов ингибитором ROCK Rho XIII (5 мкМ), и затем определяли жизнеспособность. H1N1: клетки Calu3 инфицировали вирусом гриппа A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) (MOI равна 2), и определяли жизнеспособность. Rho XIII + H1N1: клетки Calu3 инфицировали вирусом гриппа A/Puerto Rico/8/34 (H1N1), обрабатывали в течение 0, 6, 16, 24 часов ингибитором ROCK Rho XIII (5 мкМ) и затем определяли жизнеспособность.

Фиг. 4: ингибирование ROCK уменьшает индуцированное вирусом повреждение эпителиальных клеток *in vitro*. Имитация: выращенные конфлюентно, поляризованные клетки Calu3 с имитацией инфекции окрашивали кумасси (синим). H1N1: клетки инфицировали вирусом гриппа A/Puerto Rico/8/34 (MOI равна 5) и окрашивали в 24 ч п.и. кумасси. Rho XIII: выращенные конфлюентно клетки Calu3 обрабатывали ингибитором ROCK (Rho XIII, 5 мкМ) и окрашивали кумасси через 24 часа. H1N1+Rho XIII: выращенные конфлюентно клетки Calu3 инфицировали вирусом гриппа A/Puerto Rico/8/34, обрабатывали ингибитором ROCK (Rho XIII, 5 мкМ) и окрашивали кумасси в 24 ч п.и.

Фиг. 5: ингибирование ROCK приводит к тенденции снижения потери массы тела инфицированных мышей C57BL/6. Фасудил HCl: масса тела неинфицированных мышей, которые были обработаны 1 раз в сутки ежедневно фасудил HCl (10 мг/кг в физиологическом растворе). PR8: масса тела мышей, инфицированных IAV A/Puerto Rico/8/34 (H1N1, 500 PFU (бляшкообразующая единица)/мышь). PR8+фасудил HCl: масса тела мышей, инфицированных IAV A/Puerto Rico/8/34 (H1N1, 500 PFU/мышь) и обработанных один раз в сутки фасудил HCl (10 мг/кг в физиологическом растворе). Данный эксперимент планировали только на 7 суток. Затем мышей умерщвляли по этическим причинам. Следовательно, возможно, что черная и красная кривая отделялись бы друг от друга даже сильнее (значимо).

Фиг. 6: ингибирование ROCK уменьшает массу жидкости (отношение сырая/сухая масса) легкого инфицированных мышей. Имитация: отношение сырая/сухая масса легкого необработанных мышей с имитацией инфекции. Фасудил HCl: отношение сырая/сухая масса легкого мышей, обработанных 1 раз в сутки в течение 6 суток фасудил HCl (10 мг/кг в физиологическом растворе). PR8: отношение сырая/сухая масса легкого мышей, инфицированных IAV A/Puerto Rico/8/34 (H1N1, 500 PFU/мышь) (на 7-ые сутки п.и.). PR8+Фасудил HCl: отношение сырая/сухая масса легкого мышей, инфицированных IAV A/Puerto Rico/8/34 (H1N1, 500 PFU/мышь) и

обработанных 1 раз в сутки в течение 6 суток фасудил HCl (10 мг/кг в физиологическом растворе) (на 7-ые сутки п.и.).

Фиг. 7: ингибирование ROCK улучшает структуру ткани легкого и уменьшает клеточную альвеолярную инфильтрацию инфицированных мышей. Контроль: срез ткани легкого (разные увеличения), репрезентативный для животных, обработанных 1 раз в сутки в течение 6 суток фасудил HCl (10 мг/кг в физиологическом растворе) (на 7-ые сутки п.и.). PR8: срез ткани легкого (разные увеличения), репрезентативный для животных, инфицированных IAV A/Puerto Rico/8/32 (H1N1, 500 PFU/мышь) (на 7-ые сутки п.и.). PR8+фасудил HCl: срез ткани легкого (разные увеличения), репрезентативный для животных, инфицированных IAV A/Puerto Rico/8/32 (H1N1, 500 PFU/мышь) и обработанных 1 раз в сутки в течение 6 суток фасудил HCl (10 мг/кг в физиологическом растворе) (на 7-ые сутки п.и.), демонстрирующий одно обзорное изображение (4×) и два увеличения отобранных срезов (10×, 20×).

Фиг. 8: ингибирование ROCK уменьшает число инфильтратов (количественное измерение). Контроль: срезы ткани легкого от 5 мышей, которых обрабатывали 1 раз в сутки в течение 6 суток фасудил HCl (10 мг/кг в физиологическом растворе) (на 7-ые сутки п.и.). PR8: срезы ткани легкого от 5 мышей, инфицированных IAV A/Puerto Rico/8/32 (H1N1, 500 PFU/мышь) (7-е сутки п.и.). PR8 + фасудил HCl: срезы ткани легкого от 5 мышей, инфицированных IAV A/Puerto Rico/8/32 (H1N1, 500 PFU/мышь) и обработанных 1 раз в сутки в течение 6 суток фасудил HCl (10 мг/кг в физиологическом растворе) (на 7-ые сутки п.и.). Срезы ткани легкого оцифровывали сканером Aperio CS2 (Leica Biosystems Imaging Inc., CA, США), анализировали с использованием программы «алгоритм подсчета ядер Aperio v9» (Leica Biosystems Imaging Inc., CA, США) и определяли расчетные среднюю площадь срезов легкого каждой группы (средняя поверхность/мм²), среднее общее число клеток/поверхность и среднее число клеток на мм² (общее число клеток/мм²).

Фиг. 9: ингибирование ROCK уменьшает титр вируса в легких инфицированных мышей. PR8: титр вируса гомогенатов легкого от мышей, инфицированных IAV A/Puerto Rico/8/32 (H1N1, 500 PFU/мышь) (7-ые сутки п.и.). PR8 + фасудил HCL: титр вируса гомогенатов легкого от мышей, инфицированных IAV A/Puerto Rico/8/32 (H1N1, 500 PFU/мышь) и обработанных 1 раз в сутки в течение 6

суток фасудил HCl (10 мг/кг в физиологическом растворе) (на 7-ые сутки п.и.). n равно 3.

Фиг. 10: экспрессия на клеточной поверхности NKA, M2 и HA в клетках, инфицированных PR8. Количество NKA, M2 и HA на клеточной поверхности клеток Calu3, инфицированных PR8 (плюс/минус) обработка ингибитором ROCK оценивали анализом вестерн-блоттинг на клетке непермеабелизированных клеток с использованием специфичных в отношении NKA антител (к бета-субъединице, HA и M2 (n равно 16)).

Фиг. 11: перераспределение NKA β 1 в пределах плазматической мембраны клеток Calu3, инфицированных разными подтипами IAV.

(А) Рост разных подтипов IAV в клетках Calu3. Клетки инфицировали указанными вирусами при MOI 0,01, и титры вируса определяли посредством анализа очагов в указанные моменты времени. Гистограмма представляет среднее плюс SD (стандартное отклонение), n равно 3.

(Б) Количественное измерение NKA β 1 на апикальной мембране клеток Calu3, инфицированных разными штаммами IAV. Монослой клеток Calu3 на 96-луночном планете инфицировали указанными вирусами (MOI:2), и проводили анализ OCWB в 20 ч п.и. Данные представляют среднее плюс SD, n равно 16.

В здоровых/контрольных эпителиальных клетках легкого NKA по существу локализуется базолатерально. В данной ситуации натрий поглощается в эпителиальные клетки легкого, например, через локализованные апикально натриевые каналы (ENaC). NKA затем экспортирует натрий из эпителиальной клетки легкого в субэпителиальное интерстициальное пространство. Вода следует по этому градиенту натрия в субэпителиальное интерстициальное пространство через аквапорины и посредством других внутриклеточных путей. Данным способом предупреждается развитие отека легких. Отсюда следует то, что NKA представляет собой главный лимитирующий фактор в устранении отека, когда она функционально ослаблена (Peteranderl et al., (2019) "Influenza A virus infection induces apical redistribution of Na⁺, K⁺-ATPase in lung epithelial cells in vitro and in vivo" American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology, Volume 61, Number 3, pp. 395-397).

В частности, авторы данного изобретения обнаружили, что при вирусной инфекции эпителиальных клеток легкого, предпочтительно клеток альвеолярного эпителия (например, клеток Calu3) вирусом *grippe A (IAV)* порядка *Articulavirales* и,

таким образом, также предположительно порядка *Mononegavirales* и/или *Bunyavirales*, НКА по меньшей мере частично перераспределяется с базолатеральной стороны на апикальную сторону эпителиальных клеток легкого. Из-за этого перераспределения нарушается натриевый градиент, а также направленный транспорт воды с апикальной на базолатеральную сторону клетки легкого. Это приводит к развитию отека легких. Примечательно то, что комплексы плотных контактов не подвергаются влиянию данной вирусной инфекции, указывая на то, что поддерживается полярность клеток (Peteranderl et al., (2019) “Influenza A virus infection induces apical redistribution of Na⁺, K⁺-ATPase in lung epithelial cells in vitro and in vivo” American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology, Volume 61, Number 3, pp. 395-397).

Неожиданно обнаружили, что ингибиторы ROCK (1) предупреждают индуцированное IAV патологическое перераспределение НКА с базолатеральной стороны на апикальную сторону инфицированных вирусом человеческих полярных эпителиальных клеток легкого (таких как клетки Calu3) и (2) восстанавливают направленный транспорт жидкости (от апикального до базолатерального) в культуре клеток. Таким образом, ингибиторы ROCK лечат и/или предупреждают отек легких посредством прямого воздействия на внутриклеточный транспорт воды в эпителиальных клетках легкого, инфицированных IAV. В частности, лечение или предупреждение достигается посредством переустановления внутриклеточного направленного транспорта воды от апикальной на базолатеральную сторону в интерстициальном пространстве посредством восстановления натриевого градиента через предотвращение индуцированной IAV апикальной локализации НКА. Не будучи связанными теорией, авторы данного изобретения считают, что ингибиторы ROCK не только предотвращают перераспределение НКА на апикальную сторону, но также базолатерально стабилизируют НКА.

Кроме того, обнаружили, что ингибиторы ROCK (3) значительно уменьшают цитопатический эффект (CPE) пролиферации IAV в культуре клеток. Кроме того, эксперименты на животных показали то, что ингибирование ROCK (4) приводит к уменьшению потери массы тела инфицированных мышей, (5) уменьшает массу жидкости легкого инфицированных мышей, (6) стабилизирует структуру ткани легкого, (7) уменьшает клеточную альвеолярную инфильтрацию и (8) уменьшает титр вируса в легких инфицированных мышей.

Таким образом, настоящее изобретение относится к ингибитору ROCK для применения в лечении или предупреждении отека легких посредством:

1) предупреждения апикальной локализации НКА в эпителиальных клетках легкого или

2) уменьшения апикальной локализации НКА в эпителиальных клетках легкого по сравнению с апикальной локализацией НКА перед введением ингибитора ROCK,

где отек легких ассоциирован с вирусной инфекцией, и где указанный вирус принадлежит к порядку *Articulavirales* (например, *Orthomyxoviridae*), *Mononegavirales* (например, *Pneumoviridae*) и/или *Bunyavirales* (например, *Hantaviridae*).

«Ингибитор ROCK» в том виде, как здесь используется данный термин, может представлять собой любой подходящий ингибитор ROCK. В общем, ингибитор ROCK представляет собой ингибитор метаболического пути ассоциированной с Rho протеинкиназы (ROCK). Путь ROCK известен специалисту и, среди прочих, описывается Liao et al. (2007) “Rho Kinase (ROCK) Inhibitors” *J. Cardiovasc Pharmacol.* 50(1):17-24 и Amano et al. (2010) “Rho-Kinase/ROCK: A Key Regulator of the Cytoskeleton and Cell Polarity” *Cytoskeleton* (Hoboken). 2010 Sep; 67(9): 545–554. Таким образом, термин «путь передачи сигнала ROCK» относится к каскаду клеточных событий, инициируемых (активной) Rho-ассоциированной киназой (Rho-киназа/ROCK/ROK).

Данный каскад клеточных событий, например, может начинаться с Rho. Подсемейство Rho является членом низкомолекулярных G-белков в семействе Ras, и обладает GTP(гуанозинтрифосфат)-азной активностью. Таким образом, Rho конвертируется между активированным состоянием (Rho-GTP) и неактивным состоянием (Rho-GDP (гуанозиндифосфат)). При стимуляции Rho, например, посредством лизофосфатидной кислоты (LPA) или сфингозин-1-фосфата (S1P) образуется GTP-связанный Rho (активный Rho). Одной эффекторной молекулой ниже Rho является ассоциированная с Rho киназа (Rho-киназа/ROCK/ROK). Таким образом, Rho-GTP может активировать ROCK. Однако ROCK также могут активироваться независимо от Rho, а именно, через, например, аминоконцевое трансфосфорилирование. При активации белок ROCK фосфорилирует многие работающие ниже мишени, такие как F-актин.

С другой стороны, ROCK могут ингибироваться другими малыми GTP-связывающими белками, такими как Gem и Rad.

В частности, ROCK состоят из аминоконцевого домена серин/треониновой протеинкиназы, с последующей средней областью, образующей суперспираль, содержащую Rho-связывающий домен (RBD), и карбоксиконцевым цистеинбогатым доменом (CRD), расположенным в пределах мотива с гомологией с плекстрином (PH), как также описано Liao et al. (2007) "Rho Kinase (ROCK) Inhibitors" *J. cardiovasc Pharmacol.* 50(1):17-24. До настоящего времени идентифицировали две изоформы ROCK, а именно: ROCK1 и ROCK2.

Термин «ингибитор» ROCK в том виде, как он здесь используется, определяется как любой подходящий ингибитор, способный уменьшать или ингибировать активность ROCK или пути ROCK. Данный ингибитор может представлять собой соединение/молекулу, уменьшающую или устраняющую активность ROCK или пути ROCK. Данный ингибитор может достигать этого эффекта посредством снижения или блокирования транскрипции гена, кодирующего ROCK, и/или снижения трансляции мРНК, кодирующей ROCK. Также может быть, что данный ингибитор приводит к тому, что ROCK осуществляет(ют) ее(их) биохимическую функцию с более низкой эффективностью в присутствии ингибитора, чем в отсутствие данного ингибитора. Кроме того, возможно, что данный ингибитор приводит к тому, что ROCK выполняет свою клеточную функцию с более низкой эффективностью в присутствии активатора, чем в отсутствие ингибитора.

Соответственно, термин «ингибитор» также охватывает молекулы/соединения, которые имеют прямо понижающее влияние на путь ROCK, например, Gem и Rad, а также молекулы, которые являются опосредованно понижающими, например, посредством взаимодействия с молекулами, которые положительно регулируют (например, активируют, как, например, Rho-GTP, LPA или S1P) путь ROCK.

Данный ингибитор также может быть антагонистом пути, подлежащего ингибированию.

Специалисту известны способы осуществления анализа того, способно ли соединение/молекула уменьшать или ингибировать активность ROCK или пути ROCK. Например, ингибитор пути ROCK или ROCK можно тестировать посредством проведения стандартных анализов, известных специалисту. Данный специалист может приводить зонд в контакт с субъединицей 1 миозинфосфатной мишени (MYPT1). MYPT1 представляет собой субстрат ROCK1 и ROCK2, которая фосфорилирует данный субстрат по треонину 696 (T696). Это фосфорилирование может быть выявлено

посредством антитела против фосфо-MYPT1-Thr696. Рекомбинантная активная ROCK2 может использоваться в качестве позитивного контроля. Такие анализы имеются в продаже и, например, могут быть приобретены у abcam (ROCK Activity Assay, abcam Cat# ab211175) или Millipore (Millipore Cat# CSA001).

Ингибитор может ингибировать или снижать активность пути ROCK или ROCK на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% или более по сравнению с активностью пути ROCK или активностью ROCK без или перед добавлением данного ингибитора.

Ингибитор ROCK может представлять собой малую молекулу, соединение, связывающую молекулу, такую как антитело, молекулу нуклеиновой кислоты, такую как siРНК (малая интерферирующая РНК), или пролекарство.

«Малая молекула» в том виде, как здесь используется данный термин, может представлять собой любую малую молекулу, которая может уменьшать/ингибировать путь ROCK (путь Rho/ROCK) или активность ROCK. Данная малая молекула может представлять собой органическое соединение с низкой молекулярной массой. Низкая молекулярная масса может означать, что данное соединение имеет массу меньше, чем 900 Дальтон (Да), меньше, чем 800 Да, меньше, чем 700 Да, меньше, чем 600 Да или меньше, чем 500 Да. Например, данная малая молекула может иметь молекулярную массу примерно 300 Да. Размер малой молекулы может определяться хорошо известными в данной области способами, например, масс-спектрометрией. Типичные низкомолекулярные ингибиторы ROCK включают Y-27632 и CCG-1423, а также фасудил HCl (327,830898 Да), RKI-1447 (326,374812 Да) и гидроксифасудил (307,369824 Да).

«Соединение» в том виде, как здесь используется данный термин, может представлять собой любое соединение, которое может уменьшать/ингибировать путь ROCK (путь Rho/ROCK) или ROCK. Данное соединение/молекула, которая может использоваться в качестве ингибитора, может представлять собой любое соединение/молекулу, которая может ингибировать или уменьшать соответствующий путь/ROCK, или которая активирует супрессор пути/ROCK, или ингибирует активатор пути/ROCK, подлежащий ингибированию.

«Связывающая молекула» в том виде, как здесь используется данный термин, может представлять собой любую связывающую молекулу, которая может ослаблять/ингибировать путь ROCK (путь Rho/ROCK) или ROCK. Например,

связывающая молекула может представлять собой антитело, фрагмент антитела или фрагмент двухвалентного антитела, содержащий два сайта связывания с разными специфичностями.

Данное антитело может представлять собой антитело против ROCK1 и/или против ROCK2. Такие антитела имеются в продаже. Например, данное антитело может представлять собой антитело против ROCK1 [EP786Y] или [EPR638Y] от abcam (ab45171 или ab230799), антитело против ROCK2 от abcam (ab71598), антитело против Rock1 (B-1) от Santa Cruz (sc-374388), антитело против ROCK1 (C8F7) mAb № 4035 от Cell Signaling, антитело против ROCK2 (D1B1) mAb № 9029 от Cell Signaling или антитело против ROCK2 № 8236 от Cell Signaling.

Неограничивающие примеры таких двухвалентных фрагментов антитела включают фрагмент (Fab)₂, двухвалентный одноцепочечный фрагмент Fv, димер bsFc-1/2 или димер bsFc-CH3-1/2. Данная связывающая молекула также может иметь только один сайт связывания, т.е. может быть одновалентной. Примеры одновалентных связывающих молекул включают одновалентный фрагмент антитела, белковую связывающую молекулу с антителоподобными свойствами связывания, но не ограничиваются ими. Примеры одновалентных фрагментов антитела включают фрагмент Fab, фрагмент Fv, одноцепочечный фрагмент Fv (scFv) или фрагмент scFv-Fc, но не ограничиваются ими.

В качестве альтернативы, связывающая молекула также может представлять собой двухвалентную белковую искусственную связывающую молекулу, такую как мутеин липокалина, который также известен как «дуокалин».

Связывающая молекула также может представлять собой белковую связывающую молекулу с антителоподобными свойствами связывания. Типичные, но не ограничивающие белковые связывающие молекулы включают аптамер, мутеин на основе полипептида семейства липокалина, глутело (аналог антитела на основе глутатион-S-трансферазы), белок на основе анкиринового каркаса, белок на основе кристаллинового каркаса, аднектин, авимер или (рекомбинантный) рецепторный белок.

Данный ингибитор также может представлять собой молекулу нуклеиновой кислоты. Примеры включают РНК, siРНК, микроРНК или небелковый аптамер, который может ингибировать путь ROCK (путь Rho/ROCK) или ROCK. Такой аптамер представляет собой олигонуклеиновую кислоту, которая связывается со специфической молекулой-мишенью. Данные аптамеры могут классифицироваться как ДНК- или РНК-

аптамеры. Они состоят из (обычно коротких) нитей олигонуклеотидов. Также молекулы нуклеиновых кислот могут использоваться для подавления активатора, промотора или энхансера пути, подлежащего ингибированию.

siРНК для ROCK1 и ROCK2 имеются в продаже для специалиста. Например, данная siРНК может представлять собой siРНК Rock-1 (h (человеческая)) от Santa Cruz (sc-76025), siРНК ROCK2 (h) от Santa Cruz (sc-29474), siРНК ROCK-1 (h) №4390824 от Thermo Fischer Scientific или siРНК ROCK-2 (h) AM51331 от Thermo Fischer Scientific.

Данный ингибитор также может представлять собой пролекарство, которое может ингибировать путь ROCK (путь Rho/ROCK)/ROCK. «Пролекарство» является по существу неактивным фармакологически и метаболизируется в организме субъекта, которому было введено данное пролекарство, в его активную форму. Подходящие пролекарства, например, описываются в WO2012/015760.

Также рассматривается, что ингибитор ROCK представляет собой ингибитор ROCK1 и/или ROCK2. Типичный ингибитор ROCK1 представляет собой фасудил, как здесь описано. Типичный ингибитор ROCK1 и ROCK2 представляет собой RhoXIII. Типичный ингибитор ROCK2 представляет собой SLx-2119 (также известный как KD025). Данный ингибитор ROCK может представлять собой любой ингибитор, как перечислено в Таблице 1, или их комбинации.

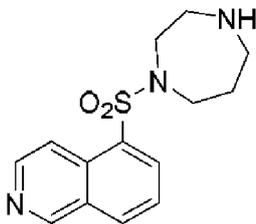
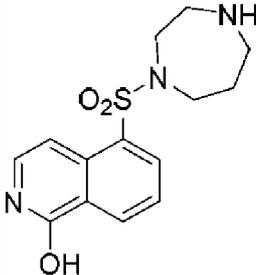
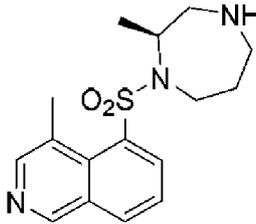
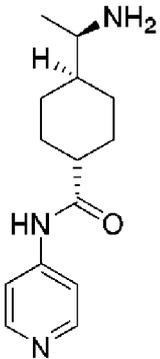
Типичные ингибиторы ROCK, следовательно, включают фасудил, Y27632 (CAS: 146986-50-7), гидроксифасудил, H-1152-P (диметилфасудил), Y27632, Y30141, Y32885 (Wf536), Y39983 (CAS: 203911-26-6), DW1865, SLx-2119 (CAS: 911417-87-3), SR8046, SR6246, рипасудил, AS1892892, AR12141, AR12432, INS-117548, INS-115644, AT13148, RKI1447, SAR407899, нетарсудил (он же AR-13324), AR12286, PG286*, PG324**, ATS907, AMA0076, тиазовивин, азабензимидазол-аминофуразаны, H-0104 дигидрохлорид (CAS: 913636-88-1), DE-104, олефины, изохинолины (CAS: 119-65-3), индазолы (CAS: 271-44-3), производные пиридиналкена, H-1152 дихлорид (CAS: 871543-07-6), XD-4000, HMN-1152, 4-(1-аминоалкил)-N-(4-пиридил)циклогексан-карбоксамиды (пероральный препарат), ростатин, BA-210, BA-207, BA-215, BA-285, BA-1037, Ki-23095, VAS-012, хиназолин, AR13154, AMA0428 и/или Rho XIII, или их комбинации.

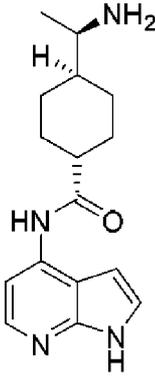
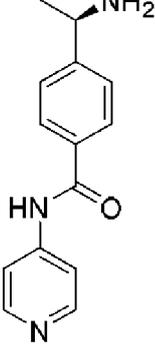
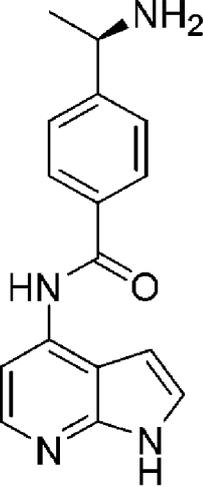
Ингибитор ROCK также может быть выбран из фасудила, гидроксифасудила, диметилфасудила, Y27632, Y30141, Y32885, Y39983, DW1865, SLx-2119, SR8046, SR6246, рипасудила, AS1892892, AR12141, AR12432, INS-117548, INS-115644,

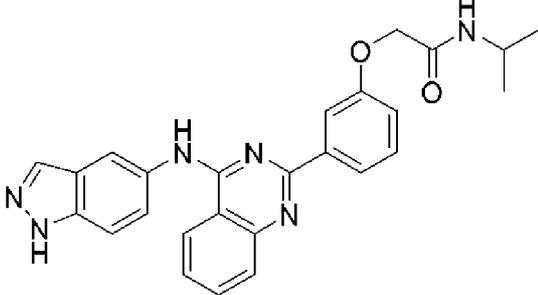
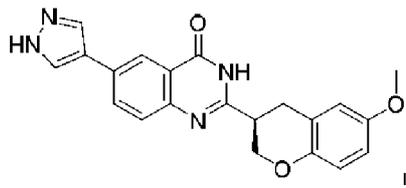
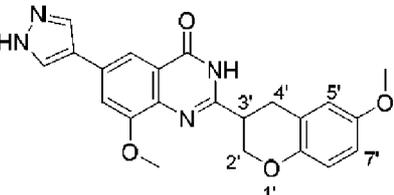
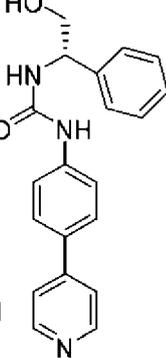
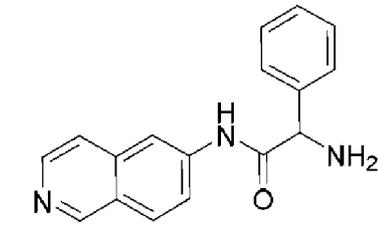
AT13148, RKI1447, SAR407899, нетарсудила, AR12286, ATS907, AMA0076, тиазовивина, H-0104 дигидрохлорида, олефинов, изохинолинов, индазолов, H-1152 дихлорида, 4-(1-аминоалкил)-N-(4-пиридил)циклогексан-карбоксамидов, хиназолина, Rho XIII, AR13154, AMA0428 и/или их комбинаций.

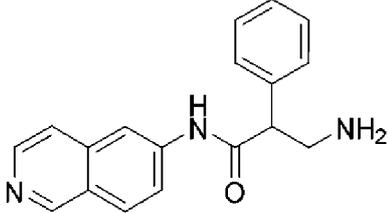
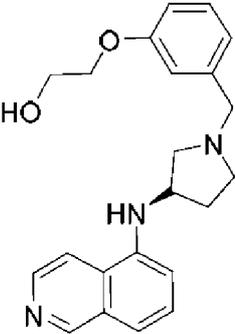
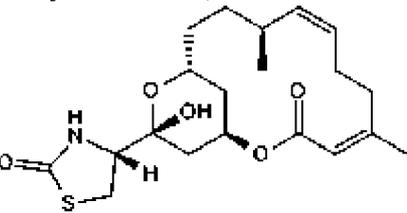
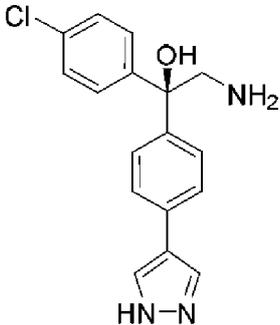
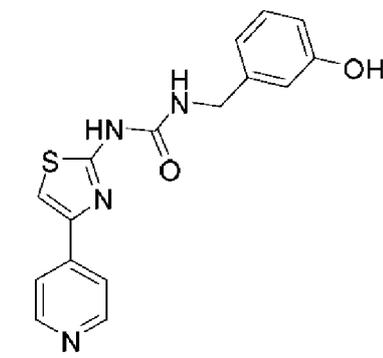
Ингибитор ROCK также может быть выбран из фасудила, Y27632, Y39983, SLx-2119, рипасудила, INS-117548, INS-115644, AT13148, SAR407899, нетарсудила, AR12286, ATS907, Rho XIII и/или их комбинаций.

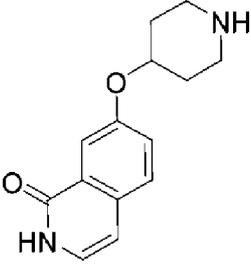
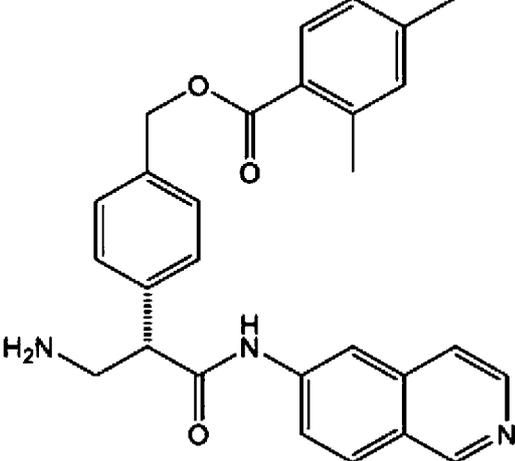
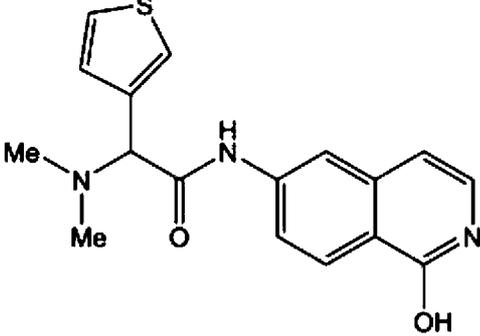
Ингибиторы ROCK, описанные в данном документе, дополнительно характеризуются ниже в Таблице.

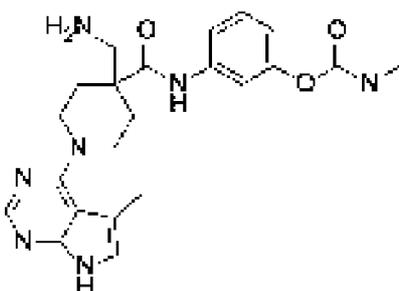
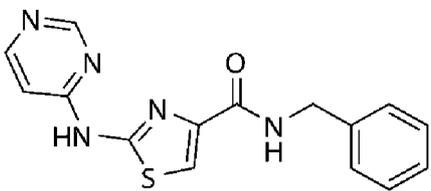
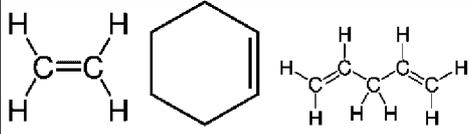
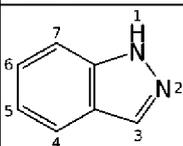
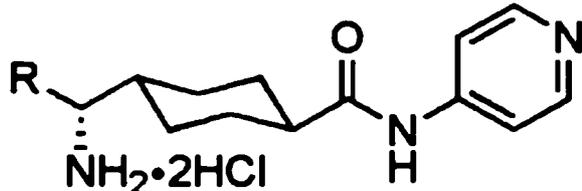
№	Название	Структура или другая идентификация
1	<u>Фасудил</u>	
2	Гидроксифасудил	
3	H-1152-P (диметилфасудил)	
4	<u>Y27632</u>	

5	Y30141	
6	Y32885 (Wf536)	
<u>7</u>	<u>Y39983</u> <u>(также именуемый RKL-983, SNJ-1656)</u>	
8	DW1865	

9	SLx-2119 (KD025)	
10	SR8046	
11	SR6246	
12	Рипасудил	
13	AS1892892	
14	AR12141	

15	AR12432	 <chem>NCC(NC(=O)C1=CC=CC=C1)c2ccc3ncncc3c2CNc4ccccc4</chem>
16	<u>INS-117548</u>	 <chem>OCCOc1ccc(cc1CNc2ccc3ncncc3c2)N[C@@H]4CCCN4</chem>
17	<u>INS-115644 (также именуемый латрункулин В)</u>	Получен Merck, Whitehouse Station, NJ, США  <chem>CC1=CC=C(C=C1)C(=O)O[C@H]2[C@@H](O)[C@H](O)[C@@H](O)[C@H]2N3CSC3=O</chem>
18	<u>AT13148</u>	 <chem>NCC(O)c1ccc(Cl)cc1c2ccc(cc2)c3c[nH]n3</chem>
19	RKI1447	 <chem>Oc1ccc(cc1)CNc2nc3ccncc3s2</chem>

20	<u>SAR407899</u>	
21	<u>Нетарсудил (он же AR-13324)</u>	
22	<u>AR12286</u>	
23	<u>PG286*</u>	Идентификатор ClinicalTrials.gov: NCT01789736 Получен Aerie Pharmaceuticals Inc.
24	<u>PG324**</u>	Идентификатор ClinicalTrials.gov (номер NCT): NCT02057575 Получен Aerie Pharmaceuticals Inc.
25	<u>ATS907</u>	Идентификатор ClinicalTrials.gov: NCT01668524 Получен Altheos Inc., South San Francisco, CA, США

		
26	AMA0076	3-[2-(Аминометил)-5-[[пиридин-4-ил]карбамоил]-фенил] бензоат. Получен Amakem, Бельгия Идентификатор ClinicalTrials.gov NCT02136940
27	DE-104	Идентификатор ClinicalTrials.gov: NCT00868894 Получен Santen-Ube, Osaka City и Ube City, Япония
28	Тиазовивин	
29	Азабенз-имидазол-аминофуразаны	
30	Н-0104 дигидрохлорид	CAS: 913636-88-1
31	Олефины, такие как этен, циклогексен или 1,4-пентадиен	 (этен) (циклогексен) (1,4-пентадиен)
32	Изохинолины	CAS: 119-65-3
33	Индазолы (CAS: 271-44-3)	
34	Производные пиридин-алкена	
35	Н-1152 дихлорид	CAS: 871543-07-6
36	XD-4000	
37	HMN-1152	
38	4-(1-аминоалкил)-N-(4-пиридил)цикло-гексан-карбоксамиды (пероральный препарат)	 R может быть выбран из а) nC_3H_7 (= ВА-1001) б) nC_8H_{17} (= ВА-1040)

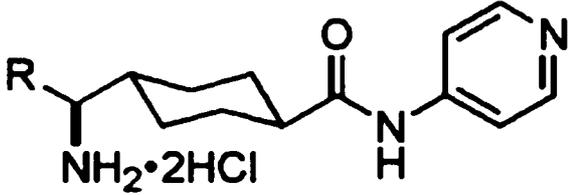
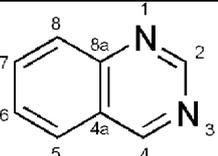
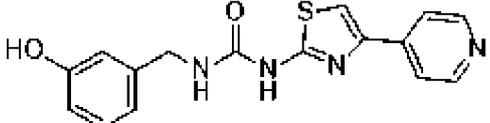
		 <p>R может быть выбран из а) nC_3H_7 (= BA-1002)</p>
39	Ростатин	
40	BA-210	
41	BA-207	
42	BA-215	
43	BA-285	
44	BA-1037	
45	Ki-23095	
46	VAS-012	
47	хиназолин	
48	Rho XIII	
49	AR13154	Разработан Aerie Pharmaceuticals
50	AMA0428	Разработан Amakem

Таблица 1: список ингибиторов ROCK и дополнительная информация, такая как структурная формула, номера клинических испытаний и номера CAS (Служба подготовки аналитических обзоров по химии).

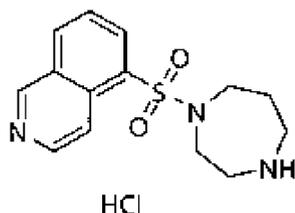
Ингибитор ROCK также может быть выбран из фасудила, Y27632, гидроксифасудила, Y39983, SLx-2119, рипасудила, ATS907, INS-117548, AT13148, SAR407899, нетарсудила, AR12286 или их комбинаций.

Ингибитор ROCK также может быть выбран из фасудила, Y27632, гидроксифасудила, Y39983, SLx-2119, рипасудила, INS-117548, INS-115644, ATS907, AT13148, SAR407899, нетарсудила, AR12286, PG286*, PG324**, ATS907, AMA0076 и DE-104 или их комбинаций.

Ингибитор ROCK также может представлять собой ингибитор ROCK, как раскрыто в WO 2009/158587 и/или в Feng et al. (2015) "Rho Kinase (ROCK) Inhibitors and Their Therapeutic Potential` including the information about clinical trials" *J. Med. Chem.* 2016, 59, 6, 2269-2300.

Кроме того, ингибитор ROCK может представлять собой соль любого описанного здесь подходящего ингибитора ROCK.

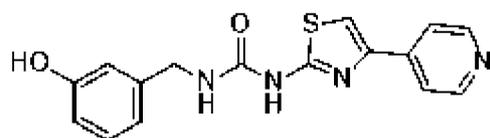
Таким образом, ингибитор ROCK может представлять собой фасудил или его соль, такую как фасудил HCl (изохинолин-5-[(гексагидро-1H-1,4-дiazепин-1-ил)сульфонил]-N-(5-изохинолинсульфонил)-1,4-пер-гидродиазепин; № CAS 103745-39-7). Фасудил HCl имеет следующую химическую формулу I:



Фасудил представляет собой мощный и селективный ингибитор Rho киназы, в частности, ROCK2 (Ono-Saito N, et al. (1999) "H-series protein kinase inhibitors and potential clinical applications" *Pharmacol Ther*, 82(2-3), 123-131).

Ингибитор ROCK также может представлять собой ингибитор и Rho-киназы 1, и Rho-киназы 2 (ROCK1 и ROCK2), подобно Rho XIII (1-(3-гидроксibenзил)-3-(4-(пиридин-4-ил)тиазол-2-ил)мочевина; CAS: 1342278-01-6).

Rho XIII имеет следующую химическую формулу II:



Следовательно, ингибитор ROCK также может представлять собой фасудил и/или RhoXIII.

Ингибитор ROCK согласно настоящему изобретению можно использовать в способе лечения или предупреждения отека легких. Термин «осуществление лечения» или «лечение», как таковой, включает введение ингибитора ROCK, предпочтительно в виде лекарственного средства, субъекту, определенному здесь в других местах, страдающему от отека легких, ассоциированного с вирусной инфекцией, с целью уменьшения интенсивности или улучшения симптомов.

Кроме того, ингибитор ROCK может действовать посредством уменьшения индуцированной вирусом (*Articulavirales*, *Mononegavirus* и/или *Bunyavirales*) апикальной локализации NKA в эпителиальных клетках легкого по сравнению с апикальной локализацией NKA перед введением ингибитора ROCK.

Термин «уменьшение» в том виде, как он здесь используется, означает, что количество индуцированной вирусом апикальной локализации НКА уменьшается на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или на 100% в присутствии ингибитора ROCK, как здесь описано, по сравнению с локализацией НКА, присутствующей до введения ингибитора ROCK.

Другими словами, ингибитор ROCK уменьшает общее количество апикальной НКА, которая мигрировала апикально в результате вирусной инфекции (*Articulavirales*, *Mononegavirus* и/или *Bunyavirales*), по меньшей мере примерно на 10% в присутствии ингибитора ROCK по сравнению с отсутствием или до введения ингибитора ROCK.

Термины «предупреждать», «предупреждение» или «профилактика» и «осуществление предупреждения» в том виде, как они здесь используются, относятся к уменьшению риска приобретения или развития отека легких, ассоциированного с вирусной инфекцией. Также под «профилактикой» подразумевается уменьшение или ингибирование повторного появления отека легких, ассоциированного с вирусной инфекцией. В частности, ингибитор ROCK может предупреждать отек легких посредством осуществления стабилизации базолатеральной локализации НКА. Предпочтительно термин «предупреждать» означает, что 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или 100% всех НКА локализуются базолатерально. Локализация НКА, среди прочего, может определяться иммуноокрашиванием НКА, например, как описывается в Примерах.

Ингибитор ROCK, как здесь определено, используется для лечения или предупреждения отека легких. Термин «отек легких» известен специалисту и, среди прочих, описывается Matthay et al. (2019) “Acute Respiratory distress Syndrome” *Nat Rev Dis Primers*, 5(1): 18, p. 1-52, а также Mutlu et al. (2005) “Mechanisms of pulmonary edema clearance” *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 289: L685-695 и Assaad et al. (2018) “Assessment of Pulmonary Edema: Principles and Practice.” *Journal of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia*, 32(2), 901–914. Термин «отек легких», как таковой, относится к накоплению жидкости в ткани и воздушных пространствах легких, в частности, в альвеолах – микроскопических воздушных мешках легких.

Таким образом, отек легких, в том виде, в котором здесь используется данный термин, характеризуется накоплением внесосудистой легочной воды (EVLW). Одним фактором, который может вызвать отек легких, является увеличение проницаемости

легочных капилляров. Накопление жидкости в легком, а именно отек легких, может быть обусловлен повреждением легкого, которое ассоциировано с вирусной инфекцией. Возникающее в результате накопление жидкости в легких ухудшает газообмен и может приводить к угнетению дыхания или даже к необходимости механической вентиляции (Assaad et al. (2018) "Assessment of Pulmonary Edema: Principles and Practice." *Journal of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia*, 32(2), 901–914).

Например, часто инфекция вирусом гриппа ассоциирована с пневмонией и с так называемым «острым респираторным дистресс-синдромом» (ARDS). Это, среди прочих, описывается Namendys-Silva et al. (2011) "Acute respiratory distress syndrome caused by influenza B virus infection in a patient with diffuse large B-cell lymphoma" *Case Rep Med*. 2011; 2011: 647528. ARDS представляет собой форму накопления жидкости в легких, которое типично провоцируется диффузным повреждением дыхательного эпителия, как также описано Matthay et al. (2019) "Acute Respiratory Distress Syndrome" *Nat rev Dis primers*, 5(1):18.

Отек легких может диагностироваться посредством рентгенографии или компьютерной томографии грудной клетки. Рентгенография грудной клетки известна квалифицированному специалисту. Именно проекционная рентгенограмма грудной клетки используется для диагностики условий, влияющих на грудную клетку. Полезные характеристики для широкого анализа отека легких на простой рентгенограмме грудной клетки включают следующие: центральный легочный венозный застой, отклонение легочных вен верхней доли/легочный венозный застой/картина рога оленя, повышенный кардиоторакальный индекс/размер силуэта сердца – полезные для оценки лежащей в основе кардиогенной причины или ассоциации. Характеристики интерстициального отека легких могут включать: перибронхиальную инфильтрацию и околоротное затемнение, септальные линии/линии Керли, утолщение междолевых фиссур. Характеристики альвеолярного отека легких: помутнение воздушного пространства классически с распределением в виде крыла летучей мыши может иметь воздушная бронхография с плевральными выпотами и жидкостью в междолевых фиссурах (включая «исчезающую» легочную псевдоопухоль). Имеется общее прогрессирование признаков на простой рентгенограмме, которое происходит по мере увеличения давления в концевых легочных капиллярах (PCWP). Могут ли все или только некоторые из данных признаков оцениваться на простой рентгенограмме грудной клетки зависит от

конкретной этиологии. Кроме того, отек легких обычно представляет собой двухсторонний процесс, но он при определенных ситуациях и патологиях необычным образом может проявляться односторонне.

Давления в концевых легочных капиллярах (PCWP) представляет собой давление, измеренное посредством вклинивания легочного катетера с надутым шариком в мелкую ветвь легочной артерии. Оно оценивает давление в левом предсердии. Как измерять PCWP, среди прочего, описывается McIntyre et al. (1992) “A noninvasive method of predicting pulmonary-capillary wedge pressure” *N Engl J Med.* 327(24): 1715-20.

Кроме того, рассматривается, что отек легких может быть степени 1. При степени 1 застой в легочных сосудах может быть выявлен на рентгенограмме грудной клетки, особенно может быть выявлено, что педикальная ширина составляет больше, чем 53 см и/или PCWP может составлять 12-17 мм рт.ст. (1,60-2,27 кПа) (Assaad et al. (2018) “Assessment of Pulmonary Edema: Principles and Practice.” *Journal of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia*, 32(2), 901–914).

Кроме того, рассматривается то, что отек легких может быть степени 2. При степени 2 интерстициальный отек может быть выявлен на рентгенограмме грудной клетки, в частности, могут быть выявлены В линии Керли и/или перибронхиальная инфильтрация (утолщенный конец на стенках бронхов), и/или PCWP может составлять 17-25 мм рт.ст. (2,27-3,34 кПа) (Assaad et al. (2018) “Assessment of Pulmonary Edema: Principles and Practice.” *Journal of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia*, 32(2), 901–914).

Кроме того, рассматривается то, что отек легких может быть степени 3. При степени 3 доказательство альвеолярного отека может быть выявлено на рентгенограмме грудной клетки, в частности, может быть выявлено присутствие легочной консолидации и/или PCWP может составлять больше 25 мм рт.ст (3,34 кПа).

Таким образом, отек легких может быть степени 1, 2 или 3. Отек легких может быть степени 1. Также рассматривается то, что отек легких может быть степени 2. Также рассматривается то, что отек легких может быть степени 3 (Assaad et al. (2018) “Assessment of Pulmonary Edema: Principles and Practice.” *Journal of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia*, 32(2), 901–914).

Отек легких также может быть выявлен посредством ультразвукового исследования легких и/или транспульмонарной термодилуции, как описывается, среди прочих Assaad et al. (2018) “Assessment of Pulmonary Edema: Principles and Practice.”

Journal of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia, 32(2), 901–914.

В настоящем изобретении может требоваться, что ингибитор ROCK предупреждает/уменьшает апикальную локализацию НКА в эпителиальных клетках легкого при вирусной инфекции, как раскрыто в данном документе.

НКА в том виде, как здесь используется данный термин, относится к любой подходящей НКА. НКА известна специалисту и, среди прочих, описывается Mutlu et al. (2005) “mechanisms of pulmonary edema clearance” Am J Physiol Cell Mol phsiol 289: L685-L695. Она представляет собой гетеродимерный белок, состоящий из α - и β -субъединицы. α -субъединица расщепляет высокоэнергетические фосфатные связи и имеет каталитический сайт для обмена внутриклеточного Na^+ на внеклеточный K^+ . β -субъединица представляет собой меньший, гликозилированный трансмембранный белок, который, по-видимому, контролирует сборку гетеродимера и вставку в плазматическую мембрану. Для функциональной НКА требуются обе субъединицы. Таким образом, НКА содержит α - и β -субъединицу.

Например, НКА может содержать α -субъединицу любой последовательности из SEQ ID NO. 4-7 или последовательности, имеющей 70%-ную, 75%-ную, 80%-ную, 85%-ную, 90%-ную, 95%-ную, 97%-ную, 98%-ную, 99%-ную идентичность последовательности с последовательностью SEQ ID NO. 4-7.

Дополнительно или альтернативно, НКА может содержать β -субъединицу любой последовательности из SEQ ID NO. 1-3 или последовательности, имеющей 70%-ную, 75%-ную, 80%-ную, 85%-ную, 90%-ную, 95%-ную, 97%-ную, 98%-ную, 99%-ную идентичность последовательности с последовательностью SEQ ID NO. 1-3.

Таким образом, НКА может содержать α -субъединицу любой последовательности из SEQ ID NO. 4-7 или последовательности, имеющей 70%-ную, 75%-ную, 80%-ную, 85%-ную, 90%-ную, 95%-ную, 97%-ную, 98%-ную, 99%-ную идентичность последовательности с последовательностью SEQ ID NO. 4-7, и β -субъединицу любой последовательности из SEQ ID NO. 1-3 или последовательности, имеющей 70%-ную, 75%-ную, 80%-ную, 85%-ную, 90%-ную, 95%-ную, 97%-ную, 98%-ную, 99%-ную идентичность последовательности с последовательностью SEQ ID NO. 1-3.

Согласно настоящему изобретению термин «идентичный» или «процент идентичности» в контексте двух или более чем двух полипептидных последовательностей, таких как SEQ ID NO: 1-15, относится к двум или более чем двум

последовательностям или подпоследовательностям, которые являются одинаковыми, или которые имеют точно определенную процентную долю аминокислот, которые являются одинаковыми (например, по меньшей мере 85%-ная, 90%-ная, 95%-ная, 96%-ная, 97%-ная, 98%-ная или 99%-ная идентичность) при сравнении и выравнивании на максимальное соответствие по окну сравнения или по обозначенной области при измерении с использованием алгоритма сравнения последовательностей, как известно в данной области, или посредством выравнивания вручную и визуальной проверки. Последовательности, имеющие, например, 80%-ную – 95%-ную или большую идентичность последовательности, считаются по существу идентичными. Такое определение также применимо к комплементу анализируемой последовательности. Специалисты в данной области будут знать, как определять процент идентичности между/среди последовательностей с использованием, например, таких алгоритмов, как алгоритмы на основе компьютерной программы CLUSTALW (Thompson Nucl. Acids Res. 2 (1994), 4673-4680) или FASTDB (Brutlag Comp. App. Biosci. 6 (1990), 237-245), как известно в данной области.

Также для специалистов в данной области доступны алгоритмы BLAST и BLAST 2.6 (Altschul Nucl. Acids Res. 25 (1977), 3389-3402). Программа BLASTP для аминокислотных последовательностей использует в качестве установок по умолчанию размер слова (W) 6, ожидаемый порог 10 и сравнение обоих нитей. Кроме того, можно использовать матрицу подсчета BLOSUM62 (Henikoff Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 89, (1989), 10915; Henikoff and Henikoff (1992) 'Amino acid substitution matrices from protein blocks.' Proc Natl Acad Sci U S A. 1992 Nov 15; 89(22):10915-9).

Например, для поиска локальных выравниваний последовательностей можно использовать BLAST2.6, что обозначает Basic Local Alignment Search Tool (основной инструмент для поиска локального выравнивания) (Altschul, Nucl. Acids Res. 25 (1997), 3389-3402; Altschul, J. Mol. Evol. 36 (1993), 290-300; Altschul, J. Mol. Biol. 215 (1990), 403-410).

НКА локализуется на базолатеральной поверхности эпителиальных клеток легкого, например, у здоровых субъектов. НКА транспортирует ионы, потребляя АТФ. В частности, она выкачивает ионы Na^+ из клетки в обмен на приток калия. Этим способом она поддерживает Na^+ и калиевые градиенты через плазматическую мембрану.

Выражение «эпителиальные клетки легкого» в том виде, как оно здесь

используется, означает любую эпителиальную клетку легкого. Специалисту известны разные эпителиальные клетки легкого, которые, среди прочих, описываются Rackley et al. (2012) "Building and maintaining the epithelium of the lung" *The Journal of Clinical investigation*, vol. 122, no. 8, pp. 2724-2730 и Crystal et al. (2008) "Airway epithelial cells" *Proc Am Thorac Soc*, vol. 5, pp. 772-777. В общем, эпителиальная клетка легкого является поляризованной. Это означает, что эпителиальная клетка легкого имеет апикальную и базальную сторону.

Эпителиальная клетка легкого может представлять собой клетку трахеального эпителия, клетку бронхиального эпителия или клетку альвеолярного эпителия.

Специалист в данной области может определить, принадлежит ли клетка к одной из указанных эпителиальных клеток. Например, специалист может провести иммуногистохимический анализ для выявления экспрессии коннексина 43. Коннексин 43 экспрессируется в клетках альвеолярного эпителия (как в AT1, так и в AT2 клетках), но также и на клетках трахеального эпителия и клетках бронхиального эпителия (Johnson and Koval (2009) "Cross-Talk Between Pulmonary Injury, Oxidant Stress, and Gap Junctional Communication." *Antioxidans and Redox Signaling*, vol. 11, number 2, pp. 356-367). Коннексин 43 может иметь последовательность, как показано в SEQ ID NO. 8, или может представлять собой последовательность, имеющую 70%-ную, 80%-ную, 90%-ную, 95%-ную, 99%-ную идентичность последовательности с последовательностью SEQ ID NO. 8.

Таким образом, эпителиальная клетка легкого, как здесь описано, может представлять собой клетку, которая экспрессирует коннексин 43. Указанная эпителиальная клетка легкого может представлять собой клетку, которая экспрессирует коннексин 43, как показано в SEQ ID NO. 8, или последовательность, имеющую 70%-ную, 80%-ную, 90%-ную, 95%-ную, 99%-ную идентичность последовательности с последовательностью SEQ ID NO. 8.

Более конкретно, «клетки трахеального эпителия» могут находиться от примерно 2^0 до 2^5 ветвей (большие дыхательные пути; клетки трахеального эпителия). Клетки трахеального эпителия выстилают трахею и главные бронхи.

«Клетки бронхиального эпителия» могут находиться от 2^6 до 2^{23} ветвей (малые дыхательные пути, клетки бронхиального эпителия). Указанные клетки бронхиального эпителия выстилают бронхиолы и малые бронхи.

И клетки трахеального эпителия, и клетки бронхиального эпителия локализуются в так называемом реснитчатом псевдостратифицированном столбчатом эпителии.

Таким образом, реснитчатый псевдостратифицированный столбчатый эпителий находится в выстилках трахеи, а также в верхнем респираторном тракте. Псевдопсевдостратифицированный эпителий у человека может простирается от трахеи до дистальных бронхиол. Например, он может простирается от 2^0 до 2^5 ветвей (большие дыхательные пути; клетки трахеального эпителия) и от 2^6 до 2^{23} ветвей (малые дыхательные пути, клетки бронхиального эпителия). Псевдостратифицированный эпителий, по-видимому, имеет много слоев, но фактически состоит только из одного листка клеток. Эту иллюзию вызывает расположение ядер в пределах индивидуальных столбчатых клеток. Данные ядра находятся на разных уровнях, создавая многослойный вид.

Главные типы клеток трахеального и бронхиального эпителия представляют собой реснитчатые клетки, секреторные клетки и базальные клетки (Crystal et al. (2008) "Airway epithelial cells" Proc Am Thorac Soc, vol. 5, pp. 772-777; Rackley et al. (2012) "Building and maintaining the epithelium of the lung" The Journal of Clinical investigation, vol. 122, no. 8, pp. 2724-2730).

Следовательно, предусматривается, что эпителиальная клетка легкого может представлять собой клетку бронхиального эпителия. Кроме того, предусматривается, что эпителиальная клетка легкого может представлять собой клетку альвеолярного эпителия. Клетка бронхиального или трахеального эпителия может представлять собой реснитчатую клетку, секреторную клетку или базальную клетку.

«Реснитчатые клетки» в том виде, в котором здесь используется данный термин, имеют тонкие, сужающиеся основания, которые присоединяются к подлежащей базальной пластинке. Данные клетки также могут соединяться друг с другом на их апикальных поверхностях посредством плотных контактов, образующих физически непроницаемый для большинства веществ барьер, и латерально друг с другом и с базальными клетками посредством десмосом. Между данными клетками могут присутствовать межклеточные пространства, содержащие многочисленные микроворсинки (Crystal et al. (2008) "Airway epithelial cells" Proc Am Thorac Soc, vol. 5, pp. 772-777; Rackley et al. (2012) "Building and maintaining the epithelium of the lung" The Journal of Clinical investigation, vol. 122, no. 8, pp. 2724-2730).

Секреторная клетка может представлять собой бокаловидную клетку, клетку Клара, секреторную клетку просвета или нейроэндокринную клетку.

«Бокаловидная клетка» в том виде, в котором здесь используется данный термин, локализуется на поверхностном эпителии верхних и нижних дыхательных путей и может продуцировать слизь для покрытия дыхательных путей и захвата частиц, подлежащих выведению.

«Клетки Клара» (нереснитчатые бронхиолярные секреторные клетки), также именуемые «булавовидные клетки» в том виде, в котором здесь используется данный термин, выстилают более дистальные дыхательные пути и, таким образом, данный тип клеток может находиться, главным образом, в мембранных бронхиолах. Они часто имеют столбчатую или (в более дистальных дыхательных путях) кубовидную форму. Они могут секретировать зрелые поверхностно-активные белки А, В, D и несколько детоксифицирующих ферментов.

«Секреторная клетка просвета» в том виде, в котором здесь используется данный термин, представляет собой нереснитчатую клетку. Клетки-предшественники просвета составляют большинство пролиферирующих клеток в условиях покоя (Rackley et al. (2012) “Building and maintaining the epithelium of the lung” The Journal of Clinical investigation, vol. 122, no. 8, pp. 2724-2730).

Нейроэндокринные клетки могут присоединяться своими основаниями к базальной мембране и могут иметь сужающиеся верхушки, которые простираются в направлении и могут или не могут достигать поверхности дыхательных путей. Главной функцией данных клеток является секреция пептидов (Crystal et al. (2008) “Airway epithelial cells” Proc Am Thorac Soc, vol. 5, pp. 772-777; Rackley et al. (2012) “Building and maintaining the epithelium of the lung” The Journal of Clinical investigation, vol. 122, no. 8, pp. 2724-2730).

«Базальные клетки» в том виде, как здесь используется данный термин, представляют собой относительно многочисленный тип клеток, которые контактируют с базальной мембраной, но могут не контактировать с просветом дыхательных путей. Базальные клетки могут локализоваться под поверхностным эпителием и служить в качестве предшественников как реснитчатых клеток, так и секреторных клеток. Они имеют критически важную роль в регенерации эпителия дыхательных путей после повреждения. Экспрессия характерных поднаборов белков промежуточных филаментов (кератин 5 [K5], K6, K14 и K16) может отличать базальные клетки от

эпителиальных клеток просвета (Rackley et al. (2012) "Building and maintaining the epithelium of the lung" The Journal of Clinical investigation, vol. 122, no. 8, pp. 2724-2730).

Таким образом, «эпителиальная клетка легкого» в том виде, в котором здесь используется данный термин, может представлять собой реснитчатую или нереснитчатую клетку трахеального эпителия. Также предусматривается, что «эпителиальная клетка легкого» в том виде, в котором здесь используется данный термин, может представлять собой реснитчатую или нереснитчатую клетку бронхиального эпителия.

Реснитчатая трахеальная или бронхиальная клетка может представлять собой реснитчатую клетку, как здесь описано. Нереснитчатая трахеальная/бронхиальная клетка может представлять собой нейроэндокринную клетку, секреторную клетку просвета, клетку Клара или базальную клетку.

Указанная эпителиальная клетка может локализоваться в реснитчатом псевдостратифицированном столбчатом эпителии или в простом плоском эпителии. Как здесь описано, клетки трахеального и бронхиального эпителия включаются в термин «реснитчатый псевдостратифицированный столбчатый эпителий».

С другой стороны, простой плоский эпителий, также именуемый здесь альвеолярный эпителий, присутствует после 2^{23} ветвей (альвеол) и включает клетки типа I и типа II. Таким образом, альвеолярный эпителий содержит смесь альвеолярного эпителия типа I и типа II, или типа I (AT1) и типа II (AT2). Альвеолы представляют собой наименьшие функциональные единицы в респираторном тракте, и они отвечают за обмен газов, таких как кислород и диоксид углерода, с капиллярами в легких. Монослой альвеолярного эпителия является тонким, состоящим из плоских клеток типа 1 (AT1, которые обеспечивают газообмен) и кубовидных клеток типа 2 (AT2, которые продуцируют поверхностно-активное вещество для обеспечения растяжения легких). И те, и другие клетки транспортируют ионы и жидкость из альвеолы для поддержания сухих воздушных пространств.

Клетки AT1 покрывают порядка 95% площади внутренней поверхности легкого. Они часто представляют собой разветвленные клетки с многими апикальными поверхностями, которые могут простираются в смежные альвеолы. Площадь апикальной поверхности клеток AT1 является большой по сравнению с большинством клеток (т.е. порядка 5000 мкм^2 для человеческих клеток AT1), тем не менее, они являются очень тонкими клетками (т.е. $0,2 \text{ мкм}$ в глубину). Барьер газообмена состоит

из АТ1 и эндотелиальных клеток, соединенных посредством слитых базальных мембран.

Маркеры для определения того, принадлежит ли клетка к типу I, известны специалисту и, среди прочих, описываются McElroy and Kasper (2004) "The use of alveolar epithelial type I cell-selective markers to investigate lung injury and repair" *European Respiratory Journal* 24: 664-673. Например, для определения того, принадлежит ли клетка к типу I, специалист может провести иммуногистохимический анализ для выявления экспрессии одного или более чем одного белка RTI₄₀/T1 α , HTI₅₆ и/или α_2 -изоформы Na⁺/K⁺-АТФазы (α_2 -изоформа показана в SEQ ID NO. 5). α_2 -Изоформа Na⁺/K⁺-АТФазы может иметь последовательность, как показано в SEQ ID NO. 5, или представлять собой последовательность, имеющую 70%-ную, 80%-ную, 90%-ную, 95%-ную, 99%-ную идентичность последовательности с последовательностью SEQ ID NO. 5.

Дополнительно или альтернативно, специалист может провести иммуногистохимический анализ для выявления экспрессии одного или более чем одного специфичного рецептора конечного продукта гликозилирования (AGER, ранее RAGE), подопланина (PDPN, ранее T1a), кавеолина 1 (CAV1), HOPX (homeodomain only protein x), домена 2 GRAM (GRAMD2), как, среди прочих, описано Marconett et al. (2016) "Cross-Species Transcriptome Profiling Identifies New Alveolar Epithelial Type I Cell-Specific Genes" *AJRCMB*, vol 56, no. 3. Изоформы А и В человеческого GRAMD2 показаны в SEQ ID NO. 9 и 10. GRAMD2 может иметь последовательность, как показано в SEQ ID NO. 9 или 10, или представлять собой последовательность, имеющую 70%-ную, 80%-ную, 90%-ную, 95%-ную, 99%-ную идентичность последовательности с последовательностью SEQ ID NO. 9 или 10.

Таким образом, эпителиальная клетка легкого, как здесь описано, может представлять собой клетку, которая экспрессирует α_2 -изоформу Na⁺/K⁺-АТФазы и/или GRAMD2. Эпителиальная клетка легкого может представлять собой клетку, которая экспрессирует α_2 -изоформу Na⁺/K⁺-АТФазы, как показано в SEQ ID NO. 5, или представлять собой последовательность, имеющую 70%-ную, 80%-ную, 90%-ную, 95%-ную, 99%-ную идентичность последовательности с последовательностью SEQ ID NO. 5, и/или GRAMD2, как показано в SEQ ID NO. 9 или 10, или представлять собой последовательность, имеющую 70%-ную, 80%-ную, 90%-ную, 95%-ную, 99%-ную идентичность последовательности с последовательностью SEQ ID NO. 9 или 10.

АТ2 представляют собой кубовидные клетки, расположенные между клетками АТ1, и они содержат характерные слоистые тела и апикальные микроворсинки. Клетки АТ2 имеют много известных функций, включая продукцию, секрецию и обратный захват легочного поверхностно-активного вещества, и синтез и секрецию иммуномодулирующих белков, важных для защиты хозяина. Маркеры для определения того, является ли клетка клеткой типа II, известны специалисту и, среди прочих, описываются McElroy and Kasper (2004) "The use of alveolar epithelial type I cell-selective markers to investigate lung injury and repair" *European Respiratory Journal* 24: 664-673. Например, для определения того, является ли клетка клеткой типа II, специалист может провести иммуногистохимический анализ для выявления экспрессии белка С, ассоциированного с поверхностно-активным веществом легких (SP-C). SP-C может иметь последовательность, как показано в SEQ ID NO. 11, или представлять собой последовательность, имеющую 70%-ную, 80%-ную, 90%-ную, 95%-ную, 99%-ную идентичность последовательности с последовательностью SEQ ID NO. 11.

Таким образом, эпителиальная клетка легкого, как здесь описано, может представлять собой клетку, которая экспрессирует SP-C. Указанная эпителиальная клетка легкого может представлять собой клетку, которая экспрессирует SP-C, как показано в SEQ ID NO. 11, или представлять собой последовательность, имеющую 70%-ную, 80%-ную, 90%-ную, 95%-ную, 99%-ную идентичность последовательности с последовательностью SEQ ID NO. 11.

Таким образом, эпителиальная клетка легкого, как здесь описано, также может включать клетки, которые экспрессируют SP-C, и клетки, которые экспрессируют α 2-изоформу Na^+/K^+ -АТФазы и/или GRAMD2.

Клетки типа I и типа II известны специалисту и, среди прочих, описываются Rackley et al. (2012) "Building and maintaining the epithelium of the lung" *The Journal of Clinical investigation*, vol. 122, no. 8, pp. 2724-2730, Crystal et al. (2008) "Airway epithelial cells" *Proc Am Thorac Soc*, vol. 5, pp. 772-777 и McElroy and Kasper (2004) "The use of alveolar epithelial type I cell-selective markers to investigate lung injury and repair" *European Respiratory Journal* 24: 664-673. Примечательно то, что НКА, как здесь описано, экспрессируется в клетках и АТ1, и АТ2.

Таким образом, эпителиальная клетка легкого может представлять собой клетку альвеолярного эпителия. Указанная эпителиальная клетка легкого также может представлять собой клетку типа I (АТ1) и/или типа II (АТ2).

Эпителиальная клетка легкого, как здесь раскрыто, также может представлять собой эпителиальную клетку легкого, предпочтительно клетку альвеолярного эпителия, инфицированную вирусом порядка *Articulavirales*, *Mononegavirales* и/или *Bunyavirales*. Кроме того, предусматривается, что эпителиальная клетка легкого, предпочтительно клетка альвеолярного эпителия, инфицирована вирусом семейства *Orthomyxoviridae* (порядок *Articulavirales*), *Arenaviridae*, *Hantaviridae*, *Myxoviridae*, *Nairoviridae*, *Peribunyaviridae*, *Phenuviridae* (порядок *Bunyavirales*), *Bornaviridae*, *Filoviridae*, *Paramyxoviridae* и/или *Sunviridae* (порядок *Mononegavirales*).

Также предусматривается, что эпителиальная клетка легкого, предпочтительно клетка альвеолярного эпителия, инфицирована вирусом рода *Alphainfluenzavirus*, *Betainfluenzavirus*, *Deltainfluenzavirus*, *Gammainfluenzavirus*, предпочтительно *Alphainfluenzavirus* (порядок *Articulavirales*; семейство *Orthomyxoviridae*), подсемейство *Mammantavirinae*, предпочтительно рода *Loan virus*, *Mobat virus*, *Orthohantavirus* или *Thottimvirus* (порядок *Bunyavirales*; семейство *Hantavirididae*), и/или рода *Pneumoviridae* (порядок *Mononegavirales*, семейство *Paramyxoviridae*).

Кроме того, предусматривается, что эпителиальная клетка легкого, предпочтительно клетка альвеолярного эпителия, инфицирована подтипом *H1N1-*, *H1N2-*, *H2N2-*, *H3N2-*, *H5N1-*, *H6N1-*, *H7N2-*, *H7N3-*, *H7N7-*, *H7N9*, *H9N2-*, *H10N7-*, *H10N8-* или *H5N1* (порядок *Articulavirales*; семейство *Orthomyxoviridae*, род *Alphainfluenzavirus*), вирусом *Puumala*, вирусом *Sin Nombre*, вирусом *Seoul*, вирусом *Hantaan*, вирусом *Dobrava-Belgrad*, вирусом *Saaremaa*, вирусом *Four corners* или вирусом *Andes* (порядок *Bunyavirales*; семейство *Hantavirididae*, подсемейство *Mammantavirinae*, род *Orthohantavirus*) или *Metapneumovirus*, *Orthopneumovirus*, такой как человеческий ортопневмовирус, подобный человеческому респираторно-синцитиальному вирусу *A*, человеческому респираторно-синцитиальному вирусу *B* или неклассифицированному человеческому респираторно-синцитиальному вирусу, собачьим пневмовирусом, кошачьим пневмовирусом, овечьим респираторно-синцитиальным вирусом, овечьим респираторно-синцитиальным вирусом (штамм *WSU 83-1578*), пневмовирусом, респираторно-синцитиальным вирусом, свиным пневмовирусом или видами рода *Pneumovirus* (порядок *Mononegavirales*, семейство *Paramyxoviridae*, род *Pneumoviridae*).

Также предусматривается, что эпителиальная клетка легкого, предпочтительно клетка альвеолярного эпителия, инфицирована 2 или более чем 2 разными вирусами,

как здесь раскрыто.

Специалист в данной области знает, как выявлять, инфицирована ли эпителиальная клетка легкого вирусом, как здесь раскрыто. Например, специалист может отобрать образец ткани эпителиальных клеток легкого. Затем специалист может провести ПЦР на данном образце для анализа того, присутствуют ли в данных клетках вирусные геномные последовательности или фрагменты последовательности интересующего вируса.

Моделью эпителиальных клеток легкого в общем является линия клеток Calu3 (клетки бронхиального эпителия человеческой аденокарциномы, получаемые из Американской коллекции типовых культур, Manassas, VA, США) в том виде, в котором она используется в Примерах и, среди прочего, как описано Peteranderl et al. (2019) "Influenza A virus infection induces apical redistribution of Na⁺, K⁺-ATPase in lung epithelial cells in vitro and in vivo" American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology Volume 61 Number 3, pp. 395-397.

Используемый здесь ингибитор ROCK может предотвращать апикальную локализацию NKA в эпителиальных клетках легкого. Как здесь раскрыто, NKA локализуется базолатерально в пределах или ассоциированно с плазматической мембраной поляризованных эпителиальных клеток легкого у здоровых субъектов. Базолатеральная локализация также может поддерживаться во время повреждения.

Примечательно, что эпителиальные клетки прикрепляются друг к другу через плотные контакты, десмосомы и адгезионные контакты, образуя слои клеток, которые выстилают поверхность тела животного/человека и внутренние полости (например, респираторный тракт, пищеварительный тракт и система кровообращения). Указанные клетки имеют апикально-базальную полярность, определяемую апикальной мембраной, обращенной к внешней поверхности тела или просвету внутренних полостей, и базолатеральной мембраной, ориентированной в сторону от просвета. Базолатеральная мембрана относится и к латеральной мембране, где соединения клетка-клетка соединяют соседние клетки, и к базальной мембране, где клетки присоединяются к базальной мембране – тонкому слою из белков внеклеточного матрикса, которая отделяет эпителиальный слой от подлежащих клеток и соединительной ткани (Wu and Mlodzik (2009). "A quest for the mechanism regulating global planar cell polarity of tissues". Trends in Cell Biology. 19 (7): 295–305).

Таким образом, термин «базолатеральный», когда он относится к клеточной

мембране, представляет собой фракцию плазматической мембраны, обращенную к соседним клеткам и подлежащей соединительной ткани. Точно так же термин «апикальный», относящийся к клеточной мембране, должен означать часть клеточной мембраны, обращенную к просвету полости.

На Фиг. 1 показано влияние ингибитора ROCK на локализацию NKA. В здоровых клетках NKA локализуется базолатерально. При вирусной инфекции NKA локализуется базолатерально, но также и апикально. Распределение NKA на мембране клеток Calu3, инфицированных вирусом гриппа А, может быть выявлено, например, способами оптической визуализации. Например, NKA может быть визуализирована посредством окрашивания антителами и конфокальной лазерной сканирующей микроскопии, как описано в Примере 7.

В настоящем изобретении также предусматривается, что ингибитор ROCK может уменьшать апикальную локализацию NKA в эпителиальных клетках легкого по сравнению с апикальной локализацией до введения указанного ингибитора ROCK.

Авторы данного изобретения неожиданно обнаружили, что вирусная инфекция приводит к апикальной локализации NKA в эпителиальных клетках легкого в дополнение к присутствующей в норме базолатеральной локализации NKA в эпителиальных клетках легкого. При введении ингибитора ROCK базолатеральная локализация NKA в эпителиальных клетках легкого может быть в основном восстановлена, тогда как апикальная локализация NKA в эпителиальных клетках легкого уменьшается по сравнению с ситуацией до введения ингибитора ROCK.

Таким образом, ингибитор ROCK приводит к снижению индуцированной вирусом апикально локализованной NKA в эпителиальных клетках легкого на 5%, 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% или 100% по сравнению с апикально локализованной NKA в эпителиальных клетках легкого, присутствующей до введения ингибитора ROCK.

Отек легких, как здесь раскрыто, ассоциирован с вирусной инфекцией, где указанный вирус принадлежит к порядку *Articulavirales*, *Mononegavirales* и/или *Bunyavirales*.

Вирус порядка *Articulavirales* предпочтительно принадлежит к семейству *Orthomyxoviridae*.

Вирус семейства *Orthomyxoviridae* может быть рода *Alphainfluenzavirus*, *Betainfluenzavirus*, *Deltainfluenzavirus*, *Gammainfluenzavirus*, *Isavirus*, *Quaranjavirus*, *Thogotovirus*, неклассифицированным *Orthomyxoviridae*.

Род *Alphainfluenzavirus* может представлять собой вирус гриппа А, несущий любую комбинацию гемагглютинина (НА) антигенного подтипа (Н_x) и нейраминидазы (НА) антигенного подтипа (N_y). Например, НА может представлять собой последовательность 12 или 13, или последовательность, имеющую 70%-ную, 75%-ную, 80%-ную, 85%-ную, 90%-ную, 95%-ную, 97%-ную, 98%-ную, 99%-ную идентичность последовательности с последовательностью SEQ ID NO. 11 или 12. Дополнительно или альтернативно, НА может представлять собой последовательность 14 или 15, или последовательность, имеющую 70%-ную, 75%-ную, 80%-ную, 85%-ную, 90%-ную, 95%-ную, 97%-ную, 98%-ную, 99%-ную идентичность последовательности с последовательностью SEQ ID NO. 14 или 15.

Неограничивающие примеры *Alphainfluenzavirus* включают подтип *H1N1*, *H1N2*, *H2N2*, *H3N2*, *H5N1*, *H6N1*, *H7N2*, *H7N3*, *H7N7*, *H7N9*, *H9N2*, *H10N7*, *H10N8* или *H5N1*. В одном воплощении вирус гриппа А принадлежит к подтипу *H1N1*. В других воплощениях вирус гриппа А принадлежит к подтипам *H3N2*, *H5N1* и *H7N9*. Вирус гриппа А также может быть подтипа *H3N2*, *H5N1*, *H1N1* и *H7N9*. Вирус гриппа А также может представлять собой штамм вируса гриппа *A/Puerto Rico/8/34 (H1N1)*.

Данный вирус может принадлежать к порядку *Bunyavirales*. Специалисту известно, какой вирус попадает в порядок *Bunyavirales*. Все *Bunyavirales* имеют геном на основе отрицательной смысловой РНК, который сегментирован на три части.

Вирус порядка *Bunyavirales* может принадлежать к семейству *Arenaviridae*, *Hantaviridae*, *Mypoviridae*, *Nairoviridae*, *Peribunyaviridae* или *Phenuviridae*.

Вирус семейства *Arenaviridae* может принадлежать к роду *Mammarenavirus*. Неограничивающие примеры рода *Mammarenavirus* включают, среди прочих, виды *Ippu-Virus* (IPPYV), *Lassa-Virus* (LASV), *Lujo-Virus* (LUJV), *Lunk-Virus* (NKS-1), вирус лимфоцитарного хориоменингита (LCMV), *Mobala-Virus* (MOBV) и *Mopeia-Virus* (вирус Мопейя, MOPV).

Вирус порядка *Bunyavirales* предпочтительно принадлежит к семейству *Hantaviridae*. Вирус семейства *Hantaviridae* может принадлежать к подсемейству *Mammantavirinae*. Вирус подсемейства *Mammantavirinae* может быть рода *Loan virus*, *Mobat virus*, *Orthohantavirus* или *Thottimvirus*.

Род *Orthohantavirus*, среди прочих, включает вирус *Puumala*, вирус *Sin Nombre*, вирус *Seoul*, вирус *Hantaan*, вирус *Dobrava-Belgrad*, вирус *Saaremaa*, вирус *Four corners* и вирус *Andes*.

Вирус семейства *Nairoviridae* может быть рода *Orthonaivirus* или *Striavirus*. Ортонаиовирус может принадлежать к виду ортонаиовируса конго-крымской геморрагической лихорадки (СCHFV).

Вирус семейства *Peribunyaviridae* может быть рода *Orthobunyavirus* или *Pacivirus*.

Род *Orthobunyavirus* может включать виды *Aino orthobunyavirus*, *Akabane orthobunyavirus*, *Anhembi orthobunyavirus*, *Anopheles B orthobunyavirus*, *Batai orthobunyavirus*, *Batama orthobunyavirus*, *Bertioga orthobunyavirus*, *Bunyamwera orthobunyavirus*, *Buttonwillow orthobunyavirus*, *Bwamba orthobunyavirus*, *Cache Valley orthobunyavirus*, *Cachoeira Porteira orthobunyavirus*, *Capim orthobunyavirus*, *Caraparu orthobunyavirus*, *Catu orthobunyavirus*, *Fort Sherman orthobunyavirus*, *Gamboa orthobunyavirus*, *Guama orthobunyavirus*, *Guaroa orthobunyavirus*, *Iaco orthobunyavirus*, *Ilesha orthobunyavirus*, *Ingwavuma orthobunyavirus*, *Jatobal orthobunyavirus*, *Kaeng Khoi orthobunyavirus*, *Keystone orthobunyavirus*, *La Crosse orthobunyavirus*, *Macaua orthobunyavirus*, *Madrid orthobunyavirus*, *Maguari orthobunyavirus*, *Manzanilla orthobunyavirus*, *Marituba orthobunyavirus*, *Mermet orthobunyavirus*, *Oriboca orthobunyavirus*, *Oropouche orthobunyavirus*, *Patois orthobunyavirus*, *Peaton orthobunyavirus*, *Sabo orthobunyavirus*, *Sango orthobunyavirus*, *Sathuperi orthobunyavirus*, *Schmallenberg orthobunyavirus*, *Shuni orthobunyavirus*, *Simbu orthobunyavirus*, *Snowshoe hare orthobunyavirus*, *Sororoca orthobunyavirus*, *Tahyna orthobunyavirus*, такой как *Tahyna virus (TAHV)*, *Tataguine orthobunyavirus*, *Tete orthobunyavirus*, *Utinga orthobunyavirus*, *Wolkberg orthobunyavirus*, *Wyeomyia orthobunyavirus* или *Zegla orthobunyavirus*. Род *Orthobunyavirus* также может включать вирус *Baakal (BKAV)*.

Род *Pacivirus* может включать виды вирус *Pacui (PACV)*, вирус *Rio Preto da Eva (RPEV)* и вирус *Tapirape (TPPV)*.

Вирус семейства *Phenuiviridae* принадлежит к роду *Banyangvirus*, *Goukovirus* или *Phlebovirus*.

Род *Phlebovirus* может относиться к виду *tick-borne Phlebovirus*.

Вирус порядка *Mononegavirales* может принадлежать к семейству *Bornaviridae*, *Filoviridae*, *Paramyxoviridae* или *Sunviridae*. Например, вирус порядка *Mononegavirales* может быть рода *Pneumoviridae*.

Вирус семейства *Bornaviridae* может быть рода *Carbovirus*, *Orthobornavirus* или неклассифицированным *Bornaviridae*.

Вирус семейства *Filoviridae* может быть рода *Cuevavirus*, *Ebolavirus* или *Marburgvirus*.

Вирус семейства *Paramyxoviridae* может быть рода *Avualvirinae*, *Avulavirus*, *Orthoparamyxovirinae*, *Rubulavirinae*, *Rubulavirus*, неклассифицированный *Paramyxoviridae*, *Metapneumovirus*, *Orthopneumovirus* или *Pneumoviridae*.

Вирус рода *Pneumoviridae* может представлять собой *Metapneumovirus*, *Orthopneumovirus*, такой как человеческий ортопневмовирус, подобный человеческому респираторно-синцитиальному вирусу А, человеческому респираторно-синцитиальному вирусу В или неклассифицированному человеческому респираторно-синцитиальному вирусу, собачий пневмовирус, кошачий пневмовирус, овечий респираторно-синцитиальный вирус, овечий респираторно-синцитиальный вирус (штамм WSU 83-1578), пневмовирус, респираторно-синцитиальный вирус, свиной пневмовирус или вид рода *Pneumovirus*.

Таким образом, вирус, как здесь раскрыто, может представлять собой вирус семейства *Orthomyxoviridae* (порядок *Articulavirales*), *Arenaviridae*, *Hantaviridae*, *Myoviridae*, *Nairoviridae*, *Peribunyaviridae*, *Phenuviridae* (порядок *Bunyavirales*), *Bornaviridae*, *Filoviridae*, *Paramyxoviridae* или *Sunviridae* (порядок *Mononegavirales*).

Таким образом, вирус, как здесь раскрыто, может представлять собой вирус рода *Alphainfluenzavirus*, *Betainfluenzavirus*, *Deltainfluenzavirus*, *Gammainfluenzavirus*, предпочтительно *Alphainfluenzavirus* (порядок *Articulavirales*; семейство *Orthomyxoviridae*), подсемейство *Mammantavirinae*, предпочтительно род вирус *Loan*, вирус *Mobat*, *Orthohantavirus* или *Thottimvirus* (порядок *Bunyavirales*; семейство *Hantaviridae*) или род *Pneumoviridae* (порядок *Mononegavirales*, семейство *Paramyxoviridae*).

Таким образом, вирус, как здесь раскрыто, может представлять собой подтип *H1N1*, *H1N2*, *H2N2*, *H3N2*, *H5N1*, *H6N1*, *H7N2*, *H7N3*, *H7N7*, *H7N9*, *H9N2*, *H10N7*, *H10N8* или *H5N1* (порядок *Articulavirales*; семейство *Orthomyxoviridae*, род *Alphainfluenzavirus*), вирус *Puumala*, вирус *Sin Nombre*, вирус *Seoul*, вирус *Hantaan*,

вирус *Dobrava-Belgrad*, вирус *Saaremaa*, вирус *Four corners* или вирус *Andes* (порядок *Bunyavirales*; семейство *Hantaviridae*, подсемейство *Mammantavirinae*, род *Orthohantavirus*) или *Metapneumovirus*, *Orthopneumovirus*, такой как человеческий ортопневмовирус, подобный человеческому респираторно-синцитиальному вирусу А, человеческому респираторно-синцитиальному вирусу В или неклассифицированному человеческому респираторно-синцитиальному вирусу, собачий пневмовирус, кошачий пневмовирус, овечий респираторно-синцитиальный вирус, овечий респираторно-синцитиальный вирус (штамм WSU 83-1578), пневмовирус, респираторно-синцитиальный вирус, свиной пневмовирус или вид рода *Pneumovirus* (порядок *Mononegavirales*, семейство *Paramyxoviridae*, род *Pneumoviridae*).

Предусматривается, что ингибитор ROCK уменьшает вирусную нагрузку по сравнению с вирусной нагрузкой до введения ингибитора ROCK. Например, вирусная нагрузка может определяться измерением бляшкообразующих единиц (pfu)/мл.

В данном контексте «уменьшение вирусной нагрузки» может означать, что число вирусных частиц или инфекционных частиц на мл уменьшается по меньшей мере на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% или 100% по сравнению с числом инфекционных частиц, присутствующих до введения ингибитора ROCK.

Кроме того, предусматривается, что ингибитор ROCK может уменьшать массу жидкости легкого по сравнению с массой жидкости легкого, присутствующей до введения ингибитора ROCK. Как может быть измерена указанная масса жидкости, описывается в Примерах.

Также предусматривается, что ингибитор ROCK уменьшает инфильтрацию макрофагов в легкое по сравнению с инфильтрацией макрофагов в легкое до введения ингибитора ROCK. Как может быть измерена указанная инфильтрация макрофагов, описывается в Примерах.

Настоящее изобретение также относится к применению системы анализа *in vitro*, содержащей культивируемые эпителиальные клетки легкого, инфицированные вирусом порядка *Articulavirales*, *Mononegatvirales* и/или *Bunyavirales*, предпочтительно вирусом гриппа, для определения ингибиторов, эффективных в предупреждении или уменьшении апикальной локализации НКА в эпителиальных клетках легкого. Предпочтительно данный ингибитор представляет собой ингибитор ROCK, как здесь описано.

Ингибитор, анализируемый в данной системе анализа, уменьшает апикальную

локализацию НКА в эпителиальных клетках легкого при приведении данного ингибитора в контакт с системой анализа *in vitro* по сравнению с апикальной локализацией НКА, присутствующей в системе анализа *in vitro* до указанного приведения в контакт.

Данные системы анализа *in vitro* могут представлять собой любую подходящую систему анализа *in vitro*, содержащую культивируемые эпителиальные клетки легкого, инфицированные вирусом порядка *Articulavirales*, *Mononegatvirales* и/или *Bunyavirales*, предпочтительно вирусом гриппа. Данный вирус гриппа может представлять собой штамм вируса гриппа *A/Puerto Rico/8/34 (H1N1)*. Указанные культивируемые клетки могут представлять собой клетки Calu-3, культивируемые, например, как описано в Примере 1.

Культивируемые эпителиальные клетки легкого могут представлять собой эпителиальные клетки легкого человека. Указанные эпителиальные клетки легкого можно высевать при плотности в среде примерно 1×10^5 , 2×10^5 , 3×10^5 , 4×10^5 , 5×10^5 , 6×10^5 , 7×10^5 , 8×10^5 , 9×10^5 , 10×10^5 , 11×10^5 .

Термин «приведение в контакт» в том виде, как он здесь используется, относится к приведению инфицированных вирусом культивируемых эпителиальных клеток легкого в тесную пространственную близость с представляющим интерес ингибитором. Это, например, может означать, что представляющий интерес ингибитор вносится в среду, в которой находятся культивируемые клетки, посредством шприца. Как здесь описано, стадия приведения в контакт культивируемых эпителиальных клеток легкого с вирусом проводится перед добавлением данного ингибитора к культивируемым эпителиальным клеткам легкого.

Таким образом, применение системы анализа *in vitro*, содержащей культивируемые эпителиальные клетки легкого, инфицированные вирусом гриппа, может включать приведение в контакт данной системы анализа с ингибитором, подлежащим анализу (представляющим интерес ингибитором).

Если приведение системы анализа в контакт с ингибитором приводит к уменьшению апикальной локализации НКА в эпителиальных клетках легкого по сравнению с апикальной локализацией НКА, присутствующей до ее приведения в контакт с ингибитором, данный ингибитор является эффективным в уменьшении апикальной локализации НКА в эпителиальных клетках легкого.

Предусматривается, что ингибитор ROCK уменьшает апикальную локализацию НКА в эпителиальных клетках легкого при его контакте с системой анализа *in vitro*, где указанная система анализа содержит культивируемые эпителиальные клетки легкого, инфицированные вирусом, как здесь описано, по сравнению с указанной системой анализа *in vitro* до указанного приведения в контакт.

Настоящее изобретение также относится к композиции, содержащей ингибитор ROCK, для применения в способе профилактики и/или лечения отека легких посредством

1) предупреждения апикальной локализации НКА в эпителиальных клетках легкого или

2) уменьшения апикальной локализации НКА в эпителиальных клетках легкого по сравнению с апикальной локализацией НКА, присутствующей до введения ингибитора ROCK,

где отек легких ассоциирован с вирусной инфекцией, и где указанный вирус принадлежит к порядку *Articulavirales*, *Mononegavirales* и/или *Bunyavirales*.

Композиция, содержащая ингибитор ROCK, может представлять собой фармацевтическую композицию. Предпочтительно такие композиции дополнительно содержат носитель, предпочтительно фармацевтически приемлемый носитель. Данная композиция может находиться в форме вводимых перорально суспензий или таблеток; назальных спреев, стерильных инъеклируемых препаратов (внутривенно, внутривенно, внутримышечно), например, в виде стерильных инъеклируемых водных или масляных суспензий или суппозиториев. Для перорального введения в виде суспензии данные композиции получают согласно доступным методикам в области изготовления фармацевтических препаратов, и они могут содержать микрокристаллическую целлюлозу для придания объема, альгиновую кислоту или альгинат натрия в качестве суспендирующего агента, метилцеллюлозу в качестве усилителя вязкости и подсластители/корригенты, известные в данной области. В виде таблеток с немедленным высвобождением данные композиции могут содержать микрокристаллическую целлюлозу, дикальция фосфат, крахмал, стеарат магния и лактозу и/или другие эксципиенты, связующие вещества, наполнители, разрыхлители, разбавители и смазывающие вещества, известные в данной области. Инъеклируемые растворы или суспензии могут быть приготовлены согласно известному уровню техники с использованием подходящих нетоксичных приемлемых для парентерального

введения разбавителей или растворителей, таких как маннит, 1,3-бутандиол, вода, раствор Рингера или изотоничный раствор хлорида натрия, или подходящих диспергирующих или увлажняющих и суспендирующих средств, таких как стерильные смешанные нелетучие масла, включающие синтетические моно- или диглицериды, и жирные кислоты, включающие олеиновую кислоту. Данный ингибитор или ингибиторы предпочтительно вводят в терапевтически эффективном количестве.

Настоящее изобретение также относится к способу лечения субъекта, имеющего отек легких или подверженного риску отека легких, посредством предотвращения ассоциированной с РНК-вирусом апикальной локализации НКА в эпителиальных клетках легкого.

Термин «субъект» в том виде, как он здесь используется, может относиться к любому подходящему субъекту. Предпочтительно термин «субъект» в том виде, как он здесь используется, относится к млекопитающему. Данный субъект может представлять собой собаку, кошку, лошадь, овцу, козу, крупный рогатый скот или человеческого субъекта, предпочтительно человеческого субъекта. Данный субъект может представлять собой субъекта, имеющего отек легких, как здесь описано. Данный субъект может представлять собой субъекта, инфицированного вирусом порядка *Articulavirales*, *Mononegavirales* и/или *Bunyavirales*. Предпочтительно данный субъект представляет собой субъекта, инфицированного одним или более чем одним вирусом *Orthomyxoviridae*, *Pneumoviridae* и/или *Hantaviridae*. Например, он может представлять собой субъекта, инфицированного вирусом гриппа, таким как вирус гриппа А.

«Субъект, подверженный риску инфицирования» в том виде, как здесь используется данный термин, может представлять собой субъекта, подверженного риску развития отека легких, как описано в данном документе. Данный субъект может быть подвержен риску инфицирования вирусом порядка *Articulavirus*, *Mononegavirales* и/или *Bunyavirales*. Предпочтительно данный субъект представляет собой субъекта, подверженного риску инфицирования одним или более чем одним вирусом *Orthomyxoviridae*, *Pneumoviridae* и/или *Hantaviridae*. Например, он может представлять собой субъекта, подверженного риску инфицирования вирусом гриппа, таким как вирус гриппа А.

Кроме того, предусматривается, что указанный субъект представляет собой субъекта, инфицированного, или субъекта, подверженного риску инфицирования

вирусом семейства *Orthomyxoviridae* (порядок *Articulavirales*), *Arenaviridae*, *Hantaviridae*, *Myoviridae*, *Nairoviridae*, *Peribunyaviridae*, *Phenuviridae* (порядок *Bunyavirales*), *Bornaviridae*, *Filoviridae*, *Paramyxoviridae* или *Sunviridae* (порядок *Mononegavirales*).

Также предусматривается, что указанный субъект представляет собой субъекта, инфицированного, или субъекта, подверженного риску инфицирования вирусом рода *Alphainfluenzavirus*, *Betainfluenzavirus*, *Deltainfluenzavirus*, *Gammainfluenzavirus*, предпочтительно *Alphainfluenzavirus* (порядок *Articulavirales*; семейство *Orthomyxoviridae*), подсемейство *Mammantavirinae*, предпочтительно рода вирус *Loan*, вирус *Mobat*, *Orthohantavirus* или *Thottimvirus* (порядок *Bunyavirales*; семейство *Hantavirididae*), или рода *Pneumoviridae* (порядок *Mononegavirales*, семейство *Paramyxoviridae*).

Кроме того, предусматривается, что указанный субъект представляет собой субъекта, инфицированного, или субъекта, подверженного риску инфицирования подтипом *H1N1*, *H1N2*, *H2N2*, *H3N2*, *H5N1*, *H6N1*, *H7N2*, *H7N3*, *H7N7*, *H7N9*, *H9N2*, *H10N7*, *H10N8* или *H5N1* (порядок *Articulavirales*; семейство *Orthomyxoviridae*, род *Alphainfluenzavirus*), вирусом *Puumala*, вирусом *Sin Nombre*, вирусом *Seoul*, вирусом *Hantaan*, вирусом *Dobrava-Belgrad*, вирусом *Saaremaa*, вирусом *Four corners* или вирусом *Andes* (порядок *Bunyavirales*; семейство *Hantavirididae*, подсемейство *Mammantavirinae*, род *Orthohantavirus*) или *Metapneumovirus*, *Orthopneumovirus*, такой как человеческий ортопневмовирус, подобный человеческому респираторно-синцитиальному вирусу *A*, человеческому респираторно-синцитиальному вирусу *B* или неклассифицированному человеческому респираторно-синцитиальному вирусу, собачьим пневмовирусом, кошачьим пневмовирусом, овечьим респираторно-синцитиальным вирусом, овечьим респираторно-синцитиальным вирусом (штамм *WSU 83-1578*), пневмовирусом, респираторно-синцитиальным вирусом, свиным пневмовирусом или видами рода *Pneumovirus* (порядок *Mononegavirales*, семейство *Paramyxoviridae*, род *Pneumoviridae*).

Также предусматривается, что указанный субъект представляет собой субъекта, инфицированного 2 или более чем 2 вирусами, как здесь раскрыто.

Настоящее изобретение также относится к способу выявления молекул, эффективных в профилактике и/или лечении отека легких, включающему приведение системы анализа *in vitro*, содержащей культивируемые эпителиальные клетки легкого,

инфицированные вирусом порядка *Articulavirales*, *Mononegavirales* и/или *Bunyavirales*, предпочтительно вирусом гриппа, в контакт с представляющим интерес соединением, где указанное представляющее интерес соединение уменьшает апикальную локализацию НКА в эпителиальных клетках легкого по сравнению с системой анализа *in vitro* до указанного приведения в контакт.

Указанное представляющее интерес соединение может представлять собой ингибитор ROCK, как здесь описано. Соответственно, данный способ может включать следующие стадии: (1) выявление клеточной локализации НКА на эпителиальных клетках легкого, инфицированных вирусом порядка *Articulavirales*, *Mononegavirales* и/или *Bunyavirales*, предпочтительно вирусом гриппа, в системе анализа *in vitro*, как здесь описано, (2) приведение данной системы анализа *in vitro* в контакт с представляющим интерес соединением, (3) выявление клеточной локализации НКА на эпителиальных клетках легкого после приведения системы анализа *in vitro* в контакт с указанным представляющим интерес соединением со стадии (3), и (4) проведение анализа локализации (т.е. миграции) НКА в системе анализа *in vitro* после приведения в указанный контакт, где уменьшение апикальной локализации НКА по сравнению с апикальной локализацией НКА перед приведением в контакт указывает на то, что данный ингибитор является эффективным в профилактике и/или лечении отека легких.

Настоящее изобретение также относится к системе анализа, содержащей:

- 1) ингибитор ROCK;
- 2) эпителиальные клетки легкого;
- 3) вирус порядка *Articulavirales*, *Mononegavirales* и/или *Bunyavirales*; и
- 4) средство для выявления и клеточной локализации НКА.

«Средством для выявления и клеточной локализации НКА» в том виде, как здесь используется данный термин, может быть любое подходящее средство. Такие средства известны специалисту. Например, специалист может использовать данные средства, как описано в Примерах.

В настоящем раскрытии приводилась ссылка на следующие последовательности.

SEQ	Что	Последовательность
1	№ Uniprot P05026 субъединица бета-1 натрий/калий-	MARGKAKEEGSWKKFIWNSEKKEFLGRTGGSWFKILLFYVIFY GCLAGIFIGTIQVMLLTISEFKPTYQDRVAPPGLTQIPQIQKTEISF RPNDPKSYEAYVLNIVRFLEKYKDSAQRDDMIFEDCGDVPSEP KERGDFNHERGERKVCRFKLEWLGNC SGLNDETYGYKEGKPC IIKLNRLVLFKPKPPKNESLETYPVMKYNPNVLPVQCTGKRDE

	транспортирующей АТФазы <i>Homo sapiens</i>	DKDKVGNVEYFGLGNSPGFPLQYYPPYYGKLLQPKYLQPLLAVQFTNL TMDTEIRIECKA YGENIGYSEKDRFQGRFDVKIEVKS
2	№ Uniprot P14415 субъединица бета-2 натрий/калий-транспортирующей АТФазы <i>Homo sapiens</i>	MVIQKEKKSCGQVVEEWKEFVWNPRTHQFMGRGTGTSWAFILLYLVFYGFLLTAMFTLTMWVMLQTVSDHTPKYQDRLATPGLMIRPKTENLDVIVNVSDESVDQHVQKLNKFLPEYNDISQAQKNDVCRPGRYEYEQPDNGVLNYPKRACQFNRTQLGNCSGIGDSTHYGYSTGQPCVFIKMNRVINFYAGANQSMNVTCAGKRDEDAENLGNFVMFPANGNIDLMYFPYYGKKFHVNYTQPLVAVKFLNVTPNVEVNVCECRINAANIATDDERDKFAGRVAFKLRINKT
3	№ Uniprot P54709 субъединица бета-3 натрий/калий-транспортирующей АТФазы <i>Homo sapiens</i>	MTKNEKKSLSLQSLAEWKLFIYNPTTGEFLGRTAKSWGLILLFYLVFYGFLLAALFSFTMWVMLQTLNDEVPKYRDQIPSPGLMVFPKPVTALEYTFRSRSDPTS YAGYIEDLKKFLKPYTLEEKQNLTVCPD GALFEQKGPVYVACQFPISLLQACSGMNDPDFGYSQGNPCILV KMNRIIGLKPEGVPRIDCVSKNEDIPNVAVYPHNGMIDLKYPY YGKKLHVGYLQPLVAVQVSFAPNNTGKEVTVECKIDGSANLK SQDDRDKFLGRVMFKITARA
4	№ Uniprot P05023 субъединица альфа-1 натрий/калий-транспортирующей АТФазы <i>Homo sapiens</i>	MGKGVGRDKYEPAAVSEQGDKKGKKGKKDRDMDELKKEVS MDDHKLSDDELHRKYGTDLSRGLTSARAAEILARDGPNALTPP PTTPEWIKFCRQLFGGFSMLLWIGAILCFLAYSIAATEEPEQND NL YLGVVLSAVVIITGCFSSYYQEAKSSKIMESFKNMVPQQALVI RNGEKMSINAEV VVGDLVEVKGGDRIPADLRISANGCKVDN SSLTGESESPQTRSPDFTNENPLETRNIAFFSTNCVEGTARGIVVY TGDRTVMGRIATLASGLEGGQTPIAAEIEHFIIITGVAVFLGVS FFILSLILEYTWLEAVIFLIGIIVANVPEGLLATVTVCLTLTAKRM ARKNCLVKNLEAVETL GSTSTICSDKTGTLTQNRMTVAHMWF DNQIHEADTTENQSGVSFDKTSATWLALSRIAGLCNRAVFQAN QENLPILKRAVAGDASESALLKCIELCCGSVKEMRERYAKIVEI PFNSTNKYQLSIHKNPNTSEPHLLVMKGAPERILDRCSSILLHG KEQPLDEELKDAFQNAYLELGGLGERVLGFCHLFLPDEQFPEG FQFDTDDVNFIDNLCFVGLISMIDPPRAAVPDAVGKCRSAGIK VIMVTGDHPITAKAIAGVGIIEGNETVEDIAARLNIPVSQVNP RDAKACVVHGSCLKDMTSEQLDDILKYHTEIVFARTSPQQKLI VEGCQRQGAIVAVTGDGVNDSPALKKADIGVAMGIAGSDVSK QAADMILLDDNFASIVTGVEEGRLIFDNLKKSIA YTLTSNIPFITP FLIFIIANIPLPLGTVTILCIDLGTDMVPAISLAYEQAESDIMKRQP RNPKTDKLVNERLISMA YGQIGMIQALGGFFTYFVILAENGLPI HLLGLRVDWDDR WINDVEDSYGQQWTYEQRKIVEFTCHTAFF VSIVVVQWADLVICKTRRNSVFQQGMKNKILIFGLFEETALAALF LSYPGGMGVALRMYPLKPTWWFCAPYSLLIFVYDEVKLIIR RRPGGWVEKETYY
5	№ Uniprot P50993	MGRGAGREYSPAATTAENGGGKKKQKEKELDELKKEVAMDD HKLSLDELGRKYQVDLSKGLTNQRAQDVLARDGPNALTPPPTT

	субъединица альфа-2 натрий/калий-транспортной АТФазы	PEWVKFCRQLFGGFSILLWIGAILCFLAYGIQAAMEDEPSNDNL YLGVVLAADVIVTGCFSYYQEAKSSKIMDSFKNMVPPQAL VIR EGEKMQINAEV VVVGDLVEVKGGDRVPADLRISSHGCKVDNS SLTGESEPQTRSPEFTHENPLETRNICFFSTNCVEGTARGIVATG DRTVMGRIATLASGLEVGRTPIAMEIEHFIQLITGVAVFLGVSFF VLSLILGYSWLEAVIFLIGIIVANVPEGLLATVTVCLTLTAKRMA RKNCLVKNLEAVETLGTSTICSDKTGTLTQNRMTVAHMWFD NQIHEADTTEDQSGATFDKRSPTWTAL SRIAGLCNRAVFKAGQ ENISVSKRDTAGDASESALLKCIELSCGSVRKMRDRNPKVAEIP FNSTNKYQLSIHEREDSPQSHVLMKGA PERILDR CSTILVQGGK EIPLDKEMQDAFQNA YM ELGGLGERVLGFCQLNLP SGKFPRGFKFD TDELNFPTEKLCFVG LMSMIDPPRAAVPDAVGKCRSAGIKVIMVTGDHPITAKAIAKG VGIISEGNETVEDIAARLNIPMSQVNPREAKACVVHGS DLKDM TSEQLDEILKNHTEIVFARTSPQQKLIIVEGCQRQGAIVAVTGDG VNDSPALKKADIGIAMGISGSDVSKQAADMILLDDNFASIVTGV EEGRLIFDNLKKSIA YTLTSNIPEITPFLLFIIANIPLPLGTVTILCID LGTDMVPAISLAYEAAESDIMKRQPRNSQTDKLVNERLISMAY GQIGMIQALGGFFTYFVILAENGFLPSRLLGIRLDWDDRTMNDL EDSYGQEWTYEQRKVVEFTCHTAFFASIVVVQWADLIICKTRR NSVFQQGMKNKILIFGLLEETALAAFLSYCPGMGVALRMYPLK VTWWFCAFPYSLLIFIYDEV RKLILRRYPGGWVEKETYY
6	№ Uniprot P13637 субъединица альфа-3 натрий/калий-транспортной АТФазы	MGDKKDDKDSPKKNKGKERDLDLKKKEVAMTEHKMSVEEV CRKYNTDCVQGLTHSKAQEILARDGPNALTPPPTTPEWVKFCR QLFGGFSILLWIGAILCFLAYGIQAGTEDDPSGDNL YLGVVLAADV VIITGCFSYYQEAKSSKIMESFKNMVPPQALVIREGEKMQVNA EEVVVGDLVEIKGGDRVPADLRIISAHGCKVDNSSLTGESEPQT RSPDCTHDNPLETRNITFFSTNCVEGTARGVVVATGDRTVMGR IATLASGLEVGKTPIAIEIEHFIQLITGVAVFLGVSFFILSLILGYT WLEAVIFLIGIIVANVPEGLLATVTVCLTLTAKRMARKNCLVKN LEAVETLGTSTICSDKTGTLTQNRMTVAHMWFDNQIHEADTT EDQSGTSFDKSSHTWVALSHIAGLCNRAVFKGGQDNIPVLKRD VAGDASESALLKCIELSSGSVKLMRERNKKVAEIPFNSTNKYQL SIHETEDPNDNRYLLVMKGA PERILDR CSTILLQKQEQLDEEM KEAFQNA YLELGGGLGERVLGFCHYYLPEEQFPKGF AFDCDDVN FTTDNLCFVGLMSMIDPPRAAVPDAVGKCRSAGIKVIMVTGDH PITAKAIAKGVGIISEGNETVEDIAARLNIPVSQVNP RDAKACVI HGTDLKDF TSEQIDEILQNHTEIVFARTSPQQKLIIVEGCQRQGA IVAVTGDGVNDSPALKKADIGVAMGIAGSDVSKQAADMILLD DNFASIVTGV EEGRLIFDNLKKSIA YTLTSNIPEITPFLLFIMANIP LPLGTITILCIDLGTDMVPAISLAYEAAESDIMKRQPRNPRTDKLVNERLISMAYGQIGMIQALGGFFSYFVILAENGFLPGNLV GIRL NWDDRTVNDLED SYGQQW TYEQRKVVEFTCHTAFFVSIVVVQ WADLIICKTRRNSVFQQGMKNKILIFGLFEETALAAFLSYCPGM DVALRMYPLKPSWWFCAFPYSFLIFVYDEIRKLILRRNPPGGWV EKETYY
7	№ Uniprot Q13733 субъединица	MGLWGKKGTVAPHDQSPRRRPKGLIKKKMKREKQKRNME ELKKEVVMDDHKL TLEELSTKYSVDLTKGHSHQRAKEILTRGG PNTVTPPPTTPEWVKFCRQLFGGFSLLLWTGAILCFVAYSIIQYF

	альфа-4 натрий/калий- транспорти- рующей АТФазы <i>Homo sapiens</i>	NEEPTKDNLYLSIVLSVVVIVTGCFSYYQEAKSSKIMESFKNMV PQQALVIRGGCEKMQINVQEVVLGDLVEIKGGDRVPADLRLISA QGCKVDNSSLTGESEPPSRSPDFTHENPLETRNICFFSTNCVEGT ARGIVATGDSTVMGRIASLTSGLAVGQTPIAAEIEHFIHLITVVA VFLGVTFALSLLLGYGWLEAIIFLIGIIVANVPEGLLATVTVCL TLTAKRMARKNCLVKNLEAVETLGGSTSTICSDKTGTLTQNRMT VAHMWFDMTVYEADTTEEQTGKTFTKSSDTWFMLARIAGLCN RADFKANQEILPIAKRATTGDASESALLKFIEQSYSSVAEMREK NPKVAEIPFNSTNKYQMSIHLREDSSQTHVLMKGAPERILEFC STFLLNGQEYSMNDEMKEAFQNAYLELGGGLGERVLGFCFLNLP SSFSKGFNFNTDEINFPMDNLCFVGLISMIDPPRAAVPDAVSKCR SAGIKVIMVTGDHPITAKAIAGVGIIEGTTETAEEVAARLKIPIS KVDASAAKAIVVHGAELKDIQSKQLDQILQNHPEIVFARTSPQQ KLIIVEGCQRLGAVVAVTGDGVNDSPALKKADIGIAMGISGSD VSKQAADMILLDDNFASIVTGVVEEGRIFDNLKKSIMYTLTSNIP EITPFLMFIILGIPLPLGTITILCIDLGTDMVPAISLAYESAESDIMK RLPRNPKTDNLVNHRLIGMAYGQIGMIQALAGFFTYFVILAEN GFRPVDLLGIRLHWEDKYLNDLEDSYGQQWTYEQRKVVEFTC QTAFVTVVQWADLIISKTRNSLFFQGMNRNKVLIFGILEETL LAAFLSYTPGMDVALRMYPLKITWWLCAIPYSILIFVYDEIRKL LIRQHPDGWVERETYY
8	№ Uniprot P17302 Белок альфа-1 целевого контакта <i>Homo sapiens</i>	MGDWSALGKLLDKVQAYSTAGGKVWLSVLFIFRILLGTAVES AWGDEQSAFRCNTQQPGCENVCYDKSFPISHVRFWVLQIIFVS VPTLLYL AHVFYVMRKEEKLNKKEEELKVAQTDGVNNDMHL KQIEIKKFKYGIEEHGKVKMRGGLLRTYIISILFKSIFEVAFLLIQ WYIYGFSLSAVYTCKRDPCPHQVDCFLSRPTEKTIFIFMLVVSL VSLALNIELFYVFFKGVKDRVKGKSDPYHATSGALSPAKDCGS QKYAYFNGCSSPTAPLSPMSPPGYKLVTDGDRNNSCRNYNKQA SEQNWANYSAEQNRMGQAGSTISNSHAQPFDFPDDNQNSKKL AAGHELQPLAIVDQRPSSRASSRASSRPRPDDLEI
9	№ Uniprot Q8IU3 Белок 2A, содержащий домен HUMAN GRAM (GRAMD2A)	MTALSRSEATEEGGNQMQMHRKTASLNSPVSCKEKPDRVEEPPD YSLHWPEGLKGEEIKCGREGITLNKYNQQYHKLKDFVPLEEV VLKVCSCALQRDFLLQGRLYISPNWLCFHASLFGKDIKVVIPVV SVQMIKKHKMARLLPNGLAITNTSOKYIFVSLSRDSVYDLLR RVCTHLQPSSKSLSVREFSGEPESLEVLIPEMKWRKVCPSRSL SLPDNIPCIPPSSVDSTDSFFPSRKPPMSEK SRAQVASENGGRWA WPMPGWGPACPKKMPNCSPTAKNAVYEEDELEEEPRSTGELR LWDYRLLKVVFLICFLVMSSSYLAFRISRLEQQLCSLSWDDPV PGHR
10	№ Uniprot Q96HH9 Белок 2B, содержащий домен GRM2B_HUM AN GRAM (GRAMD2B)	MTELQDVEDTKPAKVLGKRESKLGSAHSEAENGVEEKKKAC RSPTAQSPTPSVEADSPDQKKIISLWSKSSFDGASLADKNDCK TESKNDPKTERKSSSSSQYKANMHFKLFLSVPTEEPLKQSFT CALQKEILYQGKLFVSENWICFHSKVFVKDTKISIPAFSVTLIKK TKTALLVPNALIATVTDRIYFVSLSRDSTYKLLKSVCGHLENT SVGNSPNPSSAENSFRADRPSSLPLDFNDEFSDLDGVVQQRQD MEGYSSSGSQTPESENSRDFHATESQTVLNVSKGEAKPTRADA HVNRPVEGKAKSLPVQGLSETVGILHKVKSQKCPMLHHILIFYA IVVCALIS

		TFYMR YRINTLEEQ LGLLTSIVDTHNTEQAAPSG LRSQVQFNVE VLCQELTANIVKLEKIQNNLQKLENGD
11	№ Uniprot P11686 Белок С, ассоциирован- ный с ЧЕЛОВЕЧЕС- КИМ легочным поверхностно- активным веществом (SP-C)	MDVGSKEVLMESPPDYSAAPRGRFGIPCCPVHLKRL LIVVVVV VLIVVVIVGALLMGLHMSQKHEM VLEMSIGAPEAQQRLALSE HLVTTATFSIGSTGLVYDYQQLLIA YKPAPGTCCYIMKIAPESI PSLEALNRKVHNFQMECSLQAKPAVPTSKLGQAEGRDAGSAPS GGDPAFLGMAVNTLCGEVPLYI
12	№ Uniprot P03451 Гемагглюти- нин вируса гриппа А HEMA_I57A0 (штамм A/Japan/305/19 57 H2N2)	MAIIYLILLFTAVRGDQICIGYHANNSTEKVDTNLERNVTVTHA KDILEKTHNGKLC LKNGIPPELGDCSIAGWLLGNPECDRLLSV PEWSYIMEKENPRDGLCYPGSFNDYEELKHLSSVKHFEEKVKIL PKDRWTQH TTTGGSRACAVSGNPSFFRN MVWLTKEGSDYPVA KGSYNNTSGEQMLIHWGVHHPIDETE QRTLYQNVGT YVSVGTS TLNKRSTPEIATRPKVNGQGGRMEFSWTL LDMWDTINFESTGN LIAPEYGFKISKRGSSGIMKTEGTLENCETK CQTPLGAIN TLPF HNVHPLTIGECPKYVKSEKLVLATGLRNVPQIESRGLFGAIAGFI EGGWQGMVDGWYGYHHSNDQGSYAADKESTQKAFDGITN KVNSVIEKMNTQFEAVGKEFGNLERRLENLNKR MEDGFLDVW TYNAELLVLMENERTLDFHDSNVKNLYDKVRMQLRDNVKEL GNGCFEFYHKCDDECMNSVKNGTYDYPKY EESKLN RNEIKG VKLSSMGVYQILAIYATVAGSLSLAIMMAGISFWMC SNGSLQC RICI
13	№ Uniprot P03436 Гемагглюти- нин вируса гриппа А HEMA_I68A6 (штамм A/Northern Territory/60/196 8 H3N2)	MKTIIALSYIFCLALGQDLP GNDNNTATLCLGHHAVPNGTLVK TITDDQIEVTNATELVQSSSTGKICNNPHRILDGIDCTLIDALLGD PHCDVFQNETWDLFVERSKAFSNCYPYDVPDYASLRSLVASSG TLEFITEGFTWTGVTQNGGSNACKRGPDSGFFSRLNWLTKSGS TYPVLNVTMPNNDNFDKLYIWGVHHPSTNQEQTSLYVQASGR VTVSTRRSQQTIPNIGSRPWVRGQSSRSIYWTIVKPGDVLVINS NGNLIAPRGYFKMRTGKSSIMRSDAPIDTCISECITPNGSIPNDKP FQNVNKITYGACPKYVKQNTLKLATGMRNVPEKQTRGLFGAI AGFIENGWE GMIDGWYGFRHQNSEGTGQAADLKSTQAAIDQINGKLN RVIEK TNEKFHQIEKEFSEVEGRIQDLEKYVEDTKIDLWSYNAELLVAL ENQHTIDLTDSEMKNLF EKTRRQLRENAEDMGNGCFKIYHKCD NACIESIRNGTYDHDVYRDEALNRFQIKGVELKSGYKDWILW ISFAISCFLLCVLLGFIMWACQRGNIRCNICI
14	№ Uniprot Q1K9Q1 Нейраминида- за NRAM_I57A0	MNPNQKIITIGSVSLTIATVCFLMQIAILATTVTLHFKQHKCDSP ASNQVMPCPEPIIERNITEIVYLNNTTIEKEICPEVVEYRNWSKPQ CQITGFAPFSKDNSIRLSAGGDIWVTREPYVSCDPGKCYQFALG QGTTLDNKHSNGTIHDRIPHRTLLMNELGVPFHLGTKQVCVAW SSSSCHDGKAWLHVCVTGDDR NATASFIYDGRLVDSIGSWSQN

	OS=вирус гриппа А (штамм A/Japan/305/19 57 H2N2)	ILRTQESECVCINGTCTVVMTDGSASGRADTRILFIKEGKIVHIG PLSGSAQHIEECSCYPRYPDVRICRDNWKGSNRPVIDINMEDY SIDSSYVCSGLVGDTPRNDSSNSNCRDPNNERGNPGVKGWA FDNGDDV WMGRTISKDLRSGYETFKVIGGWSTPNSKSQVNRQVIVDNNN WSGYSGIFSVEGKSCINRCFYVELIRGRPQETRVVWWTNSIVVF CGTSGTYGTGSWPDGANINFMPI
15	№ Uniprot P03473 Нейраминидаза вируса гриппа А NRAM_I68A6 (штамм A/Northern Territory/60/196 8 H3N2)	MNPNQKIITIGSVSLTIATVCFMQTAILVTTVTLHFKQYECDSP ASNQVMPCPEPIERNITEIVYLNNTTIEKEICPKVVEYRNWSKPQ CQITGFAPFSKDNSIRLSAGGDIWVTREPYVSCDHGKCYQFALG QGTTLDNKHSNDTIHDRIPHRTLLMNELGVPFHLGTRQVCIAW SSSSCHDGKAWLHVCITGDDKNATASFIYDGRLVDSIGSWSQNI LRTQESECVCINGTCTVVMTDGSASGRADTRILFIEEGKIVHISP LSGSAQHVEECSCYPRYPGVRCICRDNWKGSNRPVVDINMEDY SIDSSYVCSGLVGDTPRNDSSNSNCRNPNNERGNQGKGV AFDNGDDVWMGRTISKDLRSGYETFKVIGGWSTPNSKSQINRQ VIVSDNRSGYSGIFSVEGKSCINRCFYVELIRGRKQEARVWWT SNSIVVFCGTSGTYGTGSWPDGANINFMPI

ПРИМЕРЫ

Следующие примеры иллюстрируют данное изобретение. Данные примеры не следует истолковывать как ограничивающие объем данного изобретения. Данные примеры включаются с целью иллюстрации, а настоящее изобретение ограничивается только формулой изобретения.

Культура клеток	Происхождение	Источник	Состав среды
Calu3	бронхиальные эпителиальные клетки человеческой аденокарциномы	Американская коллекция типовых культур, Manassas, VA, США	MEM (минимальная эссенциальная среда), 15% hi FCS (фетальная телячья сыворотка), 4 mM GlutaMax, 1 mM пирувата натрия, 1% раствор заменимых аминокислот
MDCK II	эпителиальные клетки собачьей почки, подклон II.	Коллекция клеточных культур, Институт медицинской вирусологии, Justus-Liebig University Giessen, Германия	DMEM (среда Игла, модифицированная по Дульбекко, 10% hi FCS, 25 mM глюкоза, 4 mM L-глутамин

Пример 1 – культивирование клеточной культуры

Все линии клеток культивировали во флаконе для культуры ткани на 75 см² или

165 см² при 37°C в атмосфере 5% CO₂ с влажностью 95%. При достижении монослоями клеток 90%-ной конфлюентности (за исключением клеток Calu3, которые не достигают 100%-ной конфлюентности, максимум 50%-ной) клетки один раз промывали PBS (фосфатно-солевой буферный раствор) -/- и отсоединяли с использованием трипсин-EDTA (этилендиаминтетрауксусная кислота). Клетки ресуспендировали в подходящей среде (см. таблицу выше) и высевали в 6-луночные, 12-луночные, 24-луночные планшеты для тканей в 15 см чашках для тканей или на стерильные стеклянные покровные стекла, помещенные в пределы культуральной лунки, за 24 часа до каждого эксперимента.

Пример 2 – поляризация клеток Calu3

Для того, чтобы получать высокополяризованные клетки Calu3, монослой клеток во флаконе для культуры клеток на 175 см², выращенный до 50%-ной конфлюентности, один раз промывали PBS -/- и обрабатывали трипсин-EDTA. Клетки ресуспендировали в 10 мл культуральной среды и центрифугировали в течение 15 мин при 300 g, 24°C. Супернатант отбрасывали, и клетки ресуспендировали в 5 мл культуральной среды. 30 мкл суспензии клеток смешивали с 30 мкл 0,4%-ного красителя трипановый синий, и концентрацию клеток рассчитывали в камере Нойбауэра согласно инструкции изготовителя. Клетки разводили до концентрации 2×10^6 жизнеспособных клеток/мл в культуральной среде Calu3, и 250 мкл/125 мкл суспензии клеток, содержащей $0,5 \times 10^6$ / $0,25 \times 10^6$ жизнеспособных клеток, помещали в апикальный отсек каждой вставки Transwells® в 12/24-луночной планшете. 1/0,3 мл культуральной среды Calu-3 добавляли в базолатеральные отсеки, избегая введения воздушных пузырьков, и клетки культивировали при 37°C, 5% CO₂. Для клеток, выращенных при условиях поверхности контакта жидкость-жидкость (LLI), среду заменяли в обоих отсеках на каждые вторые сутки. Для поверхности контакта воздух-жидкость (ALI) культуральную среду отсасывали из апикального отсека на вторые сутки, тогда как среду в базолатеральных отсеках заменяли каждые 2 суток.

Пример 3 – анализ жизнеспособности клеток

Для того, чтобы проверить цитотоксичность применяемых ингибиторов, использовали доступный в продаже реактив PrestoBlue™. Данный реактив – ресазурин – соединение на основе (7-гидрокси-10-оксифеноксазин-10-иум-3-он) – превращается в восстановленную форму митохондриальными ферментами жизнеспособных клеток с изменением цвета и может измеряться с использованием либо

спектрофотометрического, либо флуорометрического подхода. Данный анализ жизнеспособности проводили согласно протоколу изготовителя. Клетки Calu3 высевали в 96-луночный планшет в концентрации 1×10^4 /лунку в 90 мкл культуральной среды, через 24 ч обрабатывали средой, содержащей ингибиторы в разных концентрациях, и через 24 ч добавляли в каждую лунку 10 мкл 10-кратного готового к применению реактива PrestoBlue™. Данный планшет затем инкубировали 30 мин при 37°C в темноте, и затем измеряли поглощение при длине волны 570 нм посредством многорежимного микропланшет-ридера Tecan Spark® для определения количества превращения резазурина.

Пример 4 – направленный транспорт воды

Направленный транспорт воды (VWT) в качестве характеристики физиологического состояния монослоя клеток Calu3 измеряли посредством изменения концентраций FITC(флуоресцеинизотиоцианат)-декстрана в апикальной и базальной клеточной культуральной среде поляризованных клеток Calu3, выращенных на вставках Transwells® в течение 14 суток при условиях поверхности контакта жидкость-жидкость. Для этого клетки либо подвергали имитации инфицирования, либо инфицировали PR8 при множественности заражения (MOI): 2 в течение 1 часа при 37°C. Инокулят удаляли, и клеткам поставляли инфекционную среду №2, содержащую 1 мг/мл 70 кДа FITC-декстрана и 5 мкМ ингибитора XIII Rho-киназы в DMSO (диметилсульфоксид) или просто равное количество DMSO (растворитель). Клетки инкубировали при 37°C в течение 8 и 24 ч. Отбирали 30 мкл клеточной культуральной среды с апикальной и базальной стороны, разводили 1:1 PBS +/- и помещали на 96-луночные плоскодонные черные планшеты. Интенсивность флуоресценции образцов измеряли при длине волны возбуждения 480 нм и длине волны испускания 535 нм посредством многорежимного микропланшет-ридера Tecan Spark® 10M. VWT рассчитывали с использованием следующей формулы:

$$C_0 = [1 - (C_0/C_a)] - [1 - (C_0/C_b)], \text{ где}$$

C_0 – значение флуоресценции культуральной среды в исходный момент времени;

C_a – значение флуоресценции культуральной среды на апикальной стороне вставок Transwells®;

C_b – значение флуоресценции культуральной среды на базальной стороне вставок Transwells®.

Для определения того, является ли неправильное распределение НКА во время инфекции IAV общей характеристикой патогенности IAV, разные подтипы IAV подвергали скринингу на их способность индуцировать апикальное представление НКА. Во-первых, сравнивали кинетику роста вируса гриппа A/Victoria/3/75 (H3N2), A/Thailand/1 (KAN-1)/2004 (H5N1) или A/Anhui/1/2013 (H7N9) в клетках Calu3. Не выявляли значимых различий в эффективности репликации анализируемых подтипов IAV и проанализированного ранее вируса PR8. Высокопатогенные вирусы подтипа H5N1 и H7N9 демонстрировали максимальный титр вируса, равный $6,1 \log_{10}$ FFU(единица образования очагов)/мл и $7,5 \log_{10}$ FFU/мл, соответственно, в 48 ч п.и., тогда как менее патогенный штамм H3N2 достигал максимального титра $6,9 \log_{10}$ FFU/мл в 24 ч п.и. (Фиг. 11А). Все проанализированные вирусы могли индуцировать неправильную апикальную локализацию НКА на поздней стадии вирусной инфекции, как продемонстрировано анализом ОСWB (Фиг. 11Б). Не было значимого различия в способности вызывать апикальное появление НКА между разными штаммами IAV, указывая на то, что это является общим эффектом, вызванным инфекцией IAV поляризованных эпителиальных клеток.

Пример 5 – размножение вируса

Вирус гриппа A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) размножали в клетках MDCK II в 165 см² культуральном флаконе. Для этого на 85% конфлюэнтный монослой клеток в возрасте 24 ч один раз промывали PBS +/- и добавляли 5 мл PBS +/-BA/PS, содержащим разведение вируса, соответствующее MOI, равной 0,01, с последующими 45 мин инкубации при комнатной температуре. Затем инокулят удаляли, клетки промывали PBS +/- и инкубировали в инфекционной среде №1, содержащей 1 мг обработанного ТРСК (тозилфенилаланилхлорметилкетон) трипсина мл⁻¹, при 37°C в течение 2 суток. Супернатант отбирали, и титр вируса определяли посредством анализа образования очагов.

Анализ образования очагов

Для анализа образования очагов клетки MDCK II высевали в 96-луночные планшеты в концентрации 3×10^6 клеток/планшет. На следующие сутки готовили 10-кратные разведения в двойных повторностях (от 10^{-1} до 10^{-8}) в PBS +/-BA/PS от каждого образца вируса в 96-луночном планшете с U-образными лунками. Важно, что во время приготовления разведений наконечники пипеток заменяли после каждой стадии разведения. Клетки MDCK II в 96-луночном(ных) планшете(тах) один раз

промывали PBS+/. Затем 50 мкл соответствующих разведений для каждого образца в планшете с U-образными лунками переносили на клетки MDCK II в соответствующей лунке 96-луночного планшета, которые затем инкубировали в течение 45 мин. После инкубации инокулят удаляли, начиная с ряда с разведением 10^{-8} без замены наконечников пипетки, и в каждую лунку добавляли 100 мкл среды Avicel, содержащей 1 мг обработанного ТРСК трипсина мл^{-1} . Клетки инкубировали при 37°C , 5% CO_2 в течение 30 часов с последующим иммуноцитохимическим анализом для выявления клеток, инфицированных вирусом. Для этого клетки дважды промывали 200 мкл PBS +/+, фиксировали и пермеабелизировали в 4%-ном (масс./об.) параформальдегиде (PFA), содержащем 1% (об./об.) Triton-X-100, в течение 30 минут при комнатной температуре. Затем клетки трижды промывали 400 мкл промывочного буфера (PBS +/- с 0,05% (об./об.) Tween® 20) и покрывали 50 мкл раствора первичного антитела против NP (3% (масс./об.) BSA (бычий сывороточный альбумин) в PBS +/-) в течение 2 часов при комнатной температуре. Затем клетки три раза промывали промывочным буфером с последующей инкубацией с 50 мкл вторичного антитела против мышинового антитела, меченного пероксидазой хрена (HRP). Через 1 час клетки вновь промывали 400 мкл промывочного буфера, и в каждую лунку добавляли 40 мкл окрашивающего буфера на основе 3-амино-9-этилкарбазола (AEC) ($1 \times \text{AEC}$, разведенный N,N-диметилформамидом, в ацетатном буфере (50 мМ ацетат аммония, 8,8 мМ H_2O_2). После инкубации в течение 30 мин при 37°C , пока не могли быть выявлены очаги, окрашивающий буфер удаляли, и клетки дважды промывали dH_2O (дистиллированная вода). Высушенные на воздухе планшеты сканировали с использованием сканера Epson Perfection V500 Photo (Epson) при разрешении 1200 dpi, и определяли общее число очагов на лунку. Поскольку среда Avicel имеет высокую вязкость, которая предотвращает диффузию вирусных частиц в окружающую среду, вирус может распространяться только из одной клетки в другие, образуя очаги.

Титр вируса на 1 мл определяли посредством следующей формулы:

$$\text{Число очагов на лунку} \times \frac{1000 \text{ мкл}}{50 \text{ мкл}} \times \text{кратность разведения} = \text{FFU/мл},$$

где FFU представляет собой единицу образования очагов.

Получение гомогената легкого для титрования вируса

Для анализа титра вируса в инфицированных эпидермальных клетках легкого посредством анализа очагов мышей умерщвляли посредством обескровливания. Малый круг кровообращения промывали стерильным PBS +/- через правый желудочек.

Промытые побелевшие легкие удаляли и промывали холодным PBS -/-. Доли срезали ножницами, и остальную ткань диссоциировали пипетированием в 1 мл PBS -/- до суспензий одиночных клеток. Данные клетки осаждали центрифугированием при 400 g в течение 10 мин при 4°C, и супернатант подвергали анализу очагов, как описано ранее.

Пример 6 – фиксация клеток для иммунофлуоресцентного анализа

Для иммунофлуоресцентного анализа клетки один раз промывали PBS +/+ и фиксировали с дополнительной пермеабиллизацией или без нее в указанные моменты времени. В зависимости от использованных первичных антител клетки либо фиксировали и пермеабиллизировали органическими растворителями, либо фиксировали сшивающим реактивом параформальдегидом. В качестве органических растворителей использовали либо предварительно охлажденный (-20°C) раствор 1:1 (об./об.) ацетон:метанол (для окрашивания на NKA α 1), либо предварительно охлажденный (-20°C) 100%-ный метанол (для окрашивания на тубулин) в течение 3 мин при -20°C, с последующими тремя промывками промывочным буфером (PBS +/+ с 0,05% (об./об.) Tween® 20) и блокировали блокирующим буфером (3% (масс./об.) бычьего сывороточного альбумина (BSA) в 1× PBS +/+) в течение одного часа при RT (комнатная температура) или в течение ночи при 4°C. В качестве сшивающего реактива использовали 4%-ный (масс./об.) раствор PFA для фиксации клеток в течение 10 мин при RT, с последующей промывкой три раза PBS +/+, содержащим 30 мМ глицин (G-PBS), и затем пермеабиллизировали 0,25% (масс./об.) Triton X-100 в течение 7 мин. Затем клетки три раза промывали G-PBS и покрывали блокирующим раствором (3% (масс./об.) BSA в G-PBS - G-PBS/BSA) в течение 30 мин при RT. Фиксированные клетки затем обрабатывали 0,25% (масс./об.) Triton X-100 в G-PBS в течение 15 минут, три раза промывали G-PBS, с последующим блокированием в G-PBS/BSA в течение 30 мин.

Пример 7 – окрашивание антителами и конфокальная лазерная сканирующая микроскопия апикальной локализации NKA α 1 в инфицированных и неинфицированных клетках Calu3 (Фиг. 1)

Высокополяризованные монослои клеток Calu3, выращенных на вставках Transwell® на поверхности контакта воздух/жидкость, либо оставляли неинфицированными, либо инфицировали вирусом гриппа A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) при MOI равной 5. В 20 ч п.и. инфицированные клетки либо оставляли необработанными, либо обрабатывали ингибитором ROCK (XIII). Для

иммунофлуоресцентного анализа клетки один раз промывали PBS +/+. Клетки фиксировали и пермеабилizировали предварительно охлажденным (-20°C) раствором ацетон:метанол 1:1 (об./об.) (для окрашивания на NKA α 1) в течение 3 мин при -20°C, с последующими промывками три раза промывочным буфером (0,3% (масс./об.) бычьего сывороточного альбумина в 1× PBS +/+) и блокировали блокирующим буфером (3% (масс./об.) бычьего сывороточного альбумина в 1× PBS +/+) в течение одного часа при RT или в течение ночи при 4°C. Для окрашивания антителом клетки затем инкубировали со специфичным первичным антителом (антитело кролика против NP, Thermo-Fisher (PA5-32242): 1:2000; мышинное антитело против α 1 NKA, Millipore/Sigma Aldrich (№ 05-369): 1:1000) в растворе для разведения антител (2% (масс./об.) бычьего сывороточного альбумина в 1× PBS +/+). Разведение антитела добавляли к фиксированным и пермеабилizированным клеткам на 2 ч при RT, с последующей промывкой два раза PBS +/+. Клетки затем инкубировали в течение 1 ч со вторичным антителом (куриное антитело против антитела кролика, конъюгированное с Alexa Fluor 488, и куриное антитело против антитела мыши, конъюгированное с Alexa Fluor 647), разведенным в растворе для разведения антител (1:1000). Затем клетки трижды промывали PBS +/-, один раз ddH₂O (двойная дистиллированная вода), и покровные стекла или полиэстеровую мембрану из Transwells® монтировали на стеклянном предметном стекле с использованием среды для заключения гистологических препаратов против выцветания ProLong™ Gold с DAPI (4',6-диамидин-2-фенилиндо́л) (конц. не приводится изготовителем) в течение ночи. Локализацию NKA α 1 оценивали посредством непрямого иммунофлуоресцентного анализа и последующего 3D(трехмерное)-моделирования с использованием программы Imaris®. Сигналы визуализировали с помощью конфокального лазерного сканирующего микроскопа Leica TCS-SP5 с объективом HCX PL Apo 63×/1,30 GLYC и точечной диафрагмой (пинхол) - 1 единица Эйри (AU). Z-пакет получали с использованием размера шага 0,25 мкм, и результаты анализировали программой Imaris (Bitplane) (Фиг. 1 и 2).

Пример 8 – анализ экспрессии белка на поверхности клетки

Анализ вестерн-блоттингом на клетке

Для анализа вестерн-блоттингом на клетке три набора клеток Calu3 высевали в 96-луночные планшеты с оптически прозрачным плоским дном при концентрации 6×10^4 клеток/лунку. Через 24 часа, когда монослой клеток был на 95% конфлюентным,

клетки инфицировали вирусом гриппа A/Puerto Rico78/34 (H1N1) при MOI 2. После 45 минут инкубации при 37°C инокулят заменяли инфекционной средой (MEM (минимальная питательная среда), содержащая 1% пирувата натрия (100×), 1% заменимых аминокислот (100×), 0,5% BSA (30%)) (+/-) ингибитор (фасудил HCl, Selleckchem: 10 мкМ; ингибитор Rho киназы RKI-1447(XIII), Millipore: 5 мкМ), или растворителем ингибитора в качестве контроля. Через 24 часа среду, содержащую либо ингибитор, либо растворитель, удаляли и первичные антитела, которые распознают внеклеточный эпитоп HA, M2 или $\beta 1$ субъединицу Na^+, K^+ -АТФазы, разведенные в PBS ++ (поликлональное антитело козы против вируса гриппа А, Abcam (№ ab20841): 1:2000; мышинное моноклональное антитело против вируса гриппа А M2, ThermoScientific/Invitrogen/Gibco (№ MA1-082): 1:1000; мышинное моноклональное антитело против NKA $\beta 1$, ThermoScientific/Invitrogen/Gibco (№ MA3-930): 1:1000) добавляли к одному из наборов клеток Calu3, и планшеты дополнительно инкубировали в течение 1,5 ч при 37°C при 5% CO₂. Клетки затем три раза промывали PBS ++, фиксировали 4% PFA в течение 20 мин при RT, с последующей промывкой три раза PBS ++, каждый раз в течение 5 мин. Затем клетки обрабатывали блокирующим буфером в течение 45 мин при RT и затем инкубировали в темноте со вторичным, конъюгированным с IRDye 800 антимишиным или козьим антителом (LI-COR, соответственно хозяину первичного антитела), разведенным в блокирующем буфере, содержащем 5 мкМ DRAQ5™ (краситель ДНК, испускающий в дальней красной области), в течение 1 ч при RT. Клетки затем три раза промывали TBS-T (смесь забуференного Трис физиологического раствора и полисорбата-20) и сканировали на инфракрасном визуализаторе LI-Cor Odyssey (разрешение 100 мкм, фокусное расстояние 0,5 мм). Данные анализировали с использованием программ Image Studio (LI-COR), Excel (Microsoft) и GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc.) (Фиг. 11).

Пример 9 – эксперимент *in vivo* на животных

Все эксперименты на животных проводили согласно самым последним руководствам «Федерации европейских научных ассоциаций по лабораторным животным (FELASA)», и они были одобрены локальным комитетом Лаборатории Макса Планка исследований сердца и легких Instituto de Investigación en Biomedicina de Buenos Aires (IBioBA). Шестинедельных мышей BALB/c (n равно 5 на группу) инфицировали внутритрахеальной инокуляцией 500 бляшкообразующих единиц (pfu) /

мышь *PR8* в объеме 30 мкл. Фасудил HCl разводили в стерильном PBS -/- и ежедневно применяли внутривенно (в.в.) в концентрации 10 мг/кг в 24 ч п.и. на протяжении следующих 7 суток. В качестве контроля применяли в.в. инъекцию стерильного PBS -/- . Массу тела отслеживали каждые сутки до суток 8 п.и. В сутки 7 после начала обработки (равно суткам 8 п.и.) мышей умерщвляли посредством избыточной дозы изофлурана.

Отношение сырой к сухой массе легкого

Отношение сырой к сухой массе легкого (W/D) использовали для анализа накопления воды в легком после инфекции IAV. Животных умерщвляли, препарировали, и массу «сырого» легкого измеряли немедленно после его удаления. Легкие затем сушили в печи при 60°C в течение 5 суток и повторно взвешивали в качестве сухой массы. Отношение массы W/D рассчитывали посредством деления сырой на сухую массу.

Приготовление легких для гистологической обработки

Животных умерщвляли, легкие подвергали перфузии через правый желудочек с использованием PBS -/-, удаляли из грудной полости, фиксировали в 4%-ном PFA в течение 24 ч и затем заливали парафином (Leica ASP200S). Залитые парафином легкие нарезали на тонкие срезы (3,5 мкм) с использованием Microtome RM2125 (Leica). Срезы монтировали на заряженные предметные стекла и сушили в течение ночи при 37°C. На следующие сутки срезы легкого окрашивали гематоксилином/эозином посредством следующей методики:

Стадия	Время
Ксилол	5 мин
Ксилол	5 мин
100%-ный этанол	30 с
100%-ный этанол	30 с
100%-ный этанол	30 с
96%-ный этанол	30 с
96%-ный этанол	30 с
70%-ный этанол	30 с
70%-ный этанол	30 с
Гематоксилин	3-5 мин

0,1%-ная HCl	2 с
Проточная водопроводная вода	5 мин
0,5%-ный раствор эозина G	3 мин
Водопроводная вода	30 с
70%-ный этанол	30 с
96%-ный этанол	30 с
100%-ный этанол	30 с
100%-ный этанол	30 с
100%-ный этанол	30 с
Ксилол	5 мин
Ксилол	5 мин

Весь описанный здесь микроскопический анализ проводили посредством системы визуализации клеток EVOS FL Auto. Общее количество клеток в гистологических срезах количественно измеряли посредством сканера Aperio CS2 (Leica Biosystems Imaging Inc., CA, США) с использованием программы «Aperio v9 nuclear count algorithm» (Leica Biosystems Imaging Inc., CA, США) в сотрудничестве с группой университетского профессора Др. Achim Gruber (Freie Universität Berlin).

Статистика

Статистический анализ проводили посредством программы GraphPad Prism 5. Данные приводятся как среднее плюс либо стандартная ошибка среднего (SEM), либо стандартное отклонение среднего (SD) (указано в легенде графических материалов). Статистическую значимость для двух групп анализировали двухсторонним непарным *t*-критерием Стьюдента. Статистическую значимость для трех или более чем трех групп анализировали посредством однофакторного ANOVA (дисперсионный анализ), с последующим апостериорным критерием Тьюки. Значение *p* считалось значимым, если оно было меньше, чем 0,05, * - *p* меньше 0,05; ** - *p* меньше 0,01; *** - *p* меньше 0,005.

Если не утверждается иное, следующие термины, используемые в данном документе, включая описание и формулу изобретения, имеют определения, приведенные ниже.

Специалисты в данной области узнают или смогут выяснить с использованием не более чем традиционного экспериментирования многие эквиваленты конкретных

воплощений описанного здесь изобретения. Подразумевается то, что такие эквиваленты охватываются настоящим изобретением.

Следует отметить то, что формы единственного числа в том виде, в котором они здесь используются, включают ссылки на множественное, если контекст явно не диктует иное. Таким образом, например, ссылка на «реактив» включает один или более чем один такой разный реактив, и ссылка на «способ» включает ссылку на эквивалентные стадии и способы, известные обычным специалистам в данной области, которые могли бы быть модифицированы или заменены описанными здесь способами.

Если не указано иное, термин «по меньшей мере», предшествующий ряду элементов, следует понимать как относящийся к каждому элементу в данном ряду. Специалисты в данной области узнают или смогут выяснить с использованием не более чем традиционного экспериментирования многие эквиваленты конкретных воплощений описанного здесь изобретения. Подразумевается то, что такие эквиваленты охватываются настоящим изобретением.

Термин «и/или», всякий раз, когда он здесь используется, включает значение «и», «или» и «все или любую другую комбинацию элементов, соединенных указанным термином».

Термин «примерно» или «приблизительно» в том виде, как он здесь используется, означает в пределах 20%, предпочтительно в пределах 10% и более предпочтительно в пределах 5% данного значения или интервала. Однако он также включает конкретное число, например, примерно 20 включает 20.

Во всем данном описании изобретения и формуле изобретения, которая следует далее, если контекст не требует иного, будет понятно, что слово «содержать» и вариации, такие как «содержит» и «содержащий», подразумевает включение заявленного целого числа или стадии, или группы целых чисел или стадий, но не исключение любого другого целого числа или стадии, или группы целых чисел или стадий. При использовании здесь термин «содержащий» может быть заменен термином «вмещающий» или «включающий» или иногда, при использовании здесь, термином «имеющий».

При использовании здесь термин «состоящий из» исключает любой элемент, стадию или ингредиент, не определенный в пункте формулы изобретения. При использовании здесь термин «по существу состоящий из» не исключает веществ или

стадий, которые существенно не влияют на основные и новые характеристики формулы изобретения.

В каждом случае здесь любой из терминов «содержащий», «по существу состоящий из» и «состоящий из» может быть заменен одним из двух других терминов.

Следует понимать то, что данное изобретение не ограничивается описанными здесь конкретной методологией, протоколами, материалом, реактивами и веществами, и т.д., и, как таковое, может варьировать. Использованная здесь терминология служит лишь цели описания конкретных воплощений и не предназначена для ограничения объема настоящего изобретения, которое определяется единственно формулой изобретения.

Все публикации, процитированные по всему тексту данного описания изобретения (включая все патенты, патентные заявки, научные публикации, спецификации изготовителей, инструкции и т.д.), являются тем самым включенными посредством ссылки во всей их полноте. Ничто здесь не следует истолковывать как допущение того, что данное изобретение не уполномочено предвосхищать такое раскрытие посредством предшествующего изобретения. В той степени, в которой материал, включенный посредством ссылки, противоречит или не согласуется с данным описанием изобретения, данное описание изобретения будет отменять любой такой материал.

СПИСОК ССЫЛОК

- Altschul, Nucl. Acids Res. 25 (1997), 3389-3402
- Altschul, J. Mol. Evol. 36 (1993), 290-300
- Altschul, J. Mol. Biol. 215 (1990), 403-410
- Amano et al. (2010) "Rho-Kinase/ROCK: A Key Regulator of the Cytoskeleton and Cell Polarity" *Cytoskeleton* (Hoboken). 2010 Sep; 67(9): 545–554
- Assaad et al. (2018) "Assessment of Pulmonary Edema: Principles and Practice." *Journal of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia*, 32(2), 901–914
- Brutlag *Comp. App. Biosci.* 6 (1990), 237-245
- Crystal et al. (2008) "Airway epithelial cells" *Proc Am Thorac Soc*, vol. 5, pp. 772-777
- Feng et al. (2015) "Rho Kinase (ROCK) Inhibitors and Their Therapeutic Potential including the information about clinical trials" *J. Med. Chem.* 2016, 59, 6, 2269-2300
- Henikoff *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 89, (1989), 10915

Henikoff and Henikoff (1992) ‘Amino acid substitution matrices from protein blocks.’
Proc Natl Acad Sci U S A. 1992 Nov 15;89(22):10915-9

Johnson and Koval (2009) “Cross-Talk Between Pulmonary Injury, Oxidant Stress, and Gap Junctional Communication.” *Antioxidans and Redox Signaling*, vol. 11, number 2, pp. 356-367

Liao et al. (2007) “Rho Kinase (ROCK) Inhibitors” *J. Cardiovasc Pharmacol.* 50(1):17-24

Marconett et al. (2016) “Cross-Species Transcriptome Profiling Identifies New Alveolar Epithelial Type I Cell-Specific Genes” *AJRCMB*, vol 56, no. 3

Matthay et al. (2019) “Acute Respiratory distress Syndrome” *Nat Rev Dis Primers*, 5(1): 18, p. 1-52

McElroy and Kasper (2004) ”The use of alveolar epithelial type I cell-selective markers to investigate lung injury and repair” *European Respiratory Journal* 24: 664-673

McIntyre et al. (1992) “A noninvasive method of predicting pulmonary-capillary wedge pressure” *N Engl J Med.* 327(24): 1715-20

Mutlu et al. (2005) “Mechanisms of pulmonary edema clearance” *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 289: L685-695

Ńamendys-Silva et al. (2011) “Acute respiratory distress syndrome caused by influenza B virus infection in a patient with diffuse large B-cell lymphoma” *Case Rep Med.* 2011; 2011: 647528

Peteranderl et al. (2019) “Influenza A virus infection induces apical redistribution of Na⁺, K⁺-ATPase in lung epithelial cells in vitro and in vivo” *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* Volume 61 Number 3, pp. 395-397

Rackley et al. (2012) “Building and maintaining the epithelium of the lung” *The Journal+ of Clinical investigation*, vol. 122, no. 8, pp. 2724-2730

Saito N, et al. (1999) “H-series protein kinase inhibitors and potential clinical applications” *Pharmacol Ther*, 82(2-3), 123-131

Thompson *Nucl. Acids Res.* 2 (1994), 4673-4680

WO 2009/158587

WO 2012/015760

Wu and Mlodzik (2009). "A quest for the mechanism regulating global planar cell polarity of tissues". *Trends in Cell Biology.* 19 (7): 295–305

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Ингибитор ROCK (ассоциированная с Rho протеинкиназа) для применения в лечении или предупреждении отека легких посредством

1) предупреждения апикальной локализации натрий-калиевой АТФазы (NKA) в эпителиальных клетках легкого или

2) уменьшения апикальной локализации NKA в эпителиальных клетках легкого по сравнению с апикальной локализацией NKA до введения ингибитора ROCK,

где отек легких ассоциирован с вирусной инфекцией, и где указанный вирус представляет собой вирус гриппа.

2. Ингибитор ROCK для применения по п. 1, где указанный ингибитор ROCK представляет собой ингибитор ROCK 1 или ROCK 1/2.

3. Ингибитор ROCK для применения по п. 1, где указанный ингибитор ROCK выбран из группы, состоящей из фасудила, Rho XIII, Y27632, гидроксифасудила, H-1152-P, Y27632, Y30141, Y32885, Y39983, DW1865, SLx-2119, SR8046, SR6246, рипасудила, AS1892892, AR12141, AR12432, INS-117548, INS-115644, AT13148, RKI1447, SAR407899, нетарсудила, AR12286, PG286*, PG324**, ATS907, AMA0076, тиазовивина, азабензимидазол-аминофуразанов, H-0104 дигидрохлорида, DE-104, олефинов, изохинолинов, индазолов, производных пиридиналкена, H-1152 дихлорида, XD-4000, HMN-1152, 4-(1-аминоалкил)-N-(4-пиридил)циклогексан-карбоксамидов, ростатина, BA-210, BA-207, BA-215, BA-285, BA-1037, Ki-23095, VAS-012, хиназолина, AR13154 и/или AMA0428, или их комбинаций.

4. Ингибитор ROCK для применения по любому из пп. 1-3, где отек легких диагностирован посредством рентгенографии или компьютерной томографии грудной клетки.

5. Ингибитор ROCK для применения по любому из пп. 1-4, где указанный ингибитор ROCK вводят субъекту, инфицированному или подверженному риску инфицирования вирусом гриппа А или гриппа В.

6. Ингибитор ROCK для применения по любому из пп. 1-5, где эпителиальная клетка легкого представляет собой клетку альвеолярного эпителия и/или клетку бронхиального эпителия.

7. Ингибитор ROCK для применения по любому из пп. 1-6, где указанная клетка альвеолярного эпителия представляет собой клетку альвеолярного эпителия типа I или

типа II.

8. Ингибитор ROCK для применения по любому из пп. 1-7, где указанная клетка бронхиального эпителия представляет собой реснитчатую и/или нереснитчатую клетку бронхиального эпителия.

9. Ингибитор ROCK для применения по любому из пп. 1-8, где указанный ингибитор ROCK уменьшает апикальную локализацию НКА в эпителиальных клетках легкого при приведении его в контакт с системой анализа *in vitro*, где указанная система анализа содержит культивируемые эпителиальные клетки легкого, инфицированные вирусом гриппа, по сравнению с апикальной локализацией НКА в эпителиальных клетках легкого в системе анализа *in vitro* до указанного приведения в контакт.

10. Ингибитор ROCK для применения по любому из пп. 1-9, где указанный ингибитор ROCK уменьшает вирусную нагрузку по сравнению с вирусной нагрузкой до введения ингибитора ROCK.

11. Ингибитор ROCK для применения по любому из пп. 1-10, где указанный ингибитор ROCK уменьшает массу жидкости легкого по сравнению с массой жидкости легкого, присутствующей до введения ингибитора ROCK.

12. Ингибитор ROCK для применения по любому из пп. 1-11, где указанный ингибитор ROCK уменьшает инфильтрацию макрофагов в легкое по сравнению с инфильтрацией макрофагов в легкое до введения ингибитора ROCK.

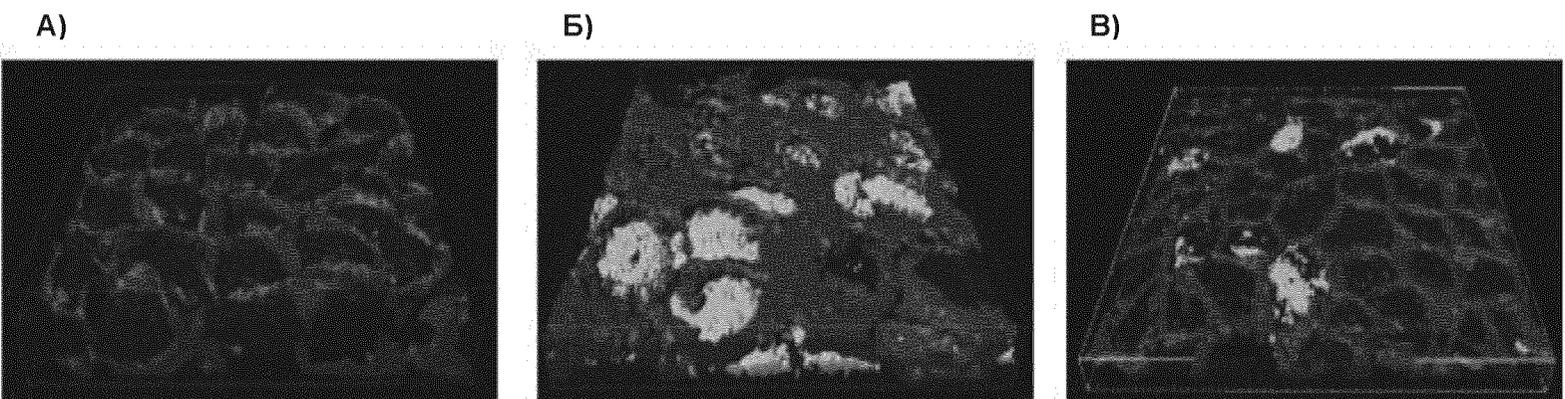
13. Применение системы анализа *in vitro*, содержащей культивируемые эпителиальные клетки легкого, инфицированные вирусом гриппа, для определения ингибиторов, эффективных в предупреждении или уменьшении апикальной локализации НКА в эпителиальных клетках легкого.

14. Способ выявления молекул, эффективных в профилактике и/или лечении отека легких, включающий приведение системы анализа *in vitro*, содержащей культивируемые эпителиальные клетки легкого, инфицированные вирусом гриппа, в контакт с представляющим интерес соединением, где указанное представляющее интерес соединение уменьшает апикальную локализацию НКА в эпителиальных клетках легкого по сравнению с системой анализа *in vitro* до указанного приведения в контакт.

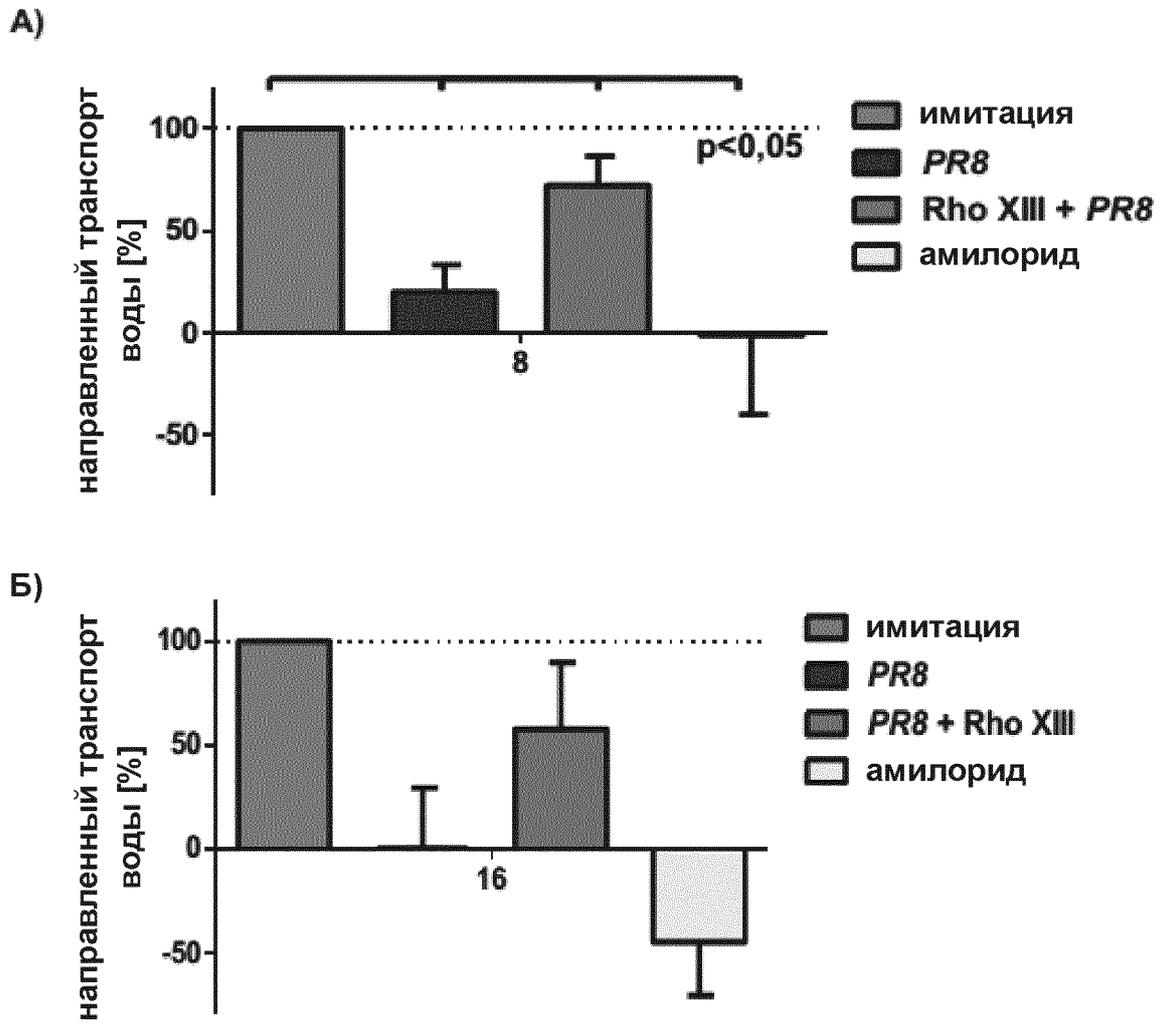
15. Система анализа, содержащая

- 1) ингибитор ROCK;
- 2) эпителиальные клетки легкого;
- 3) вирус гриппа; и
- 4) средства для выявления и клеточной локализации НКА.

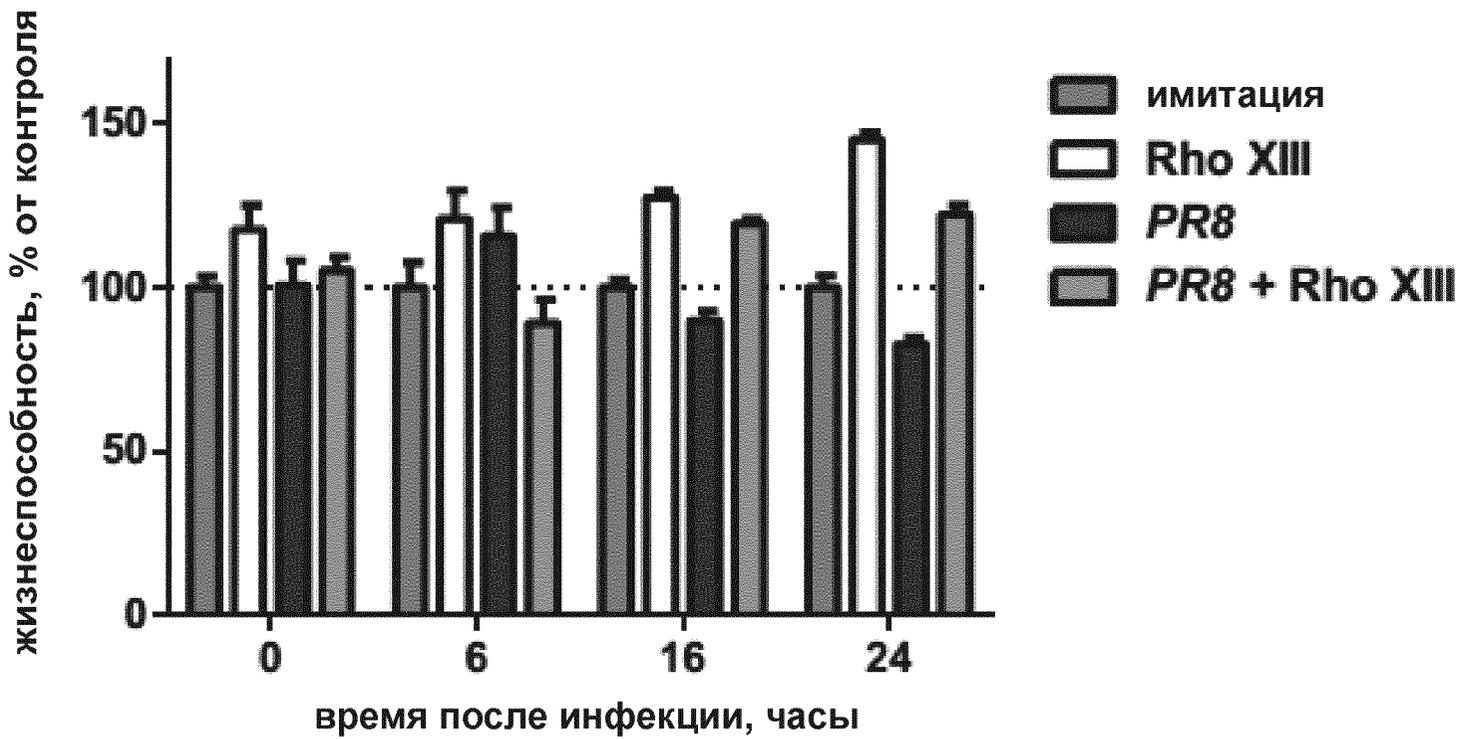
Фиг. 1



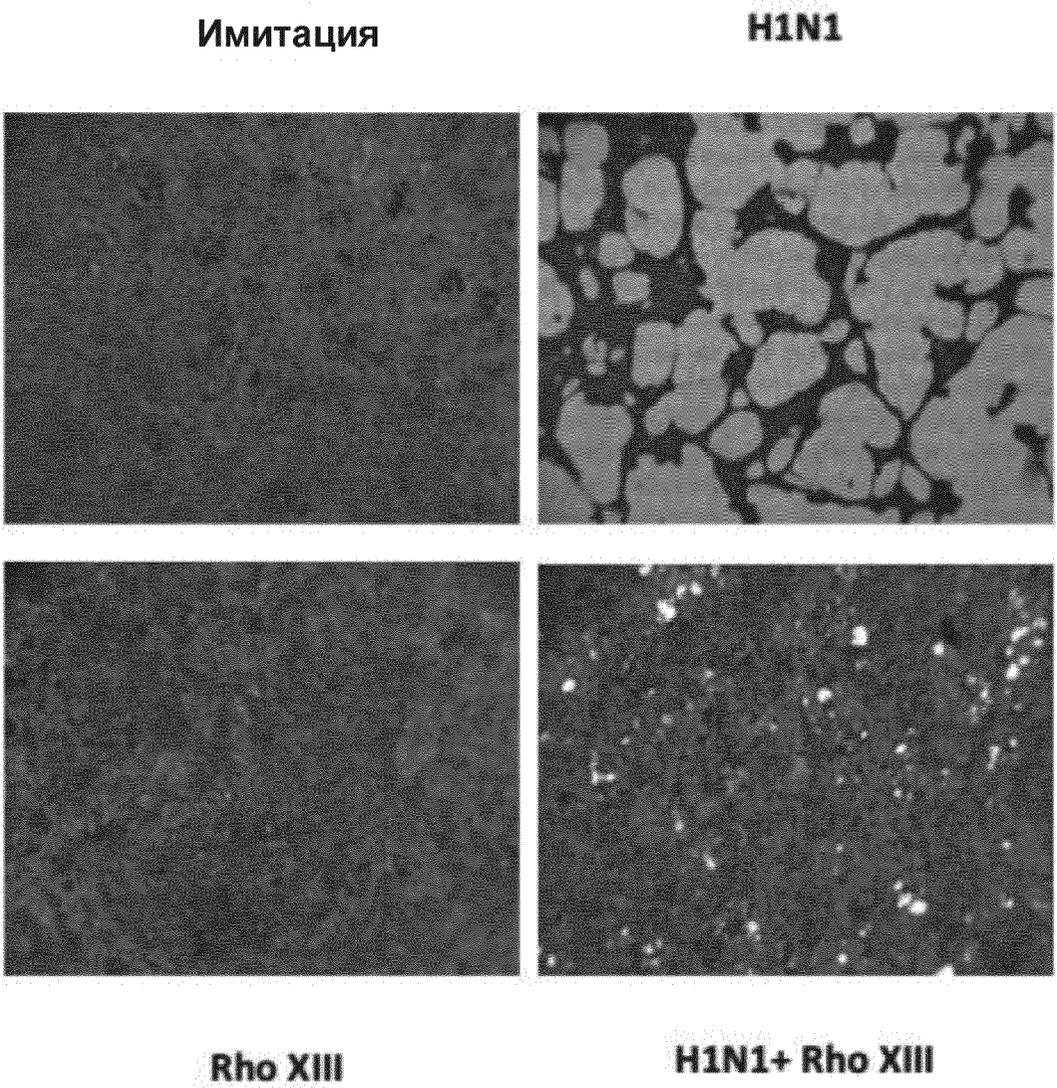
Фиг. 2



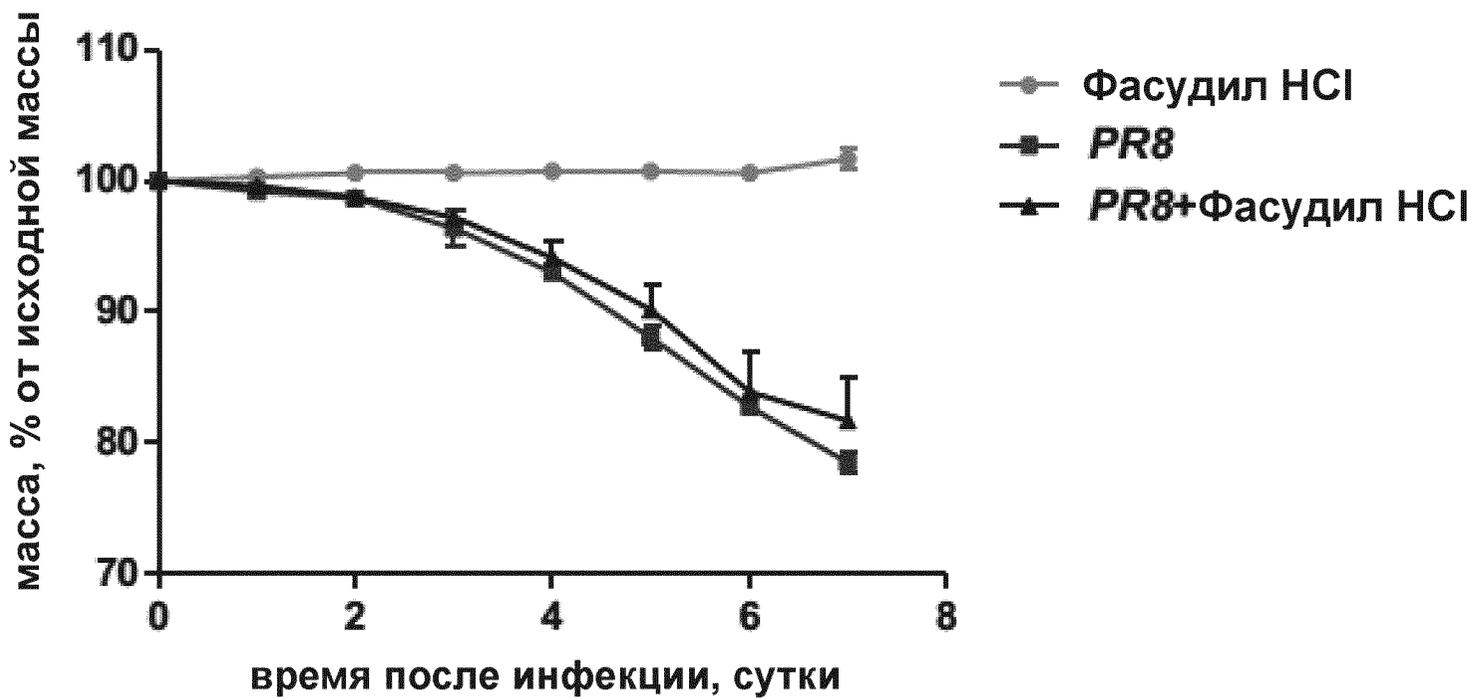
Фиг. 3

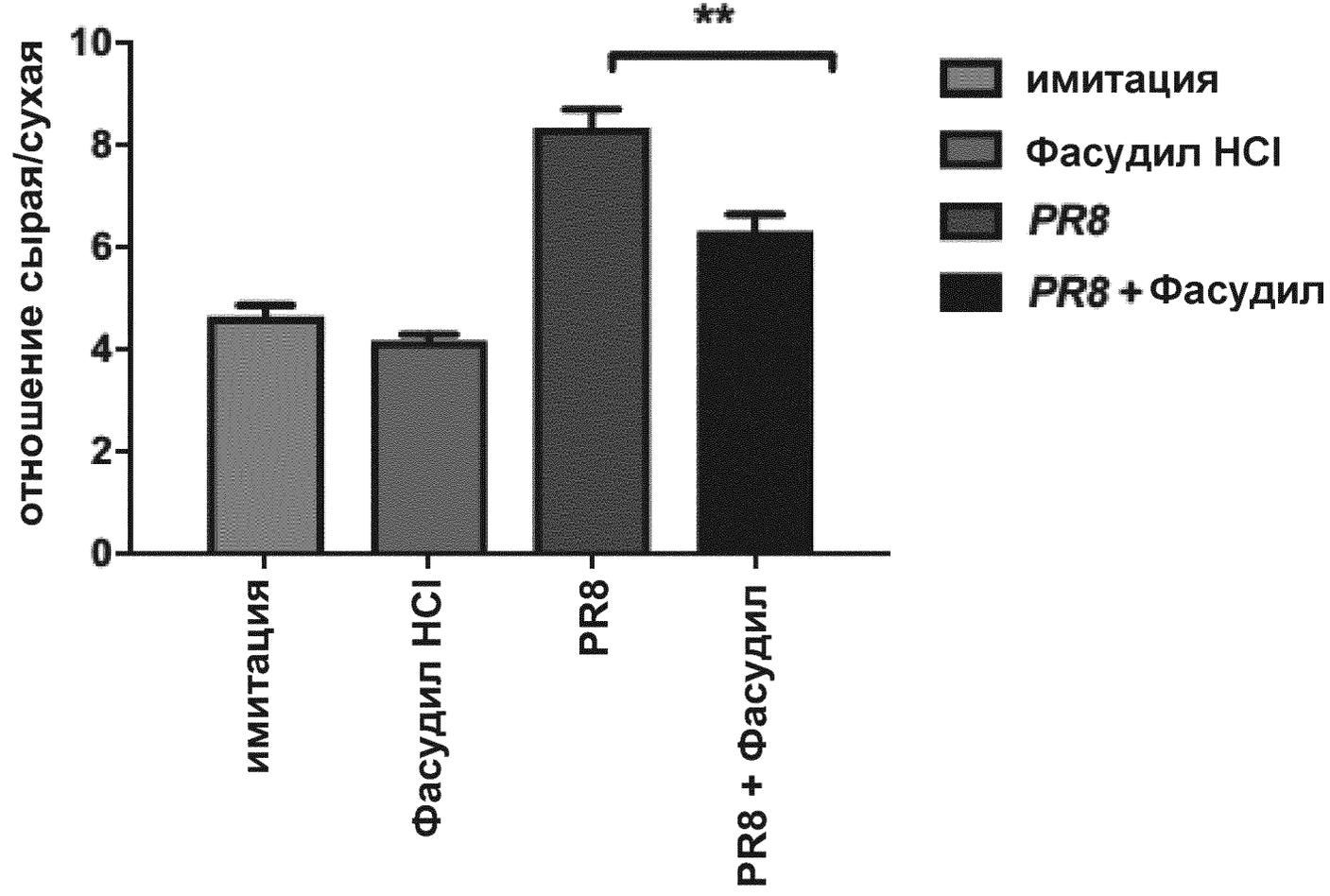


Фиг. 4



Фиг. 5

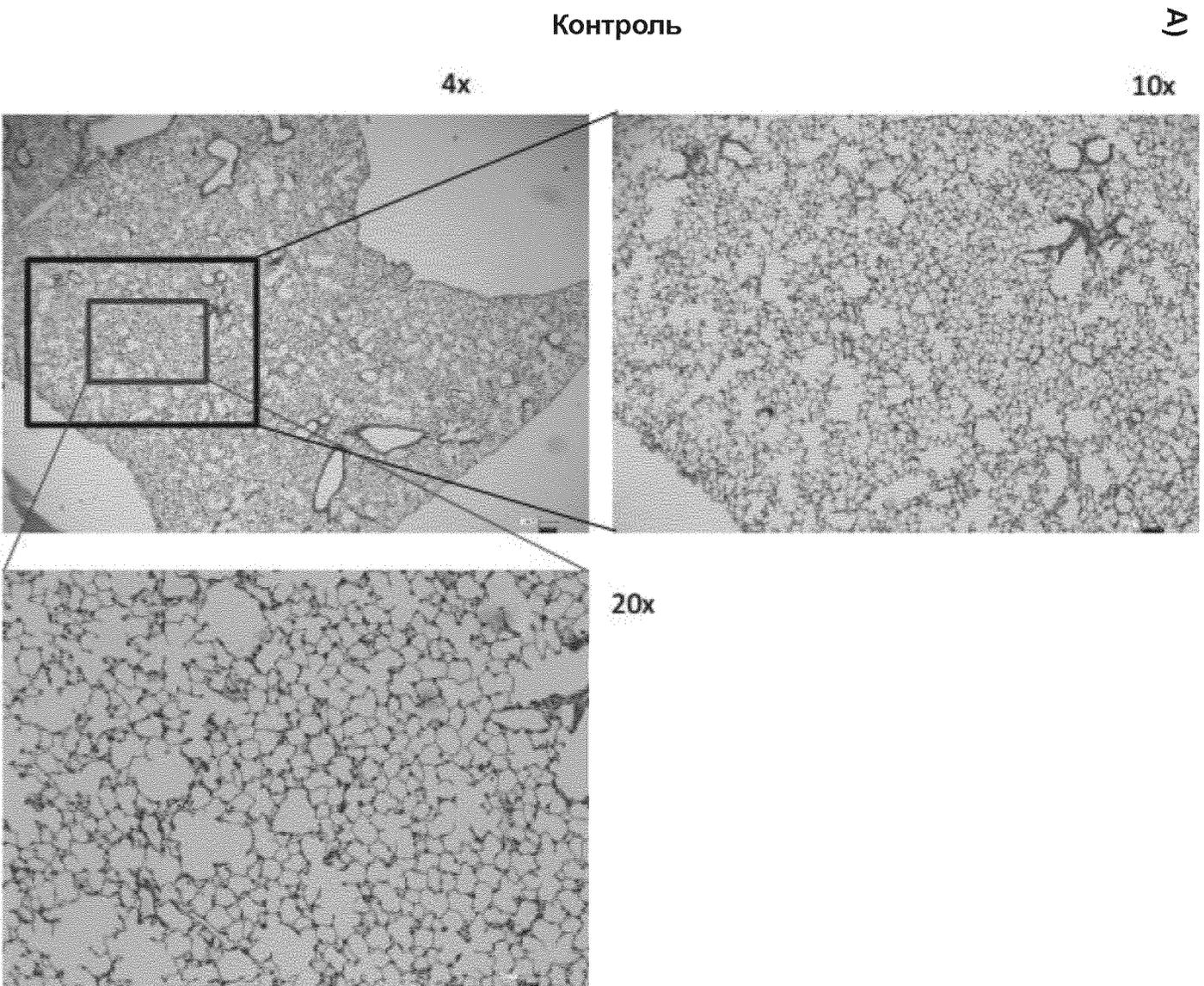




Фиг. 6

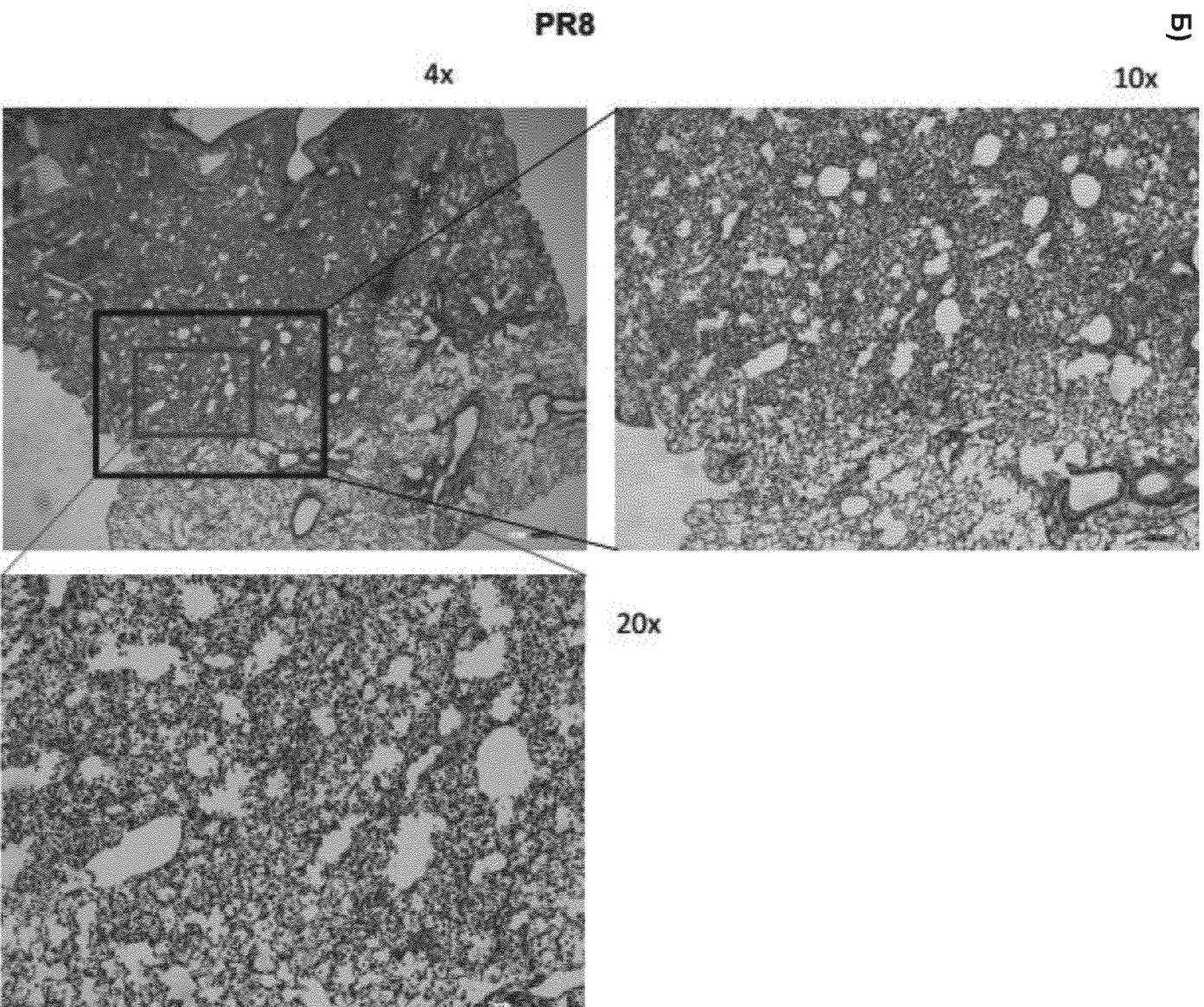
Фиг. 7

A)

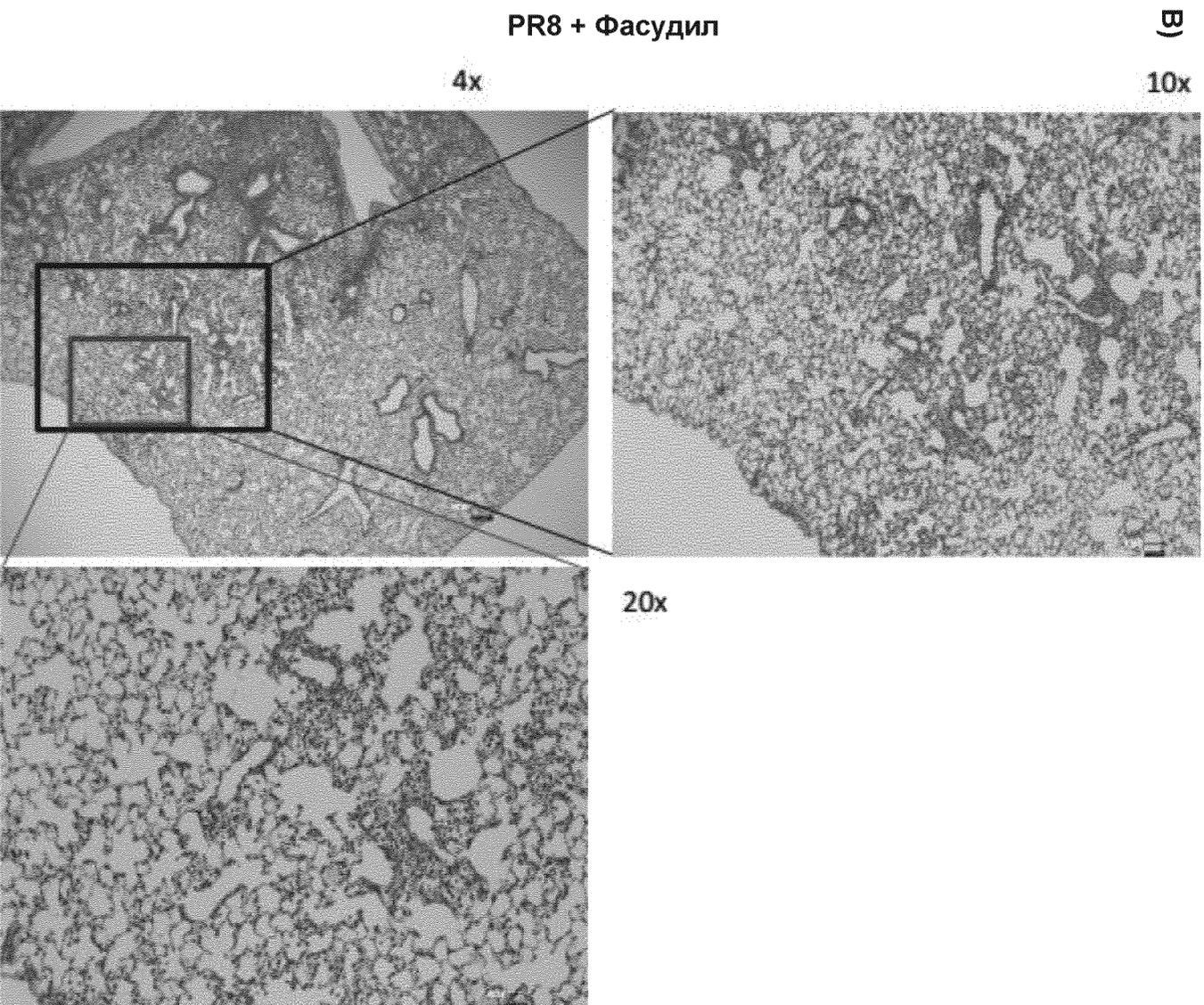


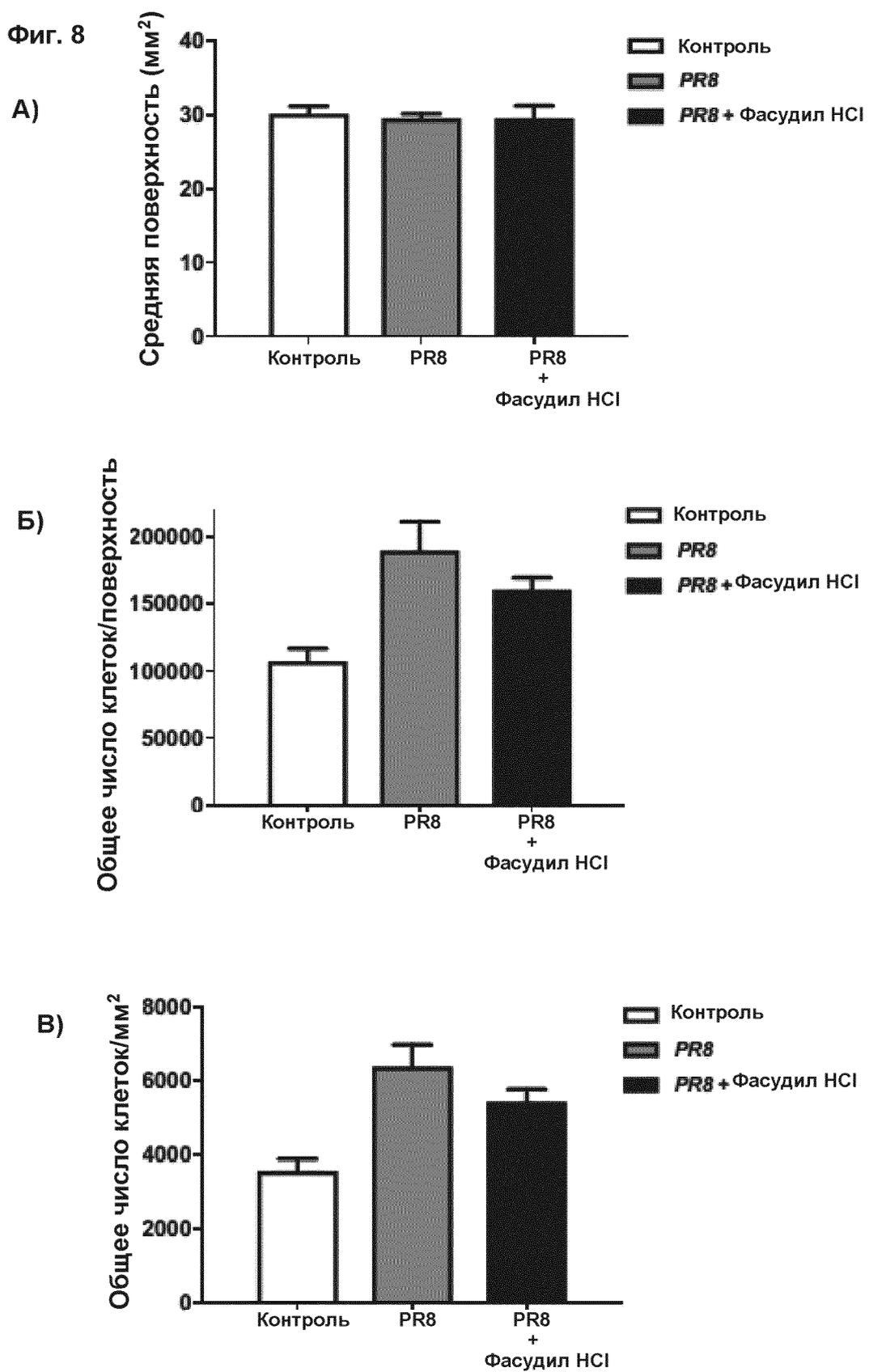
Фиг. 7 (продолжение)

Б)



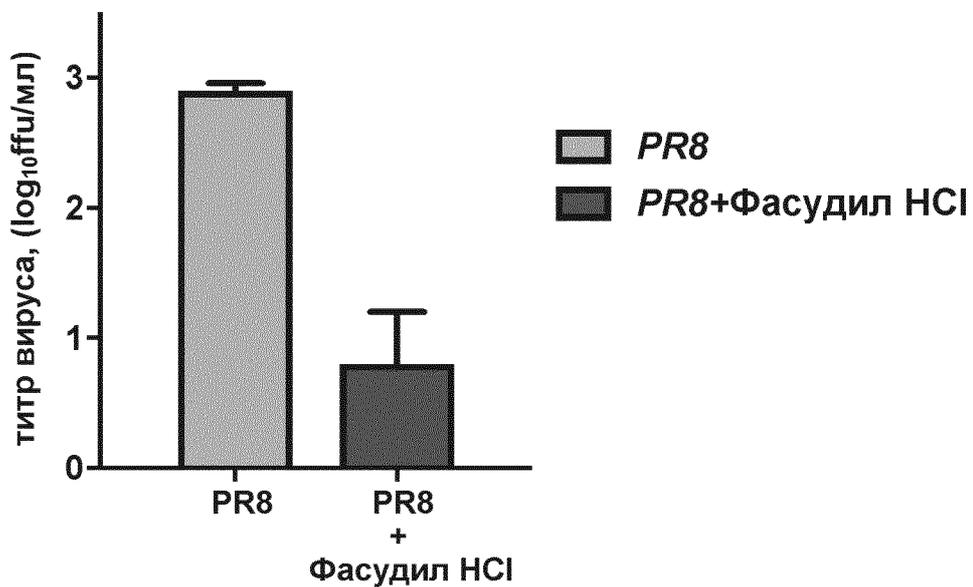
Фиг. 7 (продолжение)



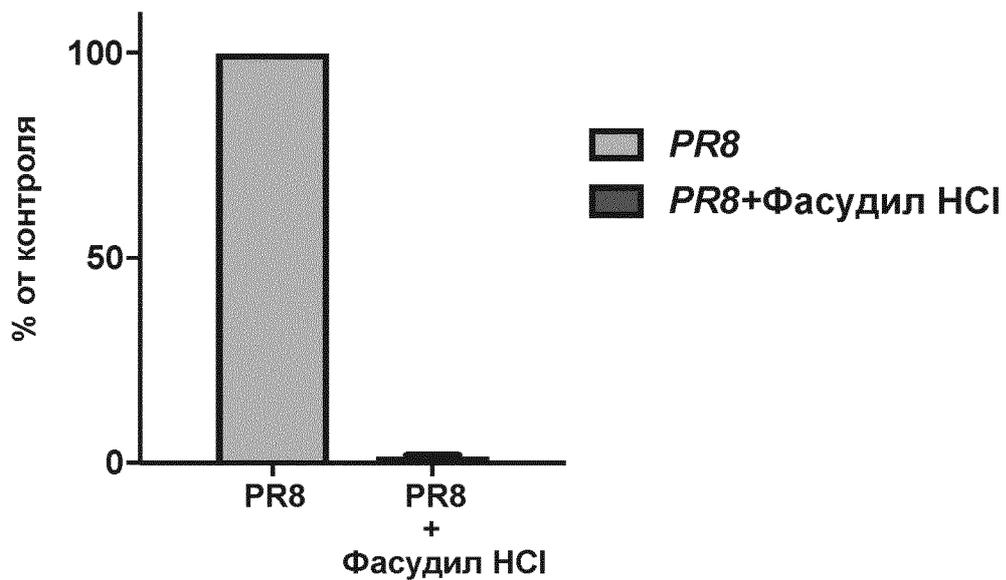


Фиг. 9

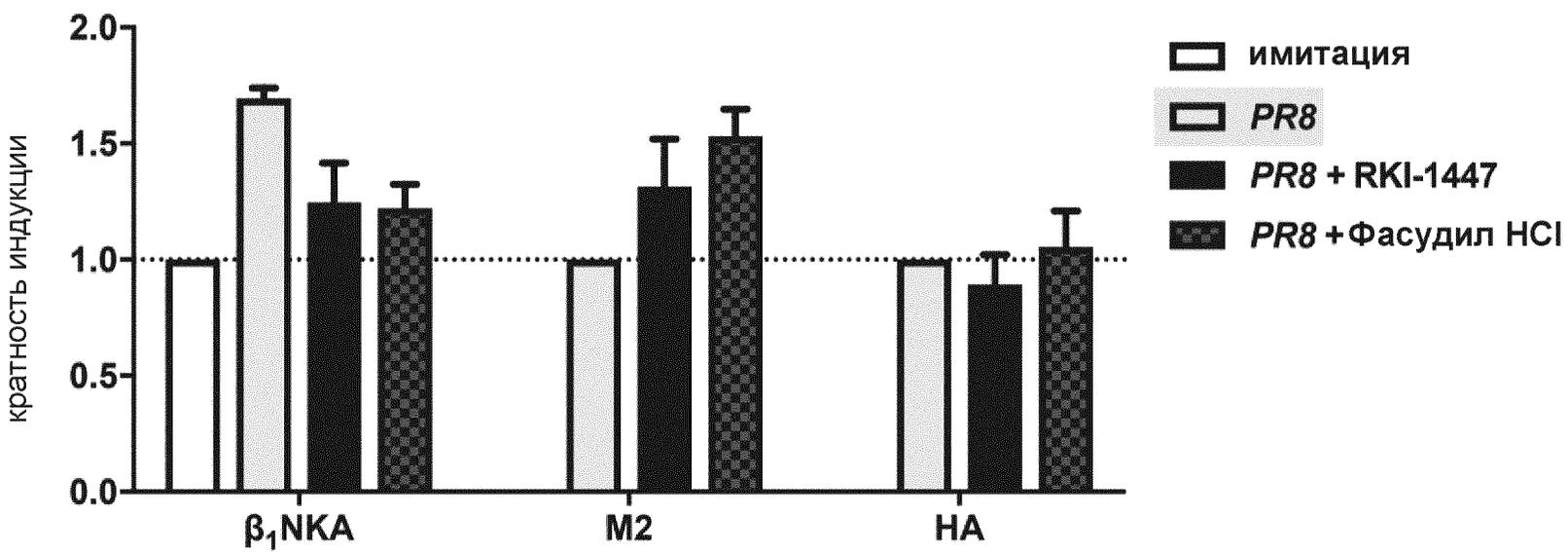
А) титр вируса в гомогенатах легкого, 7 сут.п.и.



Б) титр вируса в гомогенатах легкого, 7 сут.п.и.



Фиг. 10



Фиг. 11

