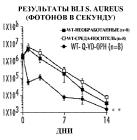
Евразийское патентное ведомство

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

- Дата публикации заявки (43)2023.01.20
- Дата подачи заявки (22)2021.03.30

- (51) Int. Cl. A61K 38/55 (2006.01) **A61P 1/00** (2006.01) A61P 17/02 (2006.01) A61P 31/04 (2006.01) A61P 31/12 (2006.01) A61P 31/14 (2006.01)
- ИНГИБИРОВАНИЕ КАСПАЗЫ ДЛЯ УСИЛЕНИЯ РЕГЕНЕРАЦИИ И ВОССТАНОВЛЕНИЯ ПОСЛЕ ПОВРЕЖДЕНИЯ КОЖИ ИЛИ КИШЕЧНИКА И ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ИЛИ ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ
- 63/001,674 (31)
- (32)2020.03.30
- (33) US
- (86) PCT/US2021/024889
- (87)WO 2021/202530 2021.10.07
- (71)Заявитель:
 - дзе джонс хопкинс ЮНИВЕРСИТИ (US)

- (72)Изобретатель: Гарса Луис, Миллер Ллойд, Альфонс Мартин, Ислам Мохамеед (US)
- (74) Представитель: Медведев В.Н. (RU)
- Изобретение относится к области ингибирования каспазы. Более конкретно, в настоящем изобретении представлены композиции и способы, в которых используются ингибиторы каспазы для усиления восстановления при повреждении и лечения бактериальных и вирусных инфекций. В конкретном варианте осуществления способ лечения бактериальной инфекции и поражений кожи у пациента включает стадию введения пациенту эффективного количества ингибитора каспазы.



ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-576020EA/025

ИНГИБИРОВАНИЕ КАСПАЗЫ ДЛЯ УСИЛЕНИЯ РЕГЕНЕРАЦИИ И ВОССТАНОВЛЕНИЯ ПОСЛЕ ПОВРЕЖДЕНИЯ КОЖИ ИЛИ КИШЕЧНИКА И ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ИЛИ ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

Данная заявка испрашивает приоритет предварительной заявки США № 63/001674, поданной 30 марта 2020 г., которая полностью включена в данный документ посредством ссылки.

ПОЛОЖЕНИЕ О ПОДДЕРЖКЕ ПРАВИТЕЛЬСТВА

Данное изобретение было сделано при поддержке правительства в рамках гранта № AR074846, гранта № AR073665 и гранта № AR069502, присужденных Национальным институтом здравоохранения. Правительство обладает определенными правами на настоящее изобретение.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

Настоящее изобретение относится к области ингибирования каспазы. Более конкретно, в настоящем изобретении представлены композиции и способы, в которых используются ингибиторы каспазы для усиления восстановления при повреждении и лечения бактериальных и вирусных инфекций.

ВКЛЮЧЕНИЕ МАТЕРИАЛОВ, ПРЕДСТАВЛЕННЫХ В ЭЛЕКТРОННОМ ВИДЕ, В ВИДЕ ССЫЛОК

Данная заявка содержит перечень последовательностей. Он был подан в электронном виде посредством EFS-Web в виде текстового файла ASCII под названием «Р16005-02_ST25.txt». Перечень последовательностей имеет размер 1490 байт и был создан 30 марта 2021 года. Настоящим он включен посредством ссылки в всей своей полноте.

ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Бактериальные инфекции, устойчивые к антибиотикам, стали серьезным глобальным кризисом в области здравоохранения, что привело к возникновению трудноизлечимых инфекций с высокой заболеваемостью, смертностью и значительным экономическим бременем (1). В эпоху сокращающегося ассортимента противомикробных препаратов существует неудовлетворенная клиническая потребность в разработке направленных на хозяина средств терапии, которые задействуют иммунные ответы хозяина, как альтернативный подход к борьбе с такими бактериальными инфекциями (2). В частности, внебольничный метициллин-устойчивый Staphylococcus aureus (CA-MRSA) вызывает тяжелые инфекции кожи и мягких тканей (SSTI), а также инвазивные инфекции (например, флегмону, пневмонию, эндокардит, остеомиелит и сепсис) у здоровых в остальном людей (3). SSTI в основном обусловлены S. aureus (в том числе CA-MRSA) (а также другими бактериями, в том числе Streptococcus pyogenes и Pseudomonas aeruginosa) и приводят к более чем 14 миллионам амбулаторных посещений и посещений кабинета

неотложной помощи и более чем 750000 госпитализаций в год в США (4). Это соответствует заболеваемости SSTI, составляющей 48,5 на 1000 пациенто-лет, что превышает заболеваемость инфекциями мочевыводящих путей и пневмонией (4).

терапевтического нацеливания на обусловленные CA-MRSA SSTI нейтрофильный абсцесс, состоящий из миелоидных клеток (в частности нейтрофилов, а также моноцитов и макрофагов), является ключевым защитным ответом хозяина, который обеспечивает отгораживание патогена, предупреждение инвазивного распространения и способствует клиренсу бактерий (5). Важная роль нейтрофилов, моноцитов и макрофагов в защите хозяина дополнительно подтверждается существованием порообразующих токсинов S. aureus (т. е. α-токсина, лейкоцидина Пантона-Валентина [PVL], LukED, γгемолизина и LukAB), которые опосредуют гибель клеток у миелоидных клеток для избежания воздействия их функций защиты хозяина - фагоцитоза и уничтожения бактерий (5). Хотя предпринимаются усилия по непосредственному нацеливанию в отношении нейтрализации токсинов S. aureus с помощью вакцин и малых пептидов и молекул (5), авторы настоящего изобретения предположили, что противоположный подход, способствующий выживанию миелоидных клеток, сохранит их иммунную функцию и обеспечит терапевтическое преимущество. Предполагается, что во время инфекций, обусловленных S. aureus, происходят три типа гибели клеток, в том числе: (1) пироптоз инфламмасомо-зависимая воспалительная гибель клеток, обычно запускаемая инфламмасомой, состоящей из содержащего пириновый домен белка 3 семейства белков с нуклеотид-связывающим доменом и лейцин-богатым повтором [NLRP3] и апоптозассоциированного «крапинко»-подобного белка, содержащего домен рекрутирования каспазы [ASC], которая активирует процессирование каспазой-1 или -11 про-IL-1β до зрелого IL-1β и образование индуцируемых гасдермином D пор в клеточной мембране, что приводит к гибели клеток (как наблюдается при заражении, осуществляемом посредством S. aureus, in vitro (6-8) и in vivo (9-11)); (2) апоптоз - невоспалительный тип запрограммированной гибели клеток, опосредованный каспазами активирующими исполнительные каспазы 3 и 7 (как наблюдается при заражении, осуществляемом посредством S. aureus, in vitro и in vivo (12-14)); и (3) некроптоз воспалительная гибель клеток, опосредованная активацией рецепторов смерти (т. е., наступающей после связывания TNF, Fas/CD95 и связанного с TNF лиганда, индуцирующего апоптоз [TRAIL]), которое запускает киназу 1 взаимодействующего белка (RIP) (RIPK1)/RIPK3/подобный домену киназы смешанного происхождения (MLKL) (как наблюдается при заражении, осуществляемом посредством S. aureus, in vitro и in vivo (15, 16)).

Хинолин-val-asp-дифторфеноксиметилкетон (Q-VD-OPH) представляет собой панкаспазный ингибитор, который ковалентно связывается и необратимо блокирует многие каспазы (каспазы 1, 3 и 7-12) и характеризуется способностью проникать в клетки и отсутствием токсичности in vivo (17,18). Q-VD-OPH ингибирует апоптоз в нескольких доклинических моделях неинфекционного повреждения и вирусной инфекции (19-22) и может ингибировать или индуцировать некроптоз, ассоциированный с церебральной ишемией или вирусной инфекцией, обусловленной гепатитом C, соответственно (21, 22). Q-VD-OPH также блокирует каспазы 1 и 11 (23, 24) и, таким образом, может влиять на пироптоз. Поэтому авторы настоящего изобретения приняли решение определить, характеризуется ли Q-VD-OPH терапевтической эффективностью, посредством дифференцированного механистического воздействия на пироптоз, апоптоз и некроптоз в доклинической модели инфекции кожи, обусловленной CA-MRSA, на мышах.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение основано, по меньшей мере частично, на открытии того, что ингибиторы каспазы можно применять для усиления регенерации и восстановления после повреждения кожи или кишечника, лечения бактериальных инфекций и поражений кожи, а также для лечения вирусных инфекций.

В одном аспекте настоящее изобретение можно применять для лечения бактериальных инфекций и поражений кожи. Действительно, в настоящем изобретении представлены ингибиторы каспазы в качестве альтернативы антибиотикам путем вовлечения иммунного ответа хозяина для содействия клиренсу бактериальных инфекций. В США в год происходит более 14 миллионов амбулаторных/ЕК посещений и 750000 госпитализаций. Кроме того, только в США от инвазивных инфекций, устойчивых к антибиотикам, страдают 2 миллиона человек, при этом количество смертей составляет 23000 в год. Применение ингибиторов каспазы в настоящем изобретении является революционным, поскольку они могут обеспечивать борьбу с бактериальной инфекцией в альтернативы антибиотикотерапии или применяться сочетании антибиотикотерапией. Это позволит улучшить результаты лечения предупредить распространение устойчивости к антибиотикам. Как описано в примере 2 и на фигурах, ингибитор каспазы применяли для уменьшения бактериальной нагрузки и размеров поражения кожи при инфекции кожи, обусловленной Staphylococcus aureus, инфекции кожи, обусловленной Streptococcus группы A (Streptococcus pyogenes), и инфекции кожи, обусловленной Pseudomonas aeruginosa.

На основании описанных в данном документе вариантов осуществления и экспериментов, в другом аспекте настоящее изобретение может быть полезно для лечения вирусных инфекций. В конкретном варианте осуществления композиции и способы по настоящему изобретению можно применять для лечения COVID19. Клинические признаки COVID19 включают повреждение органов (LDH, LFT, тропонин), острый респираторный дистресс-синдром (ARDS) И сепсис. В тяжелых иммунологические признаки включают высокий уровень С-реактивного белка (CRP), высокий уровень цитокинов (IL-2R, IL-6, IL-10, TNF), низкий уровень лимфоцитов (CD4 и CD8) и низкий уровень INF-у (Chen et al. JCI 2020). Цель терапии в тяжелых случаях включает уменьшение вирусной нагрузки, уменьшение бактериальной уменьшение повреждения органов, усиление восстановления органов и контроль коагуляции. Иммунологические цели включают повышение уровня

противовирусного/противомикробного иммунитета, уменьшение уровня апоптоза, повышение регенерации тканей и модулирование/уменьшение уровня гиперактивного иммунного ответа. Композиции и способы по настоящему изобретению, в которых используются ингибиторы каспазы, можно применять для лечения вирусных инфекций, в том числе COVID19. Таким образом, в одном варианте осуществления способ лечения COVID19 у пациента включает стадию введения ингибитора каспазы. В конкретном варианте осуществления ингибитор каспазы предусматривает Q-VD-OPh. В другом варианте осуществления способ дополнительно включает введение агониста TLR3.

В другом аспекте ингибиторы каспазы можно применять для усиления регенерации и восстановления после повреждения кожи или кишечника. В конкретных вариантах осуществления композиции и способы по настоящему изобретению можно применять для лечения рубцевания, ран или любого типа временных повреждений кожи или кишечника. Более конкретно, ингибиторы каспазы можно применять после любого повреждения кожи или кишечника, являющегося следствием хирургического вмешательства заболевания, в том числе обширного хирургического вмешательства на кишечнике, операции на коже или ожогов. Другие примеры включают без ограничения заживление после спонтанной или ятрогенной перфорации кишечника, особенно в контексте сепсиса. Также включены пути применения ингибирования каспазы в комбинации с dsRNA в косметологии для способствования омоложению и регенерации. В отдельных вариантах осуществления ингибиторы каспазы применяют в комбинации с агонистами TLR3. Варианты осуществления раскрыты в Garza et al., патенте США № 10105305, выданном 13 октября 2018 года, который настоящим включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

В нескольких вариантах осуществления в настоящем изобретении представлены способы и композиции, применимые для стимуляции de novo образования волосяных фолликулов. В отдельных вариантах осуществления способы и композиции по настоящему изобретению применимы для стимуляции индуцируемого раной de novo образования волос (WIHN). В одном варианте осуществления способ стимулирования de novo образования волосяных фолликулов у субъекта включает стадию введения субъекту эффективного количества ингибитора каспазы, необязательно в комбинации с агонистом TLR3. В определенных вариантах осуществления агонист TLR3 представляет собой двухнитевую РНК (dsRNA). В конкретном варианте осуществления у субъекта имеется алопеция. В другом варианте осуществления субъект является лысым. В другом варианте осуществления у субъекта имеется рана. В настоящем изобретении также представлен способ лечения рубца у субъекта, включающий стадию введения субъекту эффективного количества ингибитора каспазы, необязательно в комбинации с агонистом TLR3.

В отдельных вариантах осуществления ингибитор каспазы и/или агонист TLR3 вводят непосредственно в участок на субъекте, требующий de novo образования волосяных фолликулов. В конкретном варианте осуществления ингибитор каспазы и/или агонист TLR3 вводят местно. В другом варианте осуществления ингибитор каспазы и/или

агонист TLR3 вводят путем инъекции. В определенных вариантах осуществления агонист TLR3 представляет собой полиинозиновую-полицитидиловую кислоту (поли(I:C)). Агонист TLR3 также может представлять собой Hiltonol® или Ampligen®. В другом варианте осуществления агонист TLR3 предусматривает IPH3102.

В настоящем изобретении также представлено применение ингибитора каспазы и/или агонистов TLR3 (например, dsRNA) в качестве средств непосредственного стимулирования de novo образования волос местно, - в виде либо поверхностной инъекции, либо крема для местного применения, либо аналогичного способа. Композиции по настоящему изобретению также можно применять в способе обработки удаленных клеток для повышения их способности к регенерации и de novo образованию волосяных фолликулов с последующей имплантацией таких клеток субъекту. Композиции по настоящему изобретению также можно применять для активации кератиноцитов для применения в скрининговых исследованиях лекарственных средств для выявления соединений, которые усиливают или ингибируют способность к de novo образованию волос, и, в частности, активацию пути WNT.

В еще одном аспекте в настоящем изобретении представлены способы и композиции, применимые для лечения распространенной мужской формы выпадения волос. В одном варианте осуществления способ лечения распространенной мужской формы выпадения волос у субъекта включает стадию введения субъекту эффективного количества ингибитора каспазы, необязательно в комбинации с агонистом TLR3. В определенных вариантах осуществления агонист TLR3 представляет собой двухнитевую РНК (dsRNA). В отдельных вариантах осуществления ингибитор каспазы и/или агонист TLR3 вводят непосредственно в участок выпадения волос у субъекта. В конкретных вариантах осуществления ингибитор каспазы и/или агонист TLR3 вводят местно. В альтернативном варианте осуществления ингибитор каспазы и/или агонист TLR3 вводят путем инъекции. Ингибитор каспазы и/или агонисты TLR3 можно применять локально или также в отношении культивируемых клеток (аутологичных или аллогенных) ex vivo, которые затем вводят пациенту. В отдельных вариантах осуществления агонист TLR3 представляет собой полиинозиновую-полицитидиловую кислоту (поли(I:C)). В других вариантах осуществления de novo образование волосяных фолликулов можно стимулировать с помощью LL37 отдельно или в комбинации с агонистом TLR3. Кроме того, распространенную мужскую форму выпадения волос можно лечить с применением LL37 отдельно или в комбинации с агонистом TLR3.

В настоящем изобретении также представлены композиции для осуществления описанных в данном документе способов. В частности, в настоящем изобретении представлена композиция, содержащая агонист TLR3 и фармацевтический носитель. В определенных вариантах осуществления агонист TLR3 представляет собой двухнитевую РНК (dsRNA). В определенных вариантах осуществления, где агонист TLR3 представляет собой полиинозиновую-полицитидиловую кислоту (поли(I:C)). В еще одном варианте осуществления композиция содержит LL-37. В отдельных вариантах осуществления

композиция содержит dsRNA и LL-37.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

ФИГ. 1A-1J. Q-VD-OPH обладает терапевтическим действием в отношении инфекции кожи, обусловленной S. aureus, у мышей. Мышей либо не обрабатывали, либо обрабатывали средой-носителем, либо однократной дозой пан-каспазного ингибитора Q-VD-OPH (20 мг/кг і. р.) (n=8-10 мышей/группа) через 4 часа после инокуляции кожи посредством і. d. введения S. aureus. ФИГ. 1A. Репрезентативные цифровые фотографические изображения. ФИГ. 1В. Репрезентативная биолюминесцентная визуализация (BLI) in vivo. Φ ИГ. 1С. Среднее значение размера поражения (мм) \pm SEM. Φ ИГ. 1D. Среднее значение сигналов BLI in vivo (фотонов/с) \pm SEM (логарифмическая шкала). ФИГ. 1E. КОЕ $ex\ vivo\$ (медиана $\pm\ ICR$) в день 3. ФИГ. 1F. Репрезентативные гистологические срезы, окрашенные с помощью Н&Е, полученные от необработанных мышей и мышей, обработанных с помощью Q-VD-OPH, в день 3. Масштабные отрезки=560 мкм. Горизонтальные скобки=ширина некротического поражения кожи. ФИГ. 1G. Репрезентативные гистологические срезы, окрашенные с помощью Н&Е, полученные от необработанных мышей и мышей, обработанных с помощью Q-VD-OPH, в день 3. Масштабные отрезки=240 мкм. Черные стрелки обозначают периферические края для длины бактериальной полосы. ФИГ. 1Н. Ширина некротического поражения кожи (мм) (медиана и ICR). $\Phi U \Gamma$. 11. Площадь абсцесса (см²) (медиана и ICR). $\Phi U \Gamma$. 1J. Длина бактериальной полосы (мм) (медиана и ICR). *P<0,05, при сравнении мышей, обработанных с помощью Q-VD-OPH, с необработанными мышами или мышами, обработанными средой-носителем, при расчете с помощью 2-факторного ANOVA-теста для множественных сравнений с поправкой Бонферрони (ФИГ. 1С, 1D) или 2-стороннего непарного t-теста Стьюдента (ФИГ. 1E, 1H, 1I, 1J). Данные представляют собой свод данных, полученных в ходе по меньшей мере 2 независимых экспериментов.

ФИГ. 2A-2H. В терапевтический механизм Q-VD-OPH вовлечено повышение содержания моноцитов и макрофагов и он осуществляется независимо от IL-1 β .Мышей не обрабатывали или обрабатывали однократной дозой Q-VD-OPH (20 мг/кг і. р.) (n=10 мышей/группа) через 4 часа после инокуляции кожи посредством і. d. введения S. aureus. ФИГ. 2A. Репрезентативные графики, полученные посредством проточной цитометрии, для моноцитов (CD45 $^+$ CD11b $^+$ CD115 $^+$ клетки), макрофагов (CD45 $^+$ CD11b $^+$ F4/80 $^+$ клетки), нейтрофилов (CD45 $^+$ CD115 $^-$ CD11b $^+$ и LyG hi LyC $^{low/int}$), выделенных из инфицированной кожи в день 1. ФИГ. 2B. Процентная доля и абсолютные числа моноцитов, макрофагов и нейтрофилов, выделенных из инфицированной кожи в день 1 (медиана \pm ICR). ФИГ. 2C. Репрезентативные гистограммы, полученные посредством проточной цитометрии, для клеточной экспрессии внутриклеточного про-IL-1 β $^+$ по сравнению с изотипическим контролем (Ctrl) в день 1. ФИГ. 2D. Средняя интенсивность флуоресценции (MFI) для про-IL-1 β $^+$ клеток (медиана и ICR) в день 1. ФИГ. 2E. Процентная доля и абсолютные числа про-IL-1 β $^+$ нейтрофилов, моноцитов и макрофагов при отсутствии обработки и при обработке с помощью Q-VD-OPH \pm SEM в день 1. ФИГ. 2F. Сывороточный IL-1 β (пг/мл)

 \pm SEM в дни 1 и 3. ФИГ. 2G. Среднее значение размера поражения (мм) \pm SEM. ФИГ. 2H. Среднее значение сигналов BLI in vivo (фотонов/с) \pm SEM (логарифмическая шкала). Данные для необработанных мышей WT, полученные в то же время, показаны в качестве эталона (без статистического сравнения) (ФИГ. 2G, 2H). *P<0,05, при сравнении мышей, обработанных с помощью Q-VD-OPH, с необработанными мышами WT или IL-1 β -/-мышами, при расчете с помощью 2-стороннего непарного t-теста Стьюдента (ФИГ. 2B, 2D, 2E, 2F) или 2-факторного ANOVA (ФИГ. 2G, 2H). пs=незначимый. Данные представляют собой свод данных, полученных в ходе по меньшей мере 2 независимых экспериментов.

ФИГ. 3A-3J. Q-VD-OPH ингибирует образование «крапинок» ASC in vivo. Мышей с ASC-цитрин не обрабатывали или обрабатывали однократной дозой O-VD-OPH (20 мг/кг і. р.) (n=5-10 мышей/группа) через 4 часа после инокуляции кожи посредством і. d. введения S. aureus. ФИГ. 3A. Репрезентативная биолюминесцентная визуализация in vivo (BLI) через 6 часов после обработки с помощью Q-VD-OPH. ФИГ. 3В. Сигналы BLI in vivo (фотонов/с) (медиана и ICR) (логарифмическая шкала). ФИГ. 3C. Репрезентативная флуоресцентная визуализация (FLI) «крапинок» ASC in vivo. ФИГ. 3D. Среднее значение FLI «крапинок» ASC in vivo (медиана и ICR). ФИГ. 3E. Репрезентативные графики, посредством viSNE, из анализа методом проточной показывающие уровень экспрессии ASC-цитрин и общий уровень образования «крапинок» ASC (анализ PuLSA) в дни 0 и 1 ± обработка Q-VD-ОРН. ФИГ. 3F. Процентная доля и абсолютные числа клеток с ASC-цитрин/живых клеток (медиана и ICR). ФИГ. 3G. Репрезентативный общий уровень экспрессии ASC и общий уровень образования «крапинок» ASC соответственно в дни 0 и $1 \pm$ обработка Q-VD-OPH. ФИГ. 3H. Процентная доля и абсолютные числа экспрессии «крапинок» ASC/ASC-цитрин (медиана и ICR). ФИГ. 31. Среднее значение размера поражения (мм) ± SEM. ФИГ. 3J. Среднее значение сигналов BLI in vivo (фотонов/с) ± SEM (логарифмическая шкала). Данные для необработанных мышей WT, полученные в то же время, показаны в качестве эталона (без статистического сравнения) (ФИГ. 3I, 3J). *Р<0,05, при сравнении мышей, обработанных с помощью Q-VD-OPH, с необработанными мышами WT или ASC-/мышами, при расчете с помощью 2-стороннего непарного t-теста Стьюдента (ФИГ. 3B, 3D, 3F, 3H) или 2-факторного ANOVA (ФИГ. 3I, 3J). ns=незначимый. Данные представляют собой свод данных, полученных в ходе по меньшей мере 2 независимых экспериментов.

 Φ ИГ. 4A-4H. В терапевтический механизм Q-VD-OPH не вовлечены каспазы 1 и 11 или гасдермин-D. Каспаза-1^{-/-} мышей, каспаза-11^{-/-} мышей, каспаза-1/11^{-/-} мышей или гасдермин D^{-/-} мышей не обрабатывали или обрабатывали с помощью однократной дозы Q-VD-OPH (20 мг/кг і. р.) (n=5-10 мышей/группа) через 4 часа после инокуляции кожи посредством і. d. введения S. aureus. Φ ИГ. 4A, 4C, 4E, 4G. Среднее значение размера поражения (мм) \pm SEM. Φ ИГ. 4B, 4D, 4F, 4H. Среднее значение сигналов BLI іп vivo (фотонов/c) \pm SEM (логарифмическая шкала). Данные для необработанных мышей WT,

полученные в то же время, показаны в качестве эталона (без статистического сравнения) (ФИГ. 4A-4G). *P<0,05, при сравнении мышей, обработанных с помощью Q-VD-OPH, с необработанными каспаза- $1^{-/-}$, каспаза- $11^{-/-}$, каспаза- $1/11^{-/-}$ или гасдермин $D^{-/-}$ мышами, при расчете с помощью 2-факторного ANOVA. Данные являются репрезентативными для 2 независимых экспериментов.

ФИГ. 5A-5G. Q-VD-OPH обеспечивает уменьшение количества апоптотических нейтрофилов/моноцитов и увеличение количества некроптозных макрофагов. Мышей WT не обрабатывали или обрабатывали однократной дозой O-VD-OPH (20 мг/кг і. р.) (n=5 мышей/группа) через 4 часа после инокуляции кожи посредством і. d. введения S. aureus и оценивали суспензию единичных клеток с инфицированной кожи в день 1. ФИГ. 5А. Репрезентативные графики, полученные посредством проточной цитометрии, показывающие содержание аннексин V+ клеток (ранние апоптотические клетки) среди СD45⁺ клеток, выделенных из инфицированной кожи в день 1. ФИГ. 5В. Общая процентная доля и абсолютные числа аннексин V^+ клеток (медиана и ICR). ФИГ. 5С. Процентная доля и абсолютные числа аннексин V^+ нейтрофилов, моноцитов и макрофагов (медиана и ICR). ФИГ. 5D. Репрезентативная гистограмма, полученная посредством проточной цитометрии, показывающая уровень клеток с внутриклеточной экспрессией рМLКL⁺ (маркер некроптоза) по сравнению с изотипическим контролем (Ctrl). ФИГ. 5E. Средняя интенсивность флуоресценции (MFI) pMLKL⁺ клеток (медиана и ICR). ФИГ. 5F. Процентная доля и абсолютные числа общих активных pMLKL⁺ клеток (медиана и ICR). Φ ИГ. 5G. Процентная доля активных рМLКL⁺ нейтрофилов, моноцитов и макрофагов \pm SEM. *P<0,05, при сравнении мышей, обработанных с помощью Q-VD-OPH, с необработанными мышами, при расчете с помощью 2-стороннего непарного t-теста Стьюдента. ns=незначимый. Данные являются репрезентативными для 2 независимых экспериментов.

ФИГ. 6А-6К. Эффективность Q-VD-ОРН зависит от повышенных уровней и активности TNF при снижении бактериальной нагрузки in vivo. Мышей WT, TNF-/мышей, мышей WT ± блокирующие mAb к TNF или IL-1R/TNF^{-/-} мышей не обрабатывали или обрабатывали с помощью однократной дозы Q-VD-OPH (20 мг/кг i. p.) (n=5-10 мышей/группа) через 4 часа после инокуляции кожи посредством і. d. введения S. aureus. ФИГ. Репрезентативная гистограмма, полученная посредством проточной цитометрии, показывающая уровень клеток с внутриклеточной экспрессией TNF⁺ по сравнению с изотипическим контролем (Ctrl) в день 1. ФИГ. 6В. Средняя интенсивность флуоресценции (MFI) TNF⁺ клеток (медиана и ICR) в день 1. ФИГ. 6С. Процентная доля и абсолютные числа TNF^+ нейтрофилов, моноцитов и макрофагов \pm SEM в день 1. ФИГ. 6D. Средние уровни TNF в сыворотке крови ($\Pi \Gamma / M \Pi$) \pm SEM в дни 1 и 3. ФИГ. 6E, 6G, 6J. Среднее значение размера поражения (мм) ± SEM. ФИГ. 6F, 6H, 6K. Среднее значение сигналов BLI in vivo (фотонов/c) ± SEM (логарифмическая шкала). ФИГ. 6I. График введения блокирующих mAb к TNF (или mAb изотипического контроля IgG [IgG Ctrl] $[\Phi U\Gamma. 12])$ ± обработка с помощью Q-VD-OPH. *P<0,05, при сравнении мышей,

обработанных с помощью Q-VD-OPH, с необработанными мышами, при расчете с помощью 2-стороннего непарного t-теста Стьюдента (ФИГ. 6В, 6С, 6D) или 2-факторного ANOVA (ФИГ. 6F-6K). ns=незначимый. Данные представляют собой свод данных (ФИГ. 6A-6D) или репрезентативные данные (ФИГ. 6E-6K) 2 независимых экспериментов.

ФИГ. 7А-7С. Комбинированное ингибирование каспаз 3, 8 и 9 обеспечивало снижение уровня апоптоза, а комбинированное ингибирование каспаз 1, 8 и 11 индуцировало выработку TNF, аналогично Q-VD-OPH in vitro. BMDM инкубировали с ингибиторами каспаз 1, 3, 8, 9 или 11 (Z-WEHD-FMK [100 мкм], Z-DQMD-FMK [10 мкМ], Z-IETD-FMK [100 мкМ], Z-LEHD-FMK [100 мкМ], ваделолактон [20 мкМ] соответственно), ингибиторами каспаз 3, 8 и 9 в комбинации, ингибиторами каспаз 1, 8 и 11 в комбинации, Q-VD-OPH (10 мкг/мл), эмрикасаном (9 мкг/мл) или не обрабатывали (без обработки), и добавляли живые S. aureus на 6 часов с добавлением гентамицина после первого часа культивирования. Анализировали уровни маркера раннего апоптоза (аннексин- V^+) и внутриклеточные уровни TNF. ФИГ. 7A. Репрезентативные гистограммы, полученные посредством проточной цитометрии, показывающие содержание СD11b+ аннексин- V^{+} BMDM. ФИГ. 7В. Процентная доля аннексин- V^{+} CD11 b^{+} BMDM \pm SEM. ФИГ. 7С. Репрезентативные гистограммы, полученный посредством проточной цитометрии, показывающие уровень экспрессии TNF в сравнении с изотипическим контролем (Ctrl) CD11b⁺ BMDM. (D) Процентная доля TNF⁺ клеток CD11b⁺ BMDM ± SEM. *P<0,05, при сравнении обработки каждым из ингибиторов каспазы или Q-VD-OPH с отсутствием обработки (без обработки), при расчете с помощью 2-факторного ANOVAтеста для множественных сравнений с поправкой Бонферрони. ns=незначимый. Данные представляют собой комбинацию 3 независимых экспериментов in vitro.

ФИГ. 8A-8I. Q-VD-ОРН эффективен против инфекции кожи, обусловленной S. pyogenes или P. aeruginosa у мышей и смертности вследствие бактериальной диссеминации у мышей. Мышей либо не обрабатывали, либо обрабатывали с помощью однократной дозы пан-каспазного ингибитора Q-VD-OPH (20 мг/кг i. p.) (n=10 мышей/группа) через 4 часа после инокуляции кожи посредством і. d. введения S. pyogenes или Р. aeruginosa. ФИГ. 8A. Репрезентативные цифровые фотографические изображения S. pyogenes. ФИГ. 8В. Репрезентативная биолюминесцентная визуализация (BLI) in vivo S. pyogenes. ФИГ. 8С. Среднее значение размера поражения (мм) \pm SEM в случае S. pyogenes. Φ ИГ. 8D. Среднее значение сигналов BLI in vivo (фотонов/с) \pm SEM (логарифмическая шкала) в случае S. pyogenes. ФИГ. 8E. Репрезентативные цифровые фотографические изображения P. aeruginosa. ФИГ. 8F. Репрезентативная биолюминесцентная визуализация (BLI) in vivo P. aeruginosa. ФИГ. 8G. Среднее значение размера поражения (мм) ± SEM в случае Р. aeruginosa. ФИГ. 8H. Среднее значение сигналов BLI in vivo (фотонов/с) ± SEM (логарифмическая шкала) в случае P. aeruginosa. ФИГ. 8І. Кривые выживаемости Каплана-Мейера для необработанных мышей, и мышей, обработанных с помощью Q-VD-OPH, после і. d. инокуляции с помощью посредством Р. aeruginosa. *P<0,05, при сравнении мышей, обработанных с помощью Q-VD-OPH, с

необработанными мышами, при расчете с помощью 2-факторного ANOVA (ФИГ.8С, 8D, 8G, 8H) или логрангового критерия Мантеля-Кокса (ФИГ.8I). Данные представляют собой свод данных, полученных в ходе 2 независимых экспериментов.

ФИГ. 9A-9C. Q-VD-OPH не обладает непосредственной антибактериальной активностью in vitro в отношении S. aureus. Бактериальные бульонные культуры инкубировали со средой-носителем (Veh) или различными концентрациями Q-VD-OPH (10 мкг/мл, 100 мкг/мл и 1000 мкг/мл). Рост бактерий (OD_{600}) и метаболическую активность, которые измеряли с помощью биолюминесценции (лм), измеряли (n=3) в трех повторностях в течение 10 часов, при этом измерения регистрировали с 20-минутными интервалами. Рост бактерий (ОД₆₀₀) (ФИГ. 9А), люминесценция (лм) (ФИГ. 9В) и КОЕ (медиана \pm ICR) через 10 часов (в конце эксперимента) (ФИГ. 9C) в бульонных культурах S. aureus, инкубированных с Q-VD-OPH или Veh. Кривые представлены плавными линиями ± SEM. ns=незначимый, при расчете с помощью 2-факторного ANOVA-теста для Бонферрони. множественных сравнений c поправкой Данные являются репрезентативными для 3 независимых экспериментов, при этом все экспериментальные группы Q-VD-OPH и группы Veh были представлены в трех повторностях.

 Φ ИГ. 10A-10D. Стратегия гейтирования для популяций клеток. Φ ИГ. 10A. Репрезентативные графики, полученные посредством проточной цитометрии, для CD45⁺ популяции. Φ ИГ. 10B-10D. Репрезентативные графики, полученные посредством проточной цитометрии, показывающие стратегию гейтирования для моноцитов (CD45⁺CD11b⁺CD115⁺), макрофагов (CD45⁺CD11b⁺ F4/80⁺) и нейтрофилов (CD45⁺CD11b⁺Ly6G^{hi} Ly6C^{int/low}) соответственно.

ФИГ. 11А-11Е. viSNE-анализ популяционного кластера при экспрессии ASC-цитрин. Мышей с ASC-цитрин обрабатывали с использованием однократной дозы Q-VD-OPH 20 мг/кг (i. р.) или без нее в ходе инокуляции с помощью 3×10^7 KOE/100 мкл CA-MRSA (i. d.). ФИГ. 11А. Репрезентативные графики, полученные посредством проточной цитометрии, и график, полученный посредством viSNE, показывающие гейты живых клеток и кластеры (C1, C3-C5) популяций клеток. ФИГ. 11В-11Е. Репрезентативные графики, полученные посредством viSNE, показывающие мечение нейтрофилов (CD45 $^+$ CD11b $^+$ Ly6G hi Ly6C $^{int/low}$), клеток Лангерганса (CD45 $^+$ CD103 $^-$), дендритных клеток моноцитарного происхождения (MDDC) (CD45 $^+$ CD11c $^+$ CD115 $^+$) и моноцитов (CD45 $^+$ CD11b $^+$ CD115 $^+$) соответственно.

ФИГ. 12A-12B. Обработка изотипическим контролем в случае ФИГ. 6I-К с блокирующим mAb к TNF, в модели CA-MRSA на мышах, обработанных пан-каспазным ингибитором Q-VD-OPH. Мышей WT (n=5 мышей/группа) обрабатывали с помощью mAb изотипического контроля IgG (изотипический контроль mAb для блокирующего mAb к TNF на ФИГ. 6I-К) \pm однократная доза Q-VD-OPH 20 мг/кг. (i. р.) через 4 часа после инокуляции посредством 3×10^7 КОЕ/100 мкл CA-MRSA. ФИГ. 12A-12B. Графическое представление размера поражения и BLI мышей с изотипическим Ctrl IgG (α -IgG Ctrl) с обработкой с помощью Q-VD-OPH или без нее соответственно. *P<0,05, при сравнении

мышей, обработанных Q-VD-OPH, с необработанными мышами, при расчете с помощью 2-факторного ANOVA.

ФИГ. 13А-13С. Обработка с помощью Q-VD-OPH в случае TNF^{-/-} уменьшает инфильтрацию нейтрофилов. TNF^{-/-} мышей не обрабатывали (n=7) или обрабатывали однократной дозой Q-VD-OPH (20 мг/кг і. р.) (n=8) через 4 часа после инокуляции кожи посредством і. d. введения S. aureus. ФИГ. 13A. Репрезентативные графики, полученные посредством проточной цитометрии, для CD45⁺ популяции и график, полученный посредством viSNE, показывающий моноциты, макрофаги и нейтрофилы. ФИГ. 13B. Репрезентативные графики, полученные посредством viSNE, для моноцитов (клетки CD45⁺CD11b⁺CD115⁺), макрофагов CD45⁺CD11b⁺F4/80⁺), (клетки нейтрофилов (CD45⁺CD115⁻CD11b⁺ и LyG^{hi}LyC^{low/int}), выделенных из инфицированной кожи в день 1. ФИГ. 13С. Процентная доля и абсолютные числа моноцитов, макрофагов и нейтрофилов, выделенных из инфицированной кожи в день 1 (медиана \pm ICR). *P<0,05, при сравнении мышей, обработанных с помощью Q-VD-OPH, с необработанными мышами, при расчете с помощью 2-стороннего непарного t-теста Стьюдента. ns=незначимый. Данные являются репрезентативными для 2 независимых экспериментов.

ФИГ. 14A-14G. Q-VD-OPH обеспечивает уменьшение уровня апоптотических нейтрофилов и увеличение уровня некроптозных нейтрофилов и макрофагов у TNF-/мышей. TNF^{-/-} мышей не обрабатывали (n=7) или обрабатывали однократной дозой O-VD-ОРН (20 мг/кг і. р.) (n=8) через 4 часа после инокуляции кожи посредством і. d. введения S. aureus, и оценивали суспензию единичных клеток с инфицированной кожи в день 1. ФИГ. 14А. Репрезентативные графики, полученные посредством viSNE, показывающие содержание аннексин V⁺ клеток (ранние апоптотические клетки) из CD45⁺ клеток, выделенных из инфицированной кожи в день 1. ФИГ. 14В. Общая процентная доля и абсолютные числа аннексин V^+ клеток (медиана и ICR). ФИГ. 14С. Процентная доля и абсолютные числа аннексин V^+ нейтрофилов, моноцитов и макрофагов (медиана и ICR). ФИГ. 14D. Репрезентативные графики, полученные посредством viSNE, показывающие содержание клеток с внутриклеточной экспрессией рМLКL⁺. ФИГ. 14Е. Средняя интенсивность флуоресценции (MFI) pMLKL+ клеток (медиана и ICR). ФИГ. 14F. Процентная доля и абсолютные числа общих активных pMLKL⁺ клеток (медиана и ICR). ФИГ. 14G. Процентная доля активных pMLKL⁺ нейтрофилов, моноцитов и макрофагов ± SEM. *P<0,05, при сравнении мышей, обработанных с помощью Q-VD-OPH, с необработанными мышами, при расчете с помощью 2-стороннего непарного t-теста Стьюдента. ns=незначимый. Данные являются репрезентативными для 2 независимых экспериментов.

ФИГ. 15. Q-VD-OPH обеспечивает увеличение уровня некроптоза и уменьшение уровня апоптоза в коже, инфицированной S. aureus, у мышей WT, но не у TNF^{-/-} мышей. Не обработанных мышей WT и TNF^{-/-} мышей не обрабатывали или обрабатывали однократной дозой Q-VD-OPH (20 мг/кг i. p.) (n=3 мыши/группа) через 4 часа после инокуляции кожи посредством i. d. введения S. aureus и инфицированную кожу в день 1

оценивали в отношении экспрессии pMLKL, MLKL, ICAD и β-актина с помощью вестернблот-анализа.

ФИГ. 16A-16D. Комбинированное ингибирование каспаз 3, 8 и 9 обеспечивало снижение уровня апоптоза, а комбинированное ингибирование каспаз 1, 8 и 11 индуцировало выработку TNF, аналогично Q-VD-OPH in vitro. Нейтрофилы инкубировали с ингибиторами каспаз 1, 3, 8, 9 или 11 (Z-WEHD-FMK [100 мкМ], Z-DQMD-FMK [10 мкМ], Z-IETD-FMK [100 мкМ], Z-LEHD-FMK [100 мкМ], ваделолактон [20 мкМ] соответственно), ингибиторами каспаз 3, 8 и 9 в комбинации, ингибиторами каспаз 1, 8 и 11 в комбинации, Q-VD-OPH (10 мкг/мл), эмрикасаном (9 мкг/мл) или не обрабатывали (без обработки), и добавляли живые S. aureus на 6 часов с добавлением гентамицина после первого часа культивирования. Анализировали уровни маркера раннего апоптоза $(ahhekcuh-V^+)$ и внутриклеточные уровни TNF. ФИГ. 16A. Репрезентативные гистограммы, полученные посредством проточной цитометрии, $V^{+}CD11b^{+}Ly6G^{hi}$ нейтрофилов. ФИГ. 16В. Процентная доля аннексин- $V^{+}CD11b^{+}Ly6G^{hi}$ нейтрофилов \pm SEM. ФИГ. 16С. Репрезентативные гистограммы, полученные посредством проточной цитометрии, для экспрессии TNF в аннексин-V⁺CD11b⁺Ly6G^{hi} нейтрофилах. Φ ИГ. 16D. Процентная доля TNF⁺ аннексин-V⁺CD11b⁺Ly6G^{hi} клеток \pm SEM. *P<0,05, при сравнении группы обработки каждым из ингибиторов каспазы или Q-VD-ОРН с отсутствием обработки (без обработки), при расчете с помощью 2-факторного ANOVA-теста для множественных сравнений с поправкой Бонферрони. ns=незначимый. Данные представляют собой комбинацию 3 независимых экспериментов in vitro.

ФИГ. 17А-17Н. Ингибирование каспаз 3 и 9 обеспечивает снижение уровня апоптоза, а ингибирование каспаз 1, 8 и 11 независимо индуцирует выработку TNF in vitro. BMDM или нейтрофилы инкубировали с ингибиторами каспаз 1, 3, 8, 9 или 11 (Z-WEHD-FMK [100 MKM], Z-DQMD-FMK [10 MKM], Z-IETD-FMK [100 MKM], Z-LEHD-FMK [100 мкМ], ваделолактон [20 мкМ] соответственно) или не обрабатывали (без обработки), и добавляли живые S. aureus на 6 часов с добавлением гентамицина после первого часа культивирования. Анализировали уровни маркера раннего апоптоза (аннексин-V⁺) и внутриклеточные уровни TNF. ФИГ. 17A. Репрезентативные гистограммы, полученные посредством проточной цитометрии, показывающие содержание CD11b+ аннексин-V+ ВМDМ. Φ ИГ. 17В. Процентная доля аннексин-V⁺CD11b⁺ ВМDМ \pm SEM. Φ ИГ. 17С. Репрезентативные гистограммы, полученный посредством проточной цитометрии, показывающие уровень экспрессии TNF в сравнении с изотипическим контролем (Ctrl) $CD11b^{\dagger}$ BMDM. ФИГ. 17D. Процентная доля TNF^{\dagger} клеток $CD11b^{\dagger}$ BMDM \pm SEM. ФИГ. 17Е. Репрезентативные гистограммы, полученные посредством проточной цитометрии, аннексин-V⁺CD11b⁺Ly6G^{hi} нейтрофилов. ФИГ. 17F. Процентная доля аннексин- $V^{+}CD11b^{+}Ly6G^{hi}$ нейтрофилов \pm SEM. ФИГ. 17G. Репрезентативные гистограммы, полученные посредством проточной цитометрии, для экспрессии TNF в аннексин- $V^{+}CD11b^{+}Ly6G^{hi}$ нейтрофилах. ФИГ. 17H. Процентная доля TNF^{+} $V^{+}CD11b^{+}Lv6G^{hi}$ клеток $\pm SEM$. *P<0,05, при сравнении группы обработки каждым из

ингибиторов каспазы или Q-VD-OPH с отсутствием обработки (без обработки), при расчете с помощью 2-факторного ANOVA-теста для множественных сравнений с поправкой Бонферрони. ns=незначимый. Данные представляют собой комбинацию 3 независимых экспериментов in vitro.

 Φ ИГ. 18А-18С. Стратегия гейтирования популяций клеток для ВМDМ и нейтрофилов. Φ ИГ. 18А, 18В. Репрезентативные графики, полученные посредством проточной цитометрии, показывающие стратегию гейтирования для гейтирования для CD11b⁺ ВМDМ и гейтирование по аннексин V⁺ соответственно. Φ ИГ. 18С. Репрезентативные графики, полученные посредством проточной цитометрии, показывающие содержание CD11b⁺Ly6G^{hi} нейтрофилов в костном мозге мышей (PMN).

ФИГ. 19А-19В. Жизнеспособность ВМDМ и нейтрофилов в экспериментах in vitro на ФИГ. 7 и ФИГ. 16 и 17. ВМDМ или нейтрофилы (PMN) инкубировали с ингибиторами каспаз 1, 3, 8, 9 и 11 (Z-WEHD-FMK [100 мкМ], Z-DQMD-FMK [10 мкМ], Z-IETD-FMK [100 мкМ], Z-LEHD-FMK [100 мкМ], ваделолактон [20 мкМ] соответственно), Q-VD-OPH (10 мкг/мл), эмрикасан (9 мкг/мл) или не обрабатывали (без обработки) и добавляли живые S. аureus на 6 часов с добавлением гентамицина после первого часа культивирования. Жизнеспособность клеток измеряют в виде содержания Zombie UV-отрицательных клеток с помощью проточной цитометрии. ФИГ. 19А. Среднее значение живых клеток ± SEM для РМN. ns=незначимый. Каждый ингибитор каспазы или Q-VD-OPH по сравнению с отсутствием обработки (без обработки), рассчитанный с помощью 2-стороннего непарного t-теста Стьюдента. Данные представляют собой комбинацию 3 независимых экспериментов со стимуляцией.

ФИГ. 20А-20В. Q-VD-OPH обеспечивает увеличение уровня некроптоза in vitro в ВМDМ и РМN от мышей WT. ВМDМ или нейтрофилы мышей WT обрабатывали с помощью Q-VD-OPH (10 мкг/мл) или положительного контроля некроптоза [миметик SMAC (100 нм) + TNF (20 нг/мл) + zVAD (20 мкМ) в течение 8 часов] или не обрабатывали (без обработки) и добавляли живые S. aureus на 6 часов с добавлением гентамицина после первого часа культивирования. Определение экспрессии белка в случае рМLКL, MLKL и β-актина проводили из 3 лунок, объединенных вместе из культивируемых ВМDМ (ФИГ. 20А) и РМN (ФИГ. 20В) соответственно, с помощью вестерн-блот-анализа.

 Φ ИГ. 21A-21D. Q-VD-OPH не обладает непосредственной антибактериальной активностью in vitro в отношении S. pyogenes и P. aeruginosa. Бактериальные бульонные культуры инкубировали со средой-носителем (Veh) или различными концентрациями Q-VD-OPH (10 мкг/мл, 100 мкг/мл и 1000 мкг/мл). Рост бактерий (OD₆₀₀) и метаболическую активность, которые измеряли с помощью биолюминесценции (лм), измеряли (n=3) в трех повторностях в течение 10 часов, при этом измерения регистрировали с 20-минутными интервалами. Рост бактерий (OD₆₀₀) (Φ ИГ. 21A) и люминесценция (лм) (Φ ИГ. 21B) в бульонных культурах S. pyogenes, инкубированных с Q-VD-OPH или Veh. Рост бактерий

 (OD_{600}) (ФИГ. 21С) и люминесценция (лм) (ФИГ. 21D) в бульонных культурах Р. аегиginosa, инкубированных с Q-VD-OPH или Veh. Кривые представлены плавными линиями \pm SEM. ns=незначимый, при расчете с помощью 2-факторного ANOVA-теста для множественных сравнений с поправкой Бонферрони. Данные являются репрезентативными для 3 независимых экспериментов, при этом все экспериментальные группы Q-VD-OPH и группы Veh были представлены в трех повторностях.

ФИГ. 22A-22E. Q-VD-OPH не ингибирует активность бактериальных цистеиновых протеаз S. aureus и S. pyogenes. Стафопаин A (sspP), стафопаин B (sspB) или стрептопаин В (speB) в количестве 1 нг, 10 нг или 100 нг инкубировали с 10 мкг/мл Q-VD-OPH или без него в течение 20 часов вместе с желатином или эластином. ФИГ. 22А. Активность протеазы в отношении желатина \pm SEM измеряли для sspP, sspB и speB (1, 10 и 100 нг) отдельно или в комбинации с Q-VD-OPH (10 мкг/мл) в течение 20 часов. Отдельно Q-VD-OPH (10, 100, 1000 мкг/мл), коллагеназу (0,4 ЕД/мл) и коллагеназу с ингибитором 1,10фенантролином (1 мМ) использовали для положительного контроля и контроля ингибирования соответственно. ФИГ. 22B. Активность протеазы в отношении эластина ± SEM измеряли для sspP, sspB и speB (1, 10 и 100 нг) отдельно или в комбинации с Q-VD-ОРН (10 мкг/мл) в течение 20 часов. Q-VD-ОРН отдельно (10, 100, 1000 мкг/мл), эластазу эластазу ингибитором N-метоксисукцинил-Ala-Ala-Pro-Valc хлорметилкетоном (0,1 мМ) использовали для положительного контроля и контроля ингибирования соответственно. ns=не существенно, при расчете с помощью 2-стороннего непарного t -теста Стьюдента. Данные представляют собой комбинацию данных, полученных в ходе 3 независимых экспериментов. Блоты белков для (ФИГ. 22C) sspP, (ФИГ. 22D) sspB и (ФИГ. 22E) speB отдельно или в комбинации с Q-VD-OPH (10 мкг/мл) в течение 2 часов разделяли на мембране PVDF и окрашивали для определения уровня разрушения белка с помощью колориметрического окрашивания белка.

ФИГ. 23А-23G. Сигнатура распознавания межвидовой dsRNA в ходе регенерации кожи; РНКаза L подавляет маркеры регенерации. ФИГ. 23А. Трехсторонняя диаграмма Венна показывает наличие перекрытия по 14 генам, присутствующих во всех 200 основных генах в микроматрицах in vivo индуцированного раной de novo образования волос (WIHN), со сравнением C57BL/6 x FVB x SJL (штамм с высоким уровнем регенерацией) и C57BL/6 (штамм с низким уровнем регенерации), в клинических испытаниях in vivo на людях, получающих обработку омолаживающим лазером, и в отношении кератиноцитов человека in vitro, обработанных dsRNA/поли(I:C) в качестве положительного контроля. Микроматрицы, полученные от человека in vitro и in vivo, содержат в общей сложности по 49395 аннотированных транскриптов каждая, а микроматрица, полученная от мыши in vivo, содержит 53145 транскриптов. ФИГ. 23В. Анализ генной онтологии каждого из отдельных перечней 200 основных генов, выявляющий преобладание представителей семейства ОАЅ в каждом наборе данных. ФИГ. 23С. Термины генной онтологии, обогащенные 14 перекрывающимися генами из всех трех наборов данных, включают активацию генов семейства ОАЅ. Графики-врезки

показывают кратные изменения экспрессии генов по сравнению с исходной микроматрицей для генов, присутствующих в этой категории; зеленый и синий обозначают мышь и человека соответственно. ФИГ. 23D. При анализе рибонуклеазы РНКазы L (расположенной в цепи передачи сигнала ниже OAS и активируемой ей) диаграмма Венна показывает 200 основных перекрывающихся генов у Rnasel^{-/-} мышей после нанесения раны (при отслоении струпа) и в кератиноцитах человека, обработанных с помощью siRNA, нацеленной на PHКазу L. Категории GO включают множественные пути развития. Данные микроматрицы in vivo содержат 22206 транскриптов, а данные секвенирования PHK in vitro содержат 33264 транскрипта. ФИГ. 23E-23G. Обработка с помощью поли(I:C) (10 мкг/мл) кератиноцитов человека, трансфицированных siRNA PHКазы L, индуцирует образование многочисленных маркеров морфогенеза (ФИГ. 23E; n=3, p<0,05), в том числе WNT7B (зеленый), наличие которого показано посредством иммуноокрашивания (ФИГ. 23F), но ингибирует образование маркеров дифференцировки (ФИГ. 23G; n=3, p<0,05).

ФИГ. 24A-24G. При потере РНКазы L усиливается регенерация волосяных фолликулов (WIHN). ФИГ. 24A. Rnasel^{-/-} мыши демонстрируют повышенный уровень индуцированного раной de novo образования волос (WIHN), при этом в присутствии поли(I:C) супер-повышение остается интактным (конфокальная сканирующая лазерная микроскопия, CSLM, изображения; n=10 каждое, p<0,0001). На каждом изображении пунктирная красная рамка указывает на область регенерации волосяных фолликулов. Φ ИГ. 24В. Rnasel^{-/-} мыши демонстрируют нормальную скорость закрытия раны (n=10 против 4). ФИГ. 24С. Трансэпидермальную потерю воды (TEWL) измеряли в центре и на периферии зажившей кожи в день отслоения струпа (WD10) как у мышей дикого типа, так и у Rnasel^{-/-} мышей. Rnasel^{-/-} мыши демонстрируют значительно более низкие показатели TEWL, что согласуется с улучшением барьерной функции после нанесения раны по сравнению с мышами дикого типа (n=3, p<0,005, p=0001). ФИГ. 24D. Rnasel^{-/-} мыши характеризуются большим уровнем экспрессии генов маркеров морфогенеза в случае Tlr3 (n=3, P<0,01), II6 (n=3, p<0,0001), Wnt7b (n=3, P<0,01) и EdaR (n= 3, p<0,01) в день реэпителизации при измерении посредством qRT-PCR. ФИГ. 24E. Для кожи без раны у Rnasel^{-/-} мышей показана повышенная экспрессия белка в случае маркеров стволовых клеток Krt5 (зеленый), Krt15 (красный) и маркера морфогенеза Wnt7b (зеленый), что было показано с помощью иммунофлуоресценции. ФИГ. 24F. Анализ генной онтологии у Rnasel^{-/-} мышей во время реэпителизации (~ 10 дней после нанесения раны) показывает обогащение по ответу с участием IL-1, нейтрофилам и путям заживления ран. Отдельные гены, соответствующие каждой категории, показаны зеленым цветом. ФИГ. 24G. Через 3 дня после нанесения раны у Rnasel^{-/-} мышей происходит рекрутирование значительно большего количества нейтрофилов в раневом ложе. Ly6G (зеленый) представляет собой маркер нейтрофилов, и H4Cit (красный) представляет собой маркер цитруллинированных гистонов, высвобождаемых из нейтрофилов во время NETo3a. Окрашивание ядер проводили с применением DAPI (синий). Белая пунктирная линия обозначает дорсальный

край раневого ложа. Белый масштабный отрезок=100 мкм.

ФИГ. 25A-25K. РНКаза L подавляет экспрессию IL36, которая необходима для WIHN и способствует этому. ФИГ. 25А. Анализ генной онтологии 100 основных генов в микроматрице аутбредных мышей линии дикого типа с высокой регенерацией (C57BL/6 x FVB x SJL) по сравнению с C57BL/6 дикого типа с более низкой регенерацией и 100 основных белков, обнаруженных в центре (высокая регенерация) по сравнению с краевыми (низкая регенерация) областями раны демонстрируют общие признаки для представителя семейства IL-1 II36α (красный) и белков гранул нейтрофилов (оранжевый). ФИГ. 25В. Анализ тепловой карты из (а) показывает, что обогащение по представителям семейства IL-1 происходит у мышей с высокой регенерацией и в центре раны, в частности по представителям семейства IL36 (красный). Также обогащение происходит по белкам гранул нейтрофилов (оранжевые), которые, как известно, протеолитически расщепляют и активируют белки II36. ФИГ. 25С. В ткани раны, полученной от Rnasel^{-/-} мышей обнаруживается повышенный уровень белка І Зба, как показано с помощью вестернблот-анализа. ФИГ. 25D. Как кожа с раной, так и кожа без раны, демонстрируют повышенную экспрессию IL36a (зеленый цвет) у Rnasel^{-/-} мышей. Экспрессия IL36a достигает пика как у мышей дикого типа, так и у Rnasel^{-/-} мышей через 3 дня после ФИГ. 25Е. Кератиноциты, собранные у Rnasel^{-/-} мышей и культивированные, активно секретируют больше ІСЗ6а по сравнению с контролями дикого типа, как показано с помощью вестерн-блота. ФИГ. 25F. Инъекция 50 нг рекомбинантного белка IL36α под струп в WD7 способствует WIHN (n=3, P<0,01). ФИГ. 25G. Гистология (E) срезов кожи мышей для сравнения результатов при обработке средой-носителем или rmIL36α. Как видно, образованные de novo волосяные фолликулы (фиолетовый) скоплены в центре рубца. ФИГ. 25H. II36r^{-/-} мыши не способны регенерировать волосяные фолликулы и не реагируют на поли(I:C) (n=3, p<0,01). ФИГ. 25I. Rnasel^{-/-}/II36r^{-/-} мыши теряют способность регенерировать волосяные фолликулы по сравнению с Rnasel^{-/-} мышами (n=7, P<0,0001). ФИГ. 25J. В случае обеспечиваемого siRNA нокдауна IL36α и РНКазы L в кератиноцитах человека не происходит увеличения содержания маркеров морфогенеза WNT7B и IL6 по сравнению с таковым при использовании отдельно siRNA PHKазы L (n=3 каждого, P<0,05). ФИГ. 25К. Обработка кератиноцитов человека рекомбинантным IL36α обеспечивает увеличение уровня экспрессии мРНК WNT7B (n=3, P<0,05), что определяется количественно с помощью qRT-PCR.

ФИГ. 26А-26L. Каспазы, известные медиаторы РНКазы L, расположенные ниже в цепи передачи сигнала, сдерживают высвобождение IL-36 и регенерацию. ФИГ. 26А. Биоинформатический анализ проводили на 200 основных генах, активированных in vivo у Rnasel^{-/-} мышей и на 200 основных генах in vitro в кератиноцитах человека, обработанных siRNA, нацеленной на РНКазу L. Анализ генной онтологии был выполнен на 50 основных общих генах и в его результате выявили сигнатуры биологических процессов транспортировки везикул, протеаз и апоптоза. ФИГ. 26В. С применением перечня генов из

(ФИГ. 26A), авторы данного документа провели скрининг с помощью siRNA в кератиноцитах мыши и идентифицировали каспазу-1 в качестве подходящей мишени, потеря которой индуцировала экспрессию белка ІL-36а. ФИГ. 26С. Обеспечиваемый siRNA нокдаун каспазы-1 в кератиноцитах мыши приводит к повышенной секреции IL36α. ФИГ. 26D. Схема внутрибрюшинной инъекции пан-каспазного ингибитора Q-VD-OPh (1,33 мМ) мышам, которым наносили раны для измерения WIHN. Внутрибрюшинные инъекции делали за один день до и через десять дней после нанесения раны в виде квадратов 1,25 см × 1,25 см у мышей C57BL/J6. Затем мышей умерщвляли в день 21 после нанесения раны для измерения WIHN. ФИГ. 26E. QV-D-OPh индуцирует повышение содержания нейтрофилов в коже без раны, как показано посредством анализа и количественной оценки t-SNE (n=3, P<0,05). ФИГ. 26F. QV-D-OPh в течение 48 часов индуцирует мРНК IL36а в культивируемых кератиноцитах мыши (n=6, ****P<0,0001, **P=0,0012). ФИГ. 26G. QV-D-OPh индуцирует белок IL-36 α без ингибирования антагониста рецептора IL-36rn в лизатах цельных клеток эпителиальных кератиноцитов мыши (P=0,0251, при использовании двухфакторного ANOVA, n=3) ФИГ. 26H. QV-D-OPh (как на ФИГ. 26D) способствует WIHN по сравнению со средой-носителем, как показано с помощью CSLM (n=3 против 4, P<0,001). ФИГ. 26I. Гистология (ФИГ. 26H) срезов кожи мышей для сравнения результатов при обработке средой-носителем и Q-VD-OPH. Как видно, образованные de novo волосяные фолликулы (фиолетовый) скоплены в центре Черный масштабный отрезок=100 мкм. ФИГ. 26Ј. Иммуноокрашивание реэпителизированной ткани раны показывает повышенный уровень Ц36а у мышей, обработанных Q-VD-OPh. ФИГ. 26К. II36r^{-/-} мыши не отвечают на обработку с помощью Q-VD-OPH и не способны к регенерации волосяных фолликулов после нанесения раны (n=4, ns=незначимый). ФИГ. 26L. Гистология рубцов при WIHN из (ФИГ. 26K). Черный масштабный отрезок=200 мкм.

ФИГ. 27А-27Н. Ингибирование каспазы способствует регенерации кишечника у мышей, обработанных с помощью DSS. ФИГ. 27А. Схема внутрибрюшинной инъекции Q-VD-OPh (1,33 мМ) мышам C57BL/J6, обработанным с помощью 4% DSS. ФИГ. 27В. Обработка с помощью Q-VD-OPH может позволить избежать потери веса в модели колита, обусловленного DSS. После 6 дней обработки с помощью DSS у мышей начинают проявляться резкие изменения QVD по сравнению с мышами, обработанными средойносителем (n=4, P<0,05). ФИГ. 27С. Мыши, получавшие Q-VD-OPh, характеризуются большей длиной толстой кишки по сравнению с таковыми, обработанными средойносителем, после повреждения, обусловленного DSS (n=4, P= 0,0203). Длину толстой кишки нормализовали к исходному весу тела. ФИГ. 27D. Q-VD-OPh индуцирует экспрессию IL36α (зеленый) в толстой кишке, как и в коже, ФИГ. 27Е. Q-VD-OPh не позволяет избежать потери веса у II36г^{-/-} мышей (n=3 против 4). ФИГ. 27F. Q-VD-OPh не позволяет избежать укорочения кишечника после обработки с помощью DSS у II36г^{-/-} мышей (n=3 против 4). ФИГ. 27G. Гистология срезов толстой кишки на (ФИГ. 26С) и (ФИГ. 27F), показывающая значительное улучшение ткани после пан-каспазного

ингибирования у мышей дикого типа, в отличие от II36r^{-/-} мышей. ФИГ. 27H. Модель регенерации, выявляющая РНКазу L в качестве супрессора регенерации, который действует посредством стимуляции каспаз и подавления IL-36.

ФИГ. 28А-28В. Протеомный анализ кератиноцитов WT по сравнению с Rnasel^{-/-} кератиноцитами. ФИГ. 28А. 100 основных белков, содержание которых повышено в Rnasel^{-/-} кератиноцитах по сравнению с кератиноцитами дикого типа. ФИГ. 28В. Гены на (ФИГ. 28А) проанализировали с применением генной онтологии и показали значительную стимуляцию биологических процессов путей развития и морфогенеза.

ФИГ. 29А-29D. Анализ circRNA мышей WT по сравнению с Rnasel^{-/-} мышами. ФИГ. 29А-30В. Биоинформационный анализ распространенности circRNA по типу (экзонная, внутригенная, интронная) в коже без раны, извлеченной из мышей дикого типа (ФИГ. 29А) и Rnasel^{-/-} мышей (ФИГ. 29В), для обоих линий показывает преобладание экзонных участков. ФИГ. 29С. Анализ генной онтологии 100 основных circRNA (GFOLD <0,5) у Rnasel^{-/-} мышей по сравнению с мышами дикого типа выявляет активацию биологических процессов развития, морфогенеза и передачи сигнала Wnt. Р-значения рассчитаны с применением нескорректированного точного критерия Фишера. ФИГ. 29D. Преимущественное способствование распространенности circRNA (E-FOLD> 0,5), а не подавление у Rnasel^{-/-} мышей по сравнению с мышами дикого типа, показанное с помощью circRNA-секвен. с использованием в общей сложности 4300 транскриптов.

ФИГ. 30А-30С. Потеря РНКазы L в эпителиальных кератиноцитах мышей индуцирует маркеры морфогенеза, не влияя на уровни интерферона. Потеря РНКазы L, опосредованная siRNA, в эпителиальных кератиноцитах мышей индуцировала образование многочисленных маркеров морфогенеза (ФИГ. 30А), не влияя при этом на уровни интерферонов (ФИГ. 30В), с обработкой с помощью поли(I:C) и без нее (10 мкг/мл, 48 часов) (n=3, P<0,05). ФИГ. 30С. Уровни IL36α и Casp1 повышаются после опосредованной siRNA потери РНКазы L и еще больше повышаются при обработке с помощью поли(I:C) (10 мкг/мл, 48 часов).

 Φ ИГ. 31. Rnasel^{-/-} мыши характеризуются нормальной кинетикой закрытия ран. Грубо говоря, Rnasel^{-/-} мыши демонстрируют нормальную скорость закрытия ран. Изображения раны в дни 0 и 8 (n=10 против 4).

 Φ ИГ. 32. Rnasel^{-/-} мыши имеют более тонкий гиподермальный слой. Окрашивание гематоксилином и эозином ткани без раны у мышей дикого типа и Rnasel^{-/-} мышей показывает, что Rnasel^{-/-} мыши имеют более тонкую гиподерму по сравнению с мышами дикого типа (n=3, P<0,05). Черный масштабный отрезок=100 мкм.

ФИГ. 33A-33C. Rnasel^{-/-} мыши характеризуются повышенными уровнями ретиноевой кислоты в коже. ФИГ. 33A. Количественное определение и анализ уровней ретиноевой кислоты (RA) демонстрируют, что больше RA присутствует у Rnasel^{-/-} мышей по сравнению с мышами дикого типа в коже без раны (n=4, P<0,05). Измерения получали с помощью LC-MS. ФИГ. 33B. Количественное определение и анализ уровней ретинола (ROL) в коже без раны мышей дикого типа и Rnasel^{-/-} мышей не показывает подобного

изменения (n=4, P=н. с.). ФИГ. 33С. Результаты количественного определения и анализа уровней ретинилового эфира (RE) в коже без раны у мышей дикого типа и Rnasel $^{-1}$ мышей являются статистически незначимыми (n=4, p<n. s.).

ФИГ. 34. Rnasel^{-/-} мыши характеризуются повышенными уровнями эндогенной snRNA U1. snRNA U1 измеряли как в участках без раны, так и в участках с зажившими ранами у мышей дикого типа и Rnasel^{-/-} мышей с помощью qRT-PCR с применением специальных зондов TaqMan. По сравнению с мышами дикого типа Rnasel^{-/-} мыши экспрессируют значительно более высокий уровень snRNA U1, чем мыши дикого типа (n=3, p<0,05). snRNA U6 использовали в качестве лабораторного контроля.

ФИГ. 35А-35В. Nlrp3^{-/-} мыши характеризуются усиленным WIHN. ФИГ. 35А. Nlrp3^{-/-} мыши демонстрируют повышенный уровень индуцированного раной de novo образования волос (WIHN) по сравнению с контрольными мышами дикого типа того же возраста. (Изображения CSLM; n=14 против 18 каждое, P= 0,0046). ФИГ. 35В. Химическое ингибирование NLRP3 с помощью MCC950 (100 мкМ) в кератиноцитах человека, обработанных с помощью поли(I:C), обеспечивало увеличение экспрессии маркеров морфогенеза.

ФИГ. 36А-36С. Ингибирование каспазы обеспечивает повышение уровня IL36а в эпителиальных кератиноцитах мыши. ФИГ. 36A. На экспрессию IL36rn и IL36r не влияло ингибирование каспазы в эпителиальных кератиноцитах мыши, обработанных с помощью QV-D-OPh в течение 48 часов. Содержание Tlr3 и воспалительных каспаз 1 и 4 повышалось после обработки с помощью QV-D-OPh (n=3). ФИГ. 36В. Уровни белка IL-36α, но не антагониста рецептора IL-36m, повышались в лизатах цельных клеток из эпителиальных кератиноцитов мыши, обработанных ингибитором каспаз группы 1 Z-WEHD-FMK. На экспрессию IL36rn и IL36r не влияло ингибирование каспазы в эпителиальных кератиноцитах мыши, обработанных с помощью Z-WEHD-FMK в течение 48 часов. Содержание Tlr3 и воспалительных каспаз 1 и 4 повышалось после Z-WEHD-FMK (n=3). ФИГ. 36С. Уровни белка IL-36α повышались в лизатах цельных клеток из эпителиальных кератиноцитов мыши, обработанных пан-ингибитором Результаты являются репрезентативными эмрикасаном. для трех независимых экспериментов.

ФИГ. 37А-37С. Обработка с помощью Q-VD-OPH у мышей, обработанных с помощью DSS, не оказывает существенного влияния на воспаление в крови и толстой кишке. ФИГ. 37А. Содержание циркулирующих нейтрофилов (CD11b+, Ly6G+, Ly6c+) повышалось, а содержание моноцитов (CD11b+, Ly6G-, Ly6c++) снижалось в крови на день 6 7-дневного режима введения доз 4% DSS для индукции колита, что указывает на воспаление (n=5 каждый, P<0,0001 для нейтрофилов и моноцитов). ФИГ. 37В. Через день после прекращения обработки мышей с помощью DSS (D8) уровни нейтрофилов (CD11b+, Ly6G+, Ly6c+), моноцитов (CD11b+, Ly6G-, Ly6c++) и Т-клеток (CD11b+, CD3+) в крови не изменились при сравнении мышей, обработанных с помощью Q-VD-OPh, и мышей, обработанных средой-носителем, что дает возможность предположить, что

воспаление уменьшается после прекращения DSS, независимо от присутствия Q-VD-OPh (n=3 против 4 каждый, ns=незначимый). ФИГ. 37С. Уровни нейтрофилов (CD11b+, Ly6G+, Ly6c+) и моноцитов (CD11b+, Ly6G-, Ly6c++) в толстой кишке после обработки с помощью 4% DSS (D10) согласуются при сравнении мышей, обработанных средойносителем, и мышей, обработанных с помощью Q-VDOPh, что дает возможность предположить, что обработка с помощью Q-VD-OPh способствует скорее регенерации, а не уменьшению воспаления.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Следует понимать, что настоящее изобретение не ограничивается отдельными способами и компонентами и т. д., описанными в данном документе, поскольку они могут отличаться. Следует также понимать, что терминология, используемая в данном документе, используется только для описания отдельных вариантов осуществления и не предназначена для ограничения объема настоящего изобретения. Следует отметить, что при использовании в данном документе и в прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа включают ссылки на множественное число, если контекст явно не указывает иное. Так, например, ссылка на «белок» является ссылкой на один или более белков и включает их эквиваленты, известные специалистам в данной области техники, и т. д.

Если не указано иное, то все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют то же значение, которое обычно понятно специалисту в области техники, к которой относится настоящее изобретение. Описаны конкретные способы, устройства и материалы, несмотря на то, что любые способы и материалы, аналогичные или эквивалентные описанным в данном документе, могут использоваться при практическом осуществлении или испытаниях настоящего изобретения.

Все публикации, приведенные в данном документе, включены в него посредством ссылки, в том числе все журнальные статьи, книги, руководства, опубликованные заявки на патент и выданные патенты. Кроме того, приведены значения некоторых терминов и выражений, используемых в описании, примерах и прилагаемой формуле изобретения. Эти определения не носят ограничительного характера и служат для более четкого понимания некоторых аспектов настоящего изобретения.

I. Определения

Если «приблизительно» используется в связи с числом, это может означать число +/-15%, число плюс 5% или само число без «приблизительно». Например, «приблизительно 100» означает «от 85 включительно до 115 включительно». Если «приблизительно» используется в связи с числовыми диапазонами, например, «от приблизительно 1 до приблизительно 3» или «в диапазоне от приблизительно одного и до приблизительно трех», предпочтительно определение «приблизительно», данное для числа в последнем предложении, применяется к каждому числу, определяющему начало и конец диапазона, отдельно. В определенных вариантах осуществления, если «приблизительно» используется в связи с любыми числовыми значениями, термин

«приблизительно» может быть удален.

Как используется в данном документе, термины «пациент», «субъект» и «субъекты» относятся к животному, предпочтительно млекопитающему, в том числе без ограничения отличному от приматов млекопитающему (например, корове, свинье, лошади, кошке, собаке, крысе и мыши), и отличным от человека приматам (например, обезьяне, такой как яванский макак), и более предпочтительно человеку. В конкретном варианте осуществления субъект или пациент является человеком.

Как используется в данном документе, термин «эффективное количество» относится к количеству средства (например, ингибитора каспазы или другого средства), которое является достаточным, чтобы вызвать необходимый эффект в отдельном контексте; предупредить, уменьшить или облегчить тяжесть, продолжительность и/или прогрессирование заболевания или состояния или одного или более их симптомов; облегчить один или более симптомов заболевания или состояния; предупредить ускорение развития заболевания или состояния; вызвать регрессию заболевания или состояния; предупредить рецидив, развитие или возникновение заболевания или состояния или одного или более их симптомов; или усилить или улучшить профилактический или терапевтический эффект(эффекты) другой терапии (например, профилактического или терапевтического средства).

II. Ингибиторы каспазы

В композициях и способах по настоящему изобретению используются один или более ингибиторов каспазы. Конкретные примеры ингибиторов каспазы включают без ограничения IDN-6556 (Pfizer), IDN-6734 (Pfizer), VX-740 (пралнаскан, Vertex/Aventis) и VX-765 (Vertex/Aventis). Пралнаскан и VX-765 представляют собой обратимые ингибиторы, в то время как IDN-6556 - необратимый. VX-765 представляет собой пролекарство, из которого образуется лекарственное средство VRT-043198. Другие ингибиторы включают NCGC00185682, NCGC00183434 и NCGC00183681.

В других вариантах осуществления ингибиторы каспазы включают структуры, описанные в WO2017/079566, конкретно в параграфе [0020], в том числе IDN6556 (эмрикасан), IDN7314, IDN6734, CTS5814, IDN7568, CTS2891, CTS2357, CTS5674, CTS7186, CTS8931, QVD-OPh, VX166, IDN8126, IDN9103 и VX765 (белнакасн). Каждая из химических структур вышеуказанных веществ включена в данный документ.

Репрезентативные соединения, подходящие для применения в настоящем изобретении, раскрыты в WO2012/134822. В частности, соединения раскрыты в пунктах 1-11 формулы изобретения, а конкретные варианты осуществления включают NSC321205, NSC277584, NSC321206 и NSC310547 (см. соединения А-D соответственно на ФИГ. 1 и стр. 30, строка 4). Каждая из вышеуказанных структур включена в данный документ посредством ссылки.

Другие ингибиторы каспазы включают без ограничения AC-YVAD-FMK; ингибитор каспазы 3 и каспазы 7 AC-DEVD-CHO (N-ацетил-L- α -аспартил-L- α -глутамил-N-(2-карбоксил-1-формилэтил)-L-валинамид, 2,2,2-трифторацетат); ингибитор каспазы-9

Z-LEHD-FMK; ингибиторы каспазы-8 Z-IETD-FMK (FMK007) и эмрикасан (IDN-6556); ингибитор каспазы-6 Z-VEID-FMK; каспазо-3-подобные ингибиторы Z-DEVD-CMK, MX1122 и M867; селективный ингибитор каспазы-3/7 MMPSI и сульфаниламиды изатина. Дополнительные примеры включают трипептидные ингибиторы широкого спектра действия Boc-Asp-FMK, VX-166, Z-VAD-FMK (бензилоксикарбонил-Val-Ala-Aspфторметилкетон), M867, **Z-DEVD-CMK** (бензилоксикарбонил-Asp-Glu-Val-Aspхлорметилкетон), Ac-YVAD-CMK (ацетил-Туг-Val-Ala-Asp-хлорметилкетон), Z-LEHD-(бензилоксикарбонил-Leu-Glu-His-Asp-фторметилкетон). Другие включают VX-166, MX1122, YVAD-CHO, DEVD-CHO, MMPSI, M826 и Ac-DMQD-CHO.

Репрезентативные соединения, подходящие для применения в настоящем изобретении, раскрыты в Lee et al., 28(1) Expert Opin. Ther. Patents 47-59 и включают МЈL-003i (фигура 3(a)), МЈL-002i (фигура 3(b)) и МЈL-001i (фигура 3(c)). Другие соединения в Lee et al. включают химические структуры производных 2-[(4-формил-пиразол-5-ил)-тио]уксусной кислоты (a) и 2-((1-((2,6-диметилциклогексахлорид-1,5-диен-1-ил)метил)-3-этил-4-формил-1Н-пиразол-5-ил)тио)уксусной кислоты (b) (см. фигуру 4). Химические структуры SUN-6 (a), SUN-9 (b), SUN-19 (c) и SUN-21 (d), показанные на фигуре 5, также являются репрезентативными.

Концентрация активного соединения (например, ингибитора каспазы) в фармацевтической композиции зависит от скоростей всасывания, инактивации и выведения активного соединения, физико-химических характеристик соединения, схемы введения доз и вводимого количества, а также других факторов, известных специалистам в данной области техники. Например, доставляемое количество является достаточным для облегчения одного или более симптомов состояний, описанных в данном документе.

В одном варианте осуществления терапевтически эффективная доза должна обеспечивать концентрацию активного ингредиента в сыворотке крови от приблизительно 0,1 нг/мл до приблизительно 50-100 мкг/мл, от приблизительно 0,5 нг/мл до приблизительно 80 мкг/мл, от приблизительно 1 нг/мл до приблизительно 60 мкг/мл, от приблизительно 5 нг/мл до приблизительно 50 мкг/мл, от приблизительно 5 нг/мл до приблизительно 40 мкг/мл, от приблизительно 10 нг/мл до приблизительно 35 мкг/мл, от приблизительно 10 нг/мл до приблизительно 25 мкг/мл, от приблизительно 10 нг/мл до приблизительно 10 мкг/мл, от приблизительно 25 нг/мл до приблизительно 10 мкг/мл, от приблизительно 50 нг/мл до приблизительно 10 мкг/мл, от приблизительно 50 нг/мл до приблизительно 5 мкг/мл, от приблизительно 100 нг/мл до приблизительно 5 мкг/мл, от приблизительно 200 нг/мл до приблизительно 5 мкг/мл, от приблизительно 250 нг/мл до приблизительно 5 мкг/мл, от приблизительно 500 нг/мл до приблизительно 5 мкг/мл, от приблизительно 1 мкг/мл до приблизительно 50 мкг/мл, от приблизительно 0,1 нг/мл до приблизительно 5 нг/мл, от приблизительно 1 нг/мл до приблизительно 10 нг/мл или от приблизительно 1 мкг/мл до приблизительно 10 мкг/мл. В определенных вариантах осуществления фармацевтические композиции должны обеспечивать дозировку от приблизительно 0,001 мг до приблизительно 2000 мг соединения на килограмм веса тела в день, от приблизительно 0,002 мг до приблизительно 1000 мг соединения на килограмм веса тела в день, от приблизительно 0,005 мг до приблизительно 500 мг соединения на килограмм веса тела в день, от приблизительно 0,005 мг до приблизительно 250 мг соединения на килограмм веса тела в день, от приблизительно 0,005 мг до приблизительно 200 мг соединения на килограмм веса тела в день, от приблизительно 0,005 мг до приблизительно 100 мг соединения на килограмм веса тела в день, от приблизительно 0,001 мг до приблизительно 0,005 мг соединения на килограмм веса тела в день, от приблизительно 0,01 мг до приблизительно 100 мг соединения на килограмм веса тела в день, от приблизительно 0,02 мг до приблизительно 100 мг соединения на килограмм веса тела в день, от приблизительно 0,05 мг до приблизительно 100 мг соединения на килограмм веса тела в день, от приблизительно 0,1 мг до приблизительно 100 мг соединения на килограмм веса тела в день, от приблизительно 0,5 мг до приблизительно 100 мг соединения на килограмм веса тела в день, от приблизительно 0,75 мг до приблизительно 100 мг соединения на килограмм веса тела в день, от приблизительно 1 мг до приблизительно 100 мг соединения на килограмм веса тела в день, от приблизительно 1 мг до приблизительно 10 мг соединения на килограмм веса тела в день, от приблизительно 0,001 мг до приблизительно 5 мг соединения на килограмм веса тела в день, от приблизительно 200 мг до приблизительно 2000 мг соединения на килограмм веса тела в день или от приблизительно 10 мг до приблизительно 100 мг соединения на килограмм веса тела в день. Фармацевтические единичные дозированные формы получают таким образом, чтобы они обеспечивали от приблизительно 1 мг до приблизительно 1000 мг, от приблизительно 1 мг до приблизительно 800 мг, от приблизительно 5 мг до приблизительно 800 мг, от приблизительно 1 мг до приблизительно 100 мг, приблизительно 1 мг до приблизительно 50 мг, от приблизительно 5 мг до приблизительно 100 мг, от приблизительно 10 мг до приблизительно 50 мг, от приблизительно 10 мг до приблизительно 100 мг, от приблизительно 25 мг до приблизительно 50 мг и от приблизительно 10 мг до приблизительно 500 мг основного активного ингредиента или комбинации основных ингредиентов на единичную дозированную форму.

Активный ингредиент можно вводить сразу или его можно разделить на несколько меньших доз, вводимых через определенные промежутки времени. Понятно, что точная дозировка и продолжительность лечения зависят от состояния, в отношении которого осуществляют лечение, и могут быть определены эмпирически с применением известных протоколов испытаний или путем экстраполяции данных испытаний in vivo или in vitro. Следует отметить, что концентрации и значения дозировки также могут варьировать в зависимости от тяжести состояния, которое необходимо облегчить. Дополнительно, следует понимать, что для любого отдельного субъекта конкретные режимы введения доз должны регулироваться с течением времени в соответствии с индивидуальными потребностями и профессиональным мнением лица, вводящего или контролирующего введение композиций, и что диапазоны концентраций, указанные в данном документе,

являются только примерными и не предназначены для ограничения объема или применения заявленных композиций.

Таким образом, эффективные концентрации или количества одного или более описанных в данном документе соединений или их фармацевтически приемлемых производных смешивают с подходящим фармацевтическим носителем или средойносителем для системного, местного или локального введения с образованием фармацевтических композиций. Соединения включают в количестве, эффективном для облегчения одного или более симптомов или для лечения описанного в данном документе состояния. Концентрация активного соединения в композиции зависит от скоростей всасывания, инактивации, выведения активного соединения, схемы введения доз, вводимого количества, отдельного состава, а также других факторов, известных специалистам в данной области техники.

Композиции предназначены для введения подходящим путем, в том числе перорально, парентерально, ректально, местно, локально и посредством назогастрального или орогастрального зонда. Для перорального введения можно использовать капсулы и таблетки. Композиции представлены в жидкой, полужидкой или твердой форме и составлены способом, подходящим для каждого пути введения. В одном варианте осуществления варианты введения включают парентеральный и пероральный варианты введения. В определенных вариантах осуществления предполагается пероральное введение. В других вариантах осуществления предполагается местное введение.

Ингибиторы каспаз ПО настоящему изобретению онжом применять комбинированной терапии для лечения бактериальных инфекций и поражений кожи, вирусных инфекций и для усиления регенерации и восстановления после повреждения кожи или кишечника. Используемый в данном документе термин «в комбинации» относится к применению более чем одного средства терапии (например, ингибитора каспазы и других средств (например, агониста TLR3)). Использование термина «в комбинации» не ограничивает порядок, в котором средства терапии (например, ингибитор каспазы и другие средства) вводят субъекту с нарушением. В определенных вариантах осуществления первое средство терапии (например, ингибитор каспазы) может быть введено субъекту с состоянием до (например, за 5 минут, 15 минут, 30 минут, 45 минут, 1 час, 2 часа, 4 часа, 6 часов, 12 часов, 24 часа, 48 часов, 72 часа, 96 часов, 1 неделю, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель, 6 недель, 8 недель или 12 недель до), одновременно или после (например, через 5 минут, 15 минут, 30 минут, 45 минут, 1 час, 2 часа, 4 часа, 6 часов, 12 часов, 24 часа, 48 часов, 72 часа, 96 часов, 1 неделю, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель, 6 недель, 8 недель или 12 недель после) введения другого средства терапии (например, другого ингибитора каспазы или другого средства).

В различных вариантах осуществления комбинации можно вводить с интервалом менее 5 минут, с интервалом менее 30 минут, с интервалом 1 час, с интервалом приблизительно 1 час, с интервалом от приблизительно 1 до приблизительно 2 часов, с интервалом от приблизительно 3 часов, с интервалом от

приблизительно 3 часов до приблизительно 4 часов, с интервалом от приблизительно 5 часов до приблизительно 5 часов, с интервалом от приблизительно 5 часов до приблизительно 6 часов, с интервалом от приблизительно 6 часов до приблизительно 7 часов, с интервалом от приблизительно 8 часов, с интервалом от приблизительно 9 часов, с интервалом от приблизительно 9 часов до приблизительно 10 часов до приблизительно 11 часов до приблизительно 11 часов, с интервалом от приблизительно 12 часов до приблизительно 12 часов, с интервалом от 18 часов до 24 часов, с интервалом от 24 часов до 36 часов, с интервалом от 36 часов до 48 часов, с интервалом от 48 часов до 52 часов, с интервалом от 52 часов до 60 часов, с интервалом от 60 часов до 72 часов, с интервалом от 72 часов до 84 часов, с интервалом от 84 часов до 96 часов до 72 часов, с интервалом от 72 часов до 84 часов, с интервалом от 84 часов до 96 часов или с интервалом от 96 часов до 120 часов. В определенных вариантах осуществления два или более средств терапии вводят в течение одного посещения пациента.

Используемый в данном документе термин «синергический» относится к комбинации ингибитора каспазы с другим ингибитором каспазы или другим средством, таким как агонист TLR3, что является более эффективным, чем аддитивные эффекты введения двух соединений в виде монотерапии. Синергический эффект комбинации средств терапии (например, ингибитора каспазы и другого средства, такого как агонист TLR3) делает возможным применение более низких доз одного или более средств терапии и/или менее частое введение средств терапии субъекту с нарушением. Возможность использовать более низкие дозировки средства терапии (например, ингибитора каспазы и другого средства) и/или вводить средства терапии менее часто обеспечивает снижение токсичности, ассоциированной с введением средства терапии субъекту, без снижения эффективности средства терапии в предупреждении или лечении нарушения. Кроме того, синергетический эффект может привести к повышению эффективности средств в предупреждении или лечении нарушения. Наконец, синергетический эффект комбинации средств терапии (например, ингибитора каспазы и другого средства) может обеспечить предотвращение или уменьшение неблагоприятных или нежелательных побочных эффектов, ассоциированных с применением любого средства терапии отдельно.

III. Ингибиторы каспаз в комбинации с агонистом(агонистами) DS-RNA TLR3

В определенных вариантах осуществления ингибиторы каспаз можно вводить в комбинации с агонистом(агонистами) toll-подобного рецептора 3 (TLR3 или Tlr3) двухнитевой рибонуклеиновой кислоты (DS-RNA) (DS-RNA TLR3). В отдельных вариантах осуществления комбинированную терапию можно применять для регенерации и восстановления после повреждения кожи или кишечника, рубцевания, ран или любого типа временного повреждения кожи или кишечника, а также для восстановления после серьезной операции на кишечнике, после операции на коже или в случае ожогов.

А. Определения

Термин «агонист TLR3» относится к аффинному средству (например, молекуле,

которая связывает целевую молекулу), способному активировать полипептид TLR3, вызывая полный или частичный ответ, опосредованный рецептором. Агонист TLR3 может индуцировать любую активность TLR3, например опосредованную TLR3 передачу сигнала, либо непосредственно, либо опосредованно. Агонист TLR3, используемый в данном документе, может необязательно связываться с полипептидом TLR3 и может взаимодействовать или не взаимодействовать непосредственно с полипептидом TLR3. TLR также может представлять собой малую Примеры Агонист молекулу. агонистов/энхансеров TLR3 включают без ограничения деквалиния дихлорид, ивермектин, энтандрофрагмин, GW9662, P1,P4-ди(аденозин-5')тетрафосфаттриаммоний и астаксантин.

Используемые в данном документе фразы «селективный агонист TLR3» и «агонист TLR3, который селективно индуцирует активность TLR3» относятся к композициям, которые индуцируют опосредованную TLR3 передачу сигналов в значительно большей степени, чем передачу сигналов одним или более другими рецепторами dsRNA. Если агонист TLR3 представляет собой композицию на основе dsRNA, «агонист TLR3, который избирательно индуцирует активность TLR3» относится к композициям, которые индуцируют опосредованную TLR3 передачу сигналов в значительно большей степени, чем передачу сигналов одним или более другими рецепторами dsRNA (например, TLR7, RIGI, MDA-5, PKR и/или другими рецепторами dsRNA). В одном варианте осуществления «значительно большая степень» применительно к взаимодействию между агонистом TLR3 и рецептором относится к агонистам, которые характеризуются значительно более высоким терапевтическим индексом (т. е. соотношением эффективности и токсичности) в отношении лечения целевого болезненного статуса или состояния, чем в случае активации путей, опосредованных другими рецепторами. Токсичность терапевтических соединений часто возникает из-за наличия неселективного взаимодействия терапевтического соединения с другими рецепторами. Таким образом, настоящее изобретение обеспечивает средства для снижения частоты побочных реакций, обычно ассоциированных с терапией посредством dsRNA. Предпочтительно композиция, которая индуцирует опосредованную TLR3 передачу сигнала в значительно большей степени, чем передачу сигнала другим(другими) рецептором(рецепторами), будет характеризоваться ЕС50 для индукции чем ЕС50 передачи сигнала TLR3, которая меньше, для передачи другим(другими) рецептором(рецепторами).

«Поли(I)», «поли(C)», «поли(A)», «поли(U)» означают полиинозиновую кислоту, полицитидиловую кислоту, полиадениловую кислоту и полиуридиловую кислоту соответственно, каждая из которых необязательно замещена другими мономерами.

«Поли(AU)», используемый взаимозаменяемо с «pApU», «поли(A:U)», поли(A):поли(U), означает по меньшей мере частично двухнитевую молекулу, состоящую из полиадениловой кислоты(кислот) и полиуридиловой кислоты(кислот), каждая из которых необязательно замещена другими мономерами при условии сохранения биологической функции (например, иммуномодулирующей активности, агонизма или

связывания TLR3).

«Гомополимер» представляет собой полимер, состоящий по сути только из одного мономера; например, гомополимер поли(А) представляет собой по сути все мономеры А (аденозин). Гомополимер может представлять собой один более длинный полимер или может состоять из множества более коротких полимеров, соединенных (например, с помощью линкера) с образованием более длинного полимера и т. д.

«Сополимер» представляет собой полимер, состоящий из двух или более мономеров; например, сополимер поли(A) содержит мономеры A (аденозин) и один или более мономеров, отличных от аденозина.

Термин «поли(AxU)» означает сополимер адениловой кислоты и уридиловой кислоты, где замена одной уридиловой кислотой происходит приблизительно на каждые х адениловых кислот соответственно. Например, «поли C12U» представляет собой сополимер цитидиловой и уридиловой кислот, где замена одной уридиловой кислотой происходит приблизительно на каждые 12 цитидиловых кислот соответственно.

«dsRNA» и «двухнитевая РНК» относятся к комплексам полирибонуклеотидов, которые являются по меньшей мере частично двухнитевыми. dsRNA не обязательно должна быть двухнитевой ни по всей длине молекулы, ни по длине одного или более нуклеиновой кислоты, образующих однонитевых полимеров dsRNA. настоящему изобретению «dsRNA» означает двухнитевую РНК и представляет собой РНК с двумя частично или полностью комплементарными нитями. Размер нитей может варьировать от 6 нуклеотидов до 10000, предпочтительно от 10 до 8000, в частности от 200 до 5000, от 200 до 2000 или от 200 до 1000 нуклеотидов. В определенных вариантах осуществления dsRNA представляет собой полиинозин-полицитидиловую кислоту (поли(1:C)), синтетический аналог dsRNA. Поли(1:C) состоит из нити поли(1), отжигающейся с нитью поли(C). dsRNA может представлять собой полную или частичную (прерванную) пару РНК, гибридизированных вместе. Она может быть молекул РНК полиинозиновой получена, например, путем смешивания полицитидиловой кислот. Она также может быть получена путем смешивания определенных полностью или частично спаренных негомополимерных нитей РНК. Чтобы молекулы dsRNA считались подходящими для получения композиции по настоящему изобретению, отсутствуют какие-либо конкретные требования к последовательности рибонуклеотидов.

Термин «пара оснований» (сокращенно «п. о.»), часто используемый для обозначения молекулярного размера нуклеиновой кислоты, используется для обозначения молекулярного размера по количеству оснований в нуклеиновой кислоте (т. е. 10 п. о. означает двухнитевой полимер, имеющий десять оснований) в каждой комплементарной нити.

Термин «биологический образец», используемый в данном документе, включает без ограничения биологическую жидкость (например, сыворотку крови, лимфу, кровь), образец клеток или образец ткани (например, костный мозг).

Термины "полипептид", "пептид" и "белок" используются в данном документе взаимозаменяемо и относятся к полимеру из аминокислотных остатков. Термины применимы к полимерам из аминокислот, в которых один или более аминокислотных остатков представляют собой искусственный химический миметик соответствующей встречающейся в природе аминокислоты, а также к полимерам из встречающихся в природе аминокислот и полимеру из не встречающихся в природе аминокислот.

Термин «рекомбинантный» при использовании в отношении, например, клетки или нуклеиновой кислоты, белка или вектора означает, что клетка, нуклеиновая кислота, белок или вектор были модифицированы путем введения гетерологичной нуклеиновой кислоты или белка или изменения нативной нуклеиновой кислоты или белка, или что клетка получена из модифицированной таким образом клетки. Так, например, рекомбинантные клетки экспрессируют гены, которые не встречаются в нативной (нерекомбинантной) форме клетки или экспрессируют нативные гены, экспрессия которых иным образом отклоняется от нормы, является недостаточной или отсутствует вообще.

Термин «подходящий для человека» в отношении средства или композиции относится к любому средству или композиции, которые можно безопасно применять в отношении человека, например, для терапевтических способов, описанных в данном документе. Например, подходящие для человека средства не вызывают таких эффектов, как тяжелая индукция цитокинов на уровне, исключающем их применение у людей, или не содержат веществ (например, эндотоксинов) на уровнях, несовместимых с применением у людей, в отдельном контексте (например, вариант введения), в котором используется средство.

«Выделенный» или «очищенный» препарат (например, препарат dsRNA) по сути является свободным от материала или других загрязняющих соединений из источника, из которого получен препарат (например, dsRNA), или по сути является свободным от химических предшественников или других химических веществ при химическом синтезе. «По сути свободный» означает, что препарат dsRNA является по меньшей мере на 50% чистым (вес/вес). В предпочтительном варианте осуществления препарат dsRNA содержит менее приблизительно 20%, 10%, 5% и более предпочтительно 2% (по сухому свободных рибонуклеотидных белков весу) мономеров, или химических предшественников и/или других химических веществ, эндотоксинов и/или свободной ssRNA (в случае препарата dsRNA), например, в результате производства. Они также упоминаются в данном документе как «загрязняющие вещества». Примеры загрязняющих веществ, которые могут присутствовать в препарате dsRNA, представленном в данном документе, включают без ограничения кальций, натрий, рибонуклеотидные мономеры, свободную dsRNA (в случае препарата dsRNA), эндотоксин, фермент полинуклеотидфосфорилазу (или другой фермент, характеризующийся аналогичной субстратной специфичностью), метанол, этанол, хлорид, сульфат, дерматансульфат и хондроитинсульфат. Чистоту и однородность в типичном случае определяют с помощью методик аналитической химии, таких как электрофорез в полиакриламидном геле или

высокоэффективная жидкостная хроматография.

Термин «кателицидины» относится к катионным пептидам, характеризующимся противомикробной активностью широкого спектра действия. Zanetti, M. et al. J. Biol. Chem. 268, 522 (1993). Эти пептиды принадлежат к семейству противомикробных пептидов, которые являются частью важного механизма врожденного иммунитета хозяина. Lehrer, R. and T. Ganz. Curr. Opin. Immunol. 11, 23 (1999). У человека кателицидины и дефенсины экспрессируются в иммунных клетках и на поверхности эпителия. См., Chromek, M. et al. Nature Medicine 12, 636 (2006); Zanetti, M. J. Leukoc. Biol. 75, 39 (2004); и Ganz, T. Nat. Rev. Immunol. 3, 710 (2003). hCAP18, человеческий катионный противомикробный белок с молекулярной массой 18 кД, является единственным геном кателицидина, найденным у людей. Lehrer, R. and T. Ganz. Curr. Opin. Immunol. 11, 23 (1999). N-конец этого белка состоит из кателиноподобного участка (аналогичного таковому у других представителей семейства кателицидинов), а С-конец получил название LL-37. См. Sorensen, OE. et al. Blood 97, 3951 (2001); и Zanetti, M. et al. FEBS Lett. 374, 1 (1995). Амфипатический альфа-спиральный пептид LL-37 играет важную роль в первой линии защиты при локализованном инфекционном процессе и системной инвазии патогенов в местах воспаления и ран. Цитотоксичный как для бактериальных, так и для нормальных эукариотических клеток, LL-37 в значительной степени устойчив к протеолитическому разрушению в растворе. См., Neville, F. et al. Biophys. J. 90, 1275 (2006); и Oren, Z., et al. Biochem. J. 341, 501(1999).

Примеры кателицидинов включают LL-37/hCAP18 (LL-37) у человека (Curr Drug Targets Inflamm Allergy. 2003 September; 2(3):224-31; Eur J. Biochem. 1996 Jun. 1; 238(2):325-32; Paulsen F et al., J. Pathol. 2002 November; 198(3):369-77). LL-37 представляет собой пептид из 37 аминокислотных остатков, соответствующий координатам аминокислотных остатков 134-170 его предшественника hCAP18/белка, представляющего собой противомикробный пептид кателицидин человека (GenBank: номер доступа NP004336; версия NP004336.2 GI:39753970; REFSEQ: номер доступа NM004345.3). LL-37 содержит аминокислотную последовательность LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRN LVPRTES (SEQ ID NO:1). Tepmuh LL-37 также включает последовательности, характеризующиеся по меньшей мере 90% идентичностью с SEQ ID NO:1. В частности, этот термин включает последовательности, имеющие одну или более консервативных аминокислотных замен в SEQ ID NO:1. Кателицидины, в том числе LL-37, можно использовать в способах и композициях, описанных в данном документе, отдельно или в комбинации с dsRNA или другими агонистами TLR3 для усиления de novo образования и/или регенерации волосяных фолликулов.

В. Агонист(агонисты) TLR3, представляющие собой DS-RNA

Двухнитевая (ds) РНК (рибонуклеиновая кислота) химически в большой степени аналогична ДНК (дезоксирибонуклеиновая кислота). Она также представляет собой длинную молекулу, содержащую нуклеотиды, соединенные между собой 3'-5'-

фосфодиэфирными связями. Два отличия в ее химических группах отличают dsRNA от ДНК. Первое представляет собой незначительную модификацию сахарного компонента. Сахаром в ДНК является дезоксирибоза, тогда как РНК содержит рибозу, которая идентична дезоксирибозе, за исключением наличия дополнительной гидроксильной группы. Второе отличие состоит в том, что РНК не содержит тимина, а вместо него содержит близкородственный пиримидин - урацил. DsRNA образуется в результате гибридизации двух комплементарных полирибонуклеотидов, образующих двойную спираль, аналогичную ДНК. Две нити двойной спирали удерживаются вместе парами оснований, связанными водородными связями.

TLR3 представляет собой рецептор для использования в форме иммунитета, называемой «врожденным иммунитетом», который распознает двухнитевые РНК с минимальным размером по меньшей мере 50 пар оснований. Наличие у TLR3 требований к размеру dsRNA или его способность различать dsRNA обеспечивает предупреждение ответов на немикробные источники dsRNA, микро (mi) РНК или транспортную (t) РНК. TLR3 существует в виде мономера в форме подковы с N-концевым лиганд-связывающим внецитоплазматическим доменом (ЕСО), трансмембранным доменом (ТМО) и С-(CSD). концевым цитоплазматическим сигнальным доменом Рентгеновские кристаллографические исследования предоставили структурные данные для комплекса TLR-3 с лигандом, который состоит из гомодимера TLR3, образующего комплекс с dsRNA, состоящей по меньшей мере из приблизительно 50 последовательных пар оснований. Считается, что образование комплекса передает конформационное изменение в CSD через соединитель TMD, что делает возможной цитоплазматическую передачу сигнала. При размере свыше 50 пар оснований аффинность связывания является функцией размера с прогрессивным увеличением аффинности связывания с увеличением длины линейной неразветвленной dsRNA. Минимальный размер dsRNA составляет приблизительно 40 нуклеотидов.

Двухнитевая рибонуклеиновая кислота (dsRNA) может представлять собой гибридизованные нити поли(рибоинозиновой кислоты) поли(рибоцитидиловой кислоты) (т. е. поли(ІС)) или поли(рибоадениловой кислоты) и поли(рибоурациловой кислоты) (т. е. поли(AU)). В случае наличия ошибочно спаренных оснований dsRNA может иметь общую формулу $rI_n \cdot r(C_{4-29}U)_n$, которая предпочтительно представляет собой $rI_n \cdot r(C_{12}U)_n$, в которой r означает рибонуклеотиды. Предпочтительно, чтобы п было целым числом от приблизительно 40 до приблизительно 40000. Например, нить поли(рибоинозиновой кислоты) может быть частично гибридизована с нитью поли(рибоцитозиновой₄₋₂₉урациловой кислоты). Другие dsRNA с ошибочно спаренными основаниями, которые можно применять, основаны на сополинуклеотидах, таких как поли(C_mU) и поли(C_mG), в которых m представляет собой целое число от приблизительно 4 до приблизительно 29, или аналоги комплекса поли(рибоинозиновой кислоты) и поли(рибоцитидиловой кислоты), образованные путем модификации $rI_{n} \cdot rC_{n}$ для включения неспаренных оснований (урацила или гуанина) в полирибоцитидилатную (rC_m) нить. Альтернативно, dsRNA с ошибочно спаренными основаниями может быть получена из dsRNA r(I)r(C) путем модификации рибозильного остова поли(рибоинозиновой кислоты) (rI_n) , например, путем включения 2'-О-метилрибозильных остатков. Из таких аналогов dsRNA с ошибочно спаренными основаниями rI_n rC_n предпочтительными являются аналоги общей формулы rI_n $r(C_{11-14}U)_n$ или rI_n $r(C_{29},G)_n$ (см. патенты США №№ 4024222 и 4130641; которые включены посредством ссылки). Описанные в данном документе dsRNA как правило являются подходящими для применения в соответствии с настоящим изобретением. См. также патент США № 5258369.

Можно получать комплекс dsRNA со стабилизирующим PHK полимером, таким как полилизин, полилизин плюс карбоксиметилцеллюлоза, полиаргинин, полиаргинин плюс карбоксиметилцеллюлоза или любая их комбинация. Другие примеры dsRNA с ошибочно спаренными основаниями для применения в настоящем изобретении включают без ограничения $r(I) \cdot r(C_4,U); r(I) \cdot r(C_7,U); r(I) \cdot r(C_{13},U); r(I) \cdot r(C_{22},U); r(I) \cdot r(C_{20},G)$ и $r(I) \cdot r(C_{29},G)$. dsRNA с ошибочно спаренными основаниями также могут быть модифицированы на концах молекулы для добавления шарнира(шарниров) с целью предупреждения проскальзывания пар оснований, с обеспечением таким образом определенной биологической активности в определенных растворителях или водных средах, которые существуют в биологических жидкостях человека.

Поли-ICLC (взаимозаменяемо известный как Hiltonol® или поли-IC:LC, среди прочего) представляет собой высокомолекулярное производное поли-ІС, стабилизированное поли-L-лизином и карбоксиметилцеллюлозой (СМС), которые были добавлены для улучшения фармакокинетических свойств поли-ІС. Таким образом, поли-ICLC имеет формулу In.Cn-поли-1-лизин-5-карбоксиметилцеллюлоза. См. патент США № 4349538. Карбоксиметилцеллюлоза представляет собой отрицательно заряженный (при нейтральном pH) гидрофильный материал, используемый для поддержания растворимости комплекса. Поли(ICLC) более устойчив к нуклеазам, чем поли-IC, при этом комплекс поли-ICLC размером 27000 кДа или больше проявляет особую устойчивость к нуклеазам.

В конкретных вариантах осуществления агонист TLR3, представляющий собой dsRNA, представляет собой Ampligen®. Ampligen® представляет собой особую dsRNA, обозначаемую как поли(I): поли($C_{12}U$), где один из двух полирибонуклеотидов представляет собой полирибоинозиновую кислоту, а другой представляет собой уридиловую кислоту. полирибоцитидиловую₁₂, Таким образом, пиримидиновые структурные блоки Ampligen® присутствуют в соотношении 12 остатков цитозина на каждый остаток урацила, тогда как комплементарная пуриновая нить содержит 13 остатков инозина. В двухнитевой спиральной структуре Ampligen® водород пиримидина, цитозина, образует связь с пурином, инозином, в то время как пиримидин, урацил, не образует никаких водородных связей. Следовательно, «ошибочное спаривание оснований» возникает один раз на каждые 12 пар оснований (п. о.), образованных между остатками инозина и цитозина. В отличие от Ampligen®, поли(I): поли(C) содержит только комплементарные пары оснований инозин: (I): поли(I): поли(I):

Другие агонисты TLR3, которые можно применять в вариантах осуществления по настоящему изобретению, включают поли-ICR (поли(IC) (полирибоинозиновая-полицитидиловая кислота) -полиаргинин (Nventa Biopharmaceuticals Corporation); высокомолекулярные синтетические соединения dsRNA IPH31XX, например IPH3102, которые у людей специфичны в отношении TLR3 (Innate Pharma S.A; Schering-Plough Corporation); Oragen™, например Oragen™ 0004, Oragen™ 0033 и Oragen™ 0044 (Temple University); и NS9, комплекс полиинозин-полицитидиловой кислоты (Nippon Shinyaku Co., Ltd). Соединения Огаgen™ представляют собой синтетические аналоги встречающихся в природе аналогов 2',5'-олигоаденилатов, где аналоги обычно конъюгированы с молекулойносителем для усиления поглощения клетками (см. патент США № 6362171).

В публикации согласно РСТ № WO 2009/130616 (Innate Pharma) описаны высокомолекулярные молекулы поли(AU) dsRNA, которые являются агонистами TLR3. В публикациях согласно РСТ №№ WO 2006/054177, WO 2006/054129, WO 2009/130301 и WO 2009/136282 (Institut Gustave Roussy) описано применение агонистов TLR3, представляющих собой dsRNA, для лечения рака.

Дополнительные варианты осуществления также раскрыты в WO 2007/089151, где описывается статмин и подобные ему соединения, которые являются агонистами TLR3. В конкретном варианте осуществления агонист на основе нуклеиновой кислоты объединен с одним из таких статминовых или статминоподобных агонистов.

В другом варианте осуществления агонистом TLR4, представляющим собой dsRNA, является «прочная dsRNA». «Прочная dsRNA» представляет собой новую форму dsRNA с уникальным составом и физическими характеристиками. В отличие от ранее известного противовирусного препарата Ampligen® (поли(I): поли($C_{12}U$)), новая и улучшенная форма прочной dsRNA (например, поли(I): поли($C_{30-35}U$) (предпочтительно, поли(I): поли ($C_{30}U$)), где поли(C_{30} - $_{35}U$) указывает соотношение, т. е. что на каждый U приходится 30-35 С), имеет повышенную прочность, характеризующуюся повышенной устойчивостью к термической денатурации и расщеплению рибонуклеазами. Такая улучшенная форма dsRNA также имеет пониженную склонность к образованию разветвленных молекул dsRNA, что приводит к повышенной биологической активности ввиду повышенной способности связываться с рецептором TLR3. Минимальная длина прочной dsRNA (называемая мономерной единицей) составляет приблизительно 50 пар оснований, требующих от 4 до 5 (например, 4,7) спиральных витков (10,7 пар оснований требуется для каждого полного оборота спирали) в ее структуре dsRNA и представляет собой наименьшую или мономерную единицу поли(I): поли($C_{30}U$), примерно от 24000 до 30000 дальтон (дальтон представляет собой единицу веса, равную весу одного атома водорода). Максимальная длина прочной dsRNA составляет приблизительно 500 пар оснований, состоящих из приблизительно 10 мономерных единиц, требующих приблизительно 50 (например, 46,7) спиральных витков и имеющих молекулярную массу около 300000 дальтон (например, приблизительно 225000 дальтон). *См.* публикацию заявки на патент США № 20120009206.

С. Составы и фармацевтические композиции, содержащие агонист TLR

В предпочтительном варианте осуществления композиции, содержащие агонист TLR3, вводят местно. Активный ингредиент, т. е. агонист TLR3, предпочтительно представлять в виде фармацевтического состава. Примеры композиций подробно описаны в следующих далее примерах. Активный ингредиент, при местном введении, может составлять от 0,001% до приблизительно 20% вес/вес по весу состава в конечном продукте, хотя он может составлять до 30% вес/вес, от приблизительно 1% до приблизительно 20% вес/вес состава. Составы для местного применения по настоящему изобретению содержат активный ингредиент вместе с одним или более приемлемыми для носителями И необязательно любым другим терапевтическим ингредиентом(ингредиентами). Носители должны быть «приемлемыми» в том смысле, что они совместимы с другими ингредиентами состава и не вредны для его реципиента.

Композицию на основе агониста TLR3 по настоящему изобретению можно вводить пациенту либо отдельно, либо в составе фармацевтических композиций, где ее смешивают подходящими носителями или вспомогательным(вспомогательными) веществом(веществами). При лечении пациента, у которого проявляется представляющее интерес нарушение, вводят терапевтически эффективное количество представленного средства или средств. Терапевтически эффективная доза относится к такому количеству соединения, которое приводит К облегчению симптомов или увеличению продолжительности жизни пациента.

Фармацевтические композиции, подходящие для применения в настоящем изобретении, включают композиции, в которых активные ингредиенты содержатся в количестве, эффективном для достижения намеченной цели. Определение эффективных количеств находится в пределах компетенции специалистов в данной области техники, особенно в свете подробного раскрытия, представленного в данном документе. В дополнение к активным ингредиентам такие фармацевтические композиции могут содержать подходящие фармацевтически приемлемые носители, включающие вспомогательные вещества и дополнительные средства, которые облегчают переработку активных соединений в препараты, которые можно применять в фармацевтике. Препараты, составленные для перорального введения, могут быть представлены в форме таблеток, капсул или растворов. Фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут быть изготовлены известным способом, например с помощью растворения, гранулирования, эмульгирования, процессов смешивания, инкапсулирования, улавливания или лиофилизации.

Композиции, описанные выше, можно вводить субъекту в любом подходящем составе. В дополнение к лечению с помощью составов на основе агониста TLR3 для местного применения, в других аспектах настоящего изобретения агонист TLR3 может доставляться другими способами. Например, агонист TLR3 можно составить для

парентеральной доставки, например, для подкожной, внутривенной или внутримышечной инъекции. Могут использоваться другие способы доставки, например липосомальная доставка или диффузия из устройства, пропитанного композицией. Композиции можно вводить в виде одного болюса, нескольких инъекций или путем непрерывной инфузии (например, внутривенно или путем перитонеального диализа). Для парентерального введения композиции предпочтительно составляют в стерильной апирогенной форме.

Составы, подходящие для местного введения, включают жидкие или полужидкие препараты, подходящие для проникновения через кожу в место, где требуется лечение, такие как жидкие мази, лосьоны, кремы, мази или пасты. Лосьоны по настоящему изобретению включают таковые, подходящие для применения в отношении кожи. Лосьоны или жидкие мази для применения в отношении кожи могут также включать средство для ускорения высыхания и охлаждения кожи, такое как спирт или ацетон, и/или увлажняющее средство, такое как глицерин, или масло, такое как касторовое масло или арахисовое масло.

Кремы, мази или пасты по настоящему изобретению представляют собой полутвердые составы на основе активного ингредиента для наружного применения. Они могут быть получены путем смешивания активного ингредиента в тонкоизмельченной или порошкообразной форме, отдельно или в виде раствора или суспензии в воде или отличной от воды жидкости с помощью подходящего оборудования, с жирной или нежирной основой. Основа может содержать углеводороды, такие как твердый, мягкий или жидкий парафин, глицерин, пчелиный воск, металлсодержащее мыло; слизь; масло природного происхождения, такое как миндальное, кукурузное, арахисовое, касторовое или оливковое масло; шерстяной жир или его производные, или жирную кислоту, такую как стеариновая или олеиновая кислота, вместе со спиртом, таким как пропиленгликоль, или варианты макрогола. Состав может содержать любое подходящее поверхностноактивное средство, такое как анионогенное, катионогенное или неионогенное поверхностно-активное средство, такое как сложные эфиры сорбитана или их полиоксиэтиленовые производные. Также могут содержаться суспендирующие средства, такие как натуральные камеди, производные целлюлозы или неорганические материалы, такие как двуокись кремния, и другие ингредиенты, такие как ланолин.

Фармацевтические составы для парентерального введения включают водные растворы активных соединений в водорастворимой форме. Кроме того, суспензии активных соединений можно получать в виде подходящих масляных суспензий для инъекций. Подходящие липофильные растворители или среды-носители включают жирные масла, такие как кунжутное масло, или синтетические сложные эфиры жирных кислот, такие как этилолеат или триглицериды, или липосомы. Водные суспензии для инъекций могут содержать вещества, повышающие вязкость суспензии, такие как карбоксиметилцеллюлоза натрия, сорбит или декстран. Необязательно суспензия может также содержать подходящие стабилизаторы или средства, повышающие растворимость соединений, что обеспечивает возможность получения высококонцентрированных

растворов.

Фармацевтические препараты для перорального применения можно получать путем объединения активных соединений с твердым вспомогательным веществом, необязательного измельчения полученной смеси и обработки смеси гранул после добавления при необходимости подходящих дополнительных средств с получением сердцевин таблеток или драже. Подходящими вспомогательными веществами являются, в частности, наполнители, такие как сахара, в том числе лактоза, сахароза, маннит или сорбит; препараты целлюлозы, такие как, например, кукурузный крахмал, пшеничный крахмал, рисовый крахмал, картофельный крахмал, желатин, трагакантовая камедь, метилцеллюлоза, гидроксипропилметилцеллюлоза, натрийкарбоксиметилцеллюлоза и/или поливинилпирролидон (PVP). При необходимости могут быть добавлены разрыхлители, такие как сшитый поливинилпирролидон, агар или альгиновая кислота или ее соль, такая как альгинат натрия.

В случае предпочтительных сред-носителей для местной доставки остающийся компонент композиции может представлять собой воду, которая обязательно является очищенной, например деионизированную воду. Такие композиции для доставки на основе сред-носителей могут содержать воду в диапазоне от более чем приблизительно 50 до приблизительно 95 процентов в пересчете на общий вес композиции. Конкретное количество присутствующей воды не является критическим, однако его можно регулировать для получения необходимой вязкости (как правило, от приблизительно 50 сП до приблизительно 10000 сП) и/или концентрации других компонентов.

Для облегчения доставки агониста TLR3 также можно применять другие известные усилители чрескожного проникновения. Иллюстративными являются сульфоксиды, такие как диметилсульфоксид (DMSO) и т. п.; циклические амиды, такие как додецилазациклогептан-2-он (AzoneTM, зарегистрированная торговая марка Nelson Research, Inc.) и т. п.; амиды, такие как N, N-диметилацетамид (DMA), N, Nдиэтилтолуамид, N, N-диметилформамид, N, N-диметилоктамид, N, N-диметилдекамид и т. п.; производные пирролидона, такие как N-метил-2-пирролидон, 2-пирролидон, 2пирролидон-5-карбоновая кислота, N-(2-гидроксиэтил)-2-пирролидон или их эфиры жирных кислот, 1-лаурил-4-метоксикарбонил-2-пирролидон, N-таллоуалкилпирролидоны и т. п.; полиолы, такие как пропиленгликоль, этиленгликоль, полиэтиленгликоль, дипропиленгликоль, глицерин, гексантриол и т. п.; линейные и разветвленные жирные кислоты, такие как олеиновая, линолевая, лауриновая, валериановая, гептановая, изовалериановая, неопентановая, капроновая, миристиновая, триметилгексановая, изостеариновая и т. п.; спирты, такие как этанол, пропанол, бутанол, октанол, олеил, стеарил, линолеил и т. п.; анионные поверхностно-активные вещества, такие как лаурат натрия, лаурилсульфат натрия и т. п.; катионные поверхностно-активные вещества, такие бензалкония, хлорид додецилтриметиламмония, как хлорид цетилтриметиламмония и т. п.; неионогенные поверхностно-активные вещества, такие как пропоксилированные полиоксиэтиленовые эфиры, такие как полоксамер 231, полоксамер

182, полоксамер 184 и т. п., этоксилированные жирные кислоты, например Tween 20, Мугј 45 и т. п., производные сорбитана, например, Tween 40, Tween 60, Tween 80, Span 60 и т. п., этоксилированные спирты, например полиоксиэтилен (4) лауриловый эфир (Brij 30), полиоксиэтилен (2) олеиловый эфир (Brij 93) и т. п., лецитин и лецитин производные и т. п.; терпены, такие как D-лимонен, α-пинен, β-карен, α-терпинеол, карвол, карвон, ментон, оксид лимонена, оксид α-пинена, эвкалиптовое масло и т. п. В качестве усилителей чрескожного проникновения подходящими также являются органические кислоты и сложные эфиры, такие как салициловая кислота, метилсалицилат, лимонная кислота, янтарная кислота и т. п.

Специалисту в данной области техники будет понятно, что подходящий или соответствующий состав может быть выбран, адаптирован или разработан исходя из конкретного применения. Дозировки для раскрытых в данном документе композиций могут быть представлены в виде единичных дозированных форм. Термин «единичная дозированная форма», используемый в данном документе, относится к физически дискретным единицам, подходящим в качестве единичных доз для субъектов, представляющих собой животное (например, человека), при этом каждая единица содержит заданное количество средства, раскрытого в данном документе, отдельно или в комбинации с другими терапевтическими средствами, количество которых рассчитано таким образом, чтобы оно было достаточным для получения необходимого эффекта, в сочетании с фармацевтически приемлемым разбавителем, носителем или средойносителем. Действительно, специалист в данной области техники может легко определить соответствующую дозу, схему и способ введения для точного состава применяемой композиции, чтобы достичь необходимого эффективного количества или эффективной концентрации средства у отдельного пациента.

Доза раскрытой в данном документе композиции, вводимая животному, в частности человеку, в контексте раскрытого в данном документе объекта изобретения, должна быть достаточной для того, чтобы вызвать по меньшей мере поддающуюся обнаружению степень терапевтического ответа у индивидуума (например, стимулировать de novo образование волосяных фолликулов) в разумные сроки. Доза, используемая для достижения необходимого эффекта, будет определяться множеством факторов, в том числе активностью отдельного вводимого средства (например, агониста TLR3), фармакодинамикой, ассоциированной с применением средства у хозяина, тяжестью у субъекта, состояния другими лекарствами, вводимыми субъекту, степенью восприимчивости индивидуума, возрастом, полом И весом индивидуума, идиосинкразическими ответами индивидуума и т. п. Размер дозы также будет определяться наличием любых неблагоприятных побочных эффектов, которые могут сопровождать отдельное используемое средство или композицию на его основе. Как правило, желательно, если это возможно, свести к минимуму неблагоприятные побочные эффекты. Доза биологически активного материала будет варьировать; подходящие количества для каждого отдельного средства будут очевидны специалисту в данной области техники.

Соответственно, в определенных вариантах осуществления композиции можно вводить/применять в дозе приблизительно 1-100 мкг/см 2 , в том числе 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100 мкг/см 2 площади за одно применение.

более конкретном варианте осуществления композиции В в диапазоне приблизительно 1-20 мкг/см² площади за одно вводить/применять применение, в том числе без ограничения 1-19, 1-18, 1-17, 1-16, 1-15, 1-14, 1-13, 1-12, 1-11, 1-10, 1-9, 1-8, 1-7, 1-6, 1-5, 1-4, 1-3, 1-2, 2-20, 2-19, 2-18, 2-17, 2-16, 2-15, 2-14, 2-13, 2-12, 2-11, 2-10, 2-9, 2-8, 2-7, 2-6, 2-5, 2-4, 2-3, 3-20, 3-19, 3-18, 3-17, 3-16, 3-15, 3-14, 3-13, 3-12, 3-11, 3-10, 3-9, 3-8, 3-7, 3-6, 3-5, 3-4, 4-20, 4-19, 4-18, 4-17, 4-16, 4-15, 4-14, 4-13, 4-12, 4-11, 4-10, 4-9, 4-8, 4-7, 4-6, 4-5, 5-20, 5-19, 5-18, 5-17, 5-16, 5-15, 5-14, 5-13, 5-12, 5-11, 5-10, 5-9, 5-8, 5-7, 5-6, 6-20 6-19, 6-18, 6-17, 6-16, 6-15, 6-14, 6-13, 6-12, 6-11, 6-10, 6-9, 6-8, 6-7, 7-20, 7-19, 7-18, 7-17, 7-16, 7-15, 7-14, 7-13, 7-12, 7-11, 7-10, 7-9, 7-8, 8-20, 8-19, 8-18, 8-17, 8-16, 8-15, 8-14, 8-13, 8-12, 8-11, 8-10, 8-9, 9-20, 9-19, 9-18, 9-17, 9-16, 9-15, 9-14, 9-13, 9-12, 9-11, 9-10, 10-20, 10-19, 10-18, 10-17, 10-16, 10-15, 10-14, 10-13, 10-12, 10-11, 11-20, 11-19, 11-18, 11-17, 11-16, 11-15, 11-14, 11-13, 11-12, 12-20, 12-19, 12-18, 12-17, 12-16, 12-15, 12-14, 12-13, 13-20, 13-19, 13-18, 13-17, 13-16, 13-15, 13-14, 14-20, 14-19, 14-18, 14-17, 14-16, 14-15, 15-20, 15-19, 15-18, 15-17, 15-16, 16-20, 16-19, 16-18, 16-17, 17-20, 17-19, 17-18, 18-20, 18-19 и 19-20 мкг/см² площади на одно применение.

Фармацевтические композиции можно вводить на ежедневной основе. В одном варианте осуществления композиции вводят один раз в день в течение 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 или больше дней, в том числе 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52 недель или больше, в том числе 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 месяцев.

Композиции можно вводить один раз в несколько дней, в том числе один раз в 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30 дней. Композиции можно вводить один раз в неделю в течение 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52 или больше недель. Альтернативно композиции можно вводить один раз в несколько недель в течение 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52 или больше недель.

В других вариантах осуществления композиции можно вводить несколько раз в месяц, в том числе 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 или 31 раз в месяц.

В отдельных вариантах осуществления доза композиции, описанной в данном

документе, предусматривает диапазон приблизительно 2-10 мкг/см² площади за одно применение в течение 1-10 применений, разделенных интервалом в один месяц. В других вариантах осуществления дозировка составляет приблизительно 2-10 мкг/см² площади за одно применение, при этом 1-3 применения разделены интервалом в один месяц.

IV. Ингибитор каспазы для лечения бактериальной инфекции и поражений кожи

В настоящем изобретении в качестве альтернативы антибиотикам представлены ингибиторы каспазы, обеспечивающие вовлечение иммунного ответа хозяина для содействия клиренсу бактериальных инфекций. В США в год происходит 11 миллионов амбулаторных/ЕR посещений и 500000 госпитализаций. Кроме того, только в США от инвазивных инфекций, устойчивых к антибиотикам, страдают 2 миллиона человек, при этом количество смертей составляет 23000 в год. Применение ингибиторов каспазы в настоящем изобретении является революционным, поскольку они могут обеспечивать борьбу с бактериальной инфекцией в качестве альтернативы антибиотикотерапии или применяться в сочетании с ней. Это позволит улучшить результаты лечения пациентов и предупредить распространение устойчивости к антибиотикам. Как описано в примере 2 и на фигурах, ингибитор каспазы применяли для уменьшения бактериальной нагрузки и размеров поражения кожи при инфекции кожи, обусловленной Staphylococcus aureus, инфекции кожи, обусловленной Pseudomonas aeruginosa.

Примеры бактерий включают без ограничения стафилококки (например, Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis или Staphylococcus saprophyticus), Streptococcus pyogenes, Streptococcus pneumoniae или стрептококки (например, Streptococcus agalactiae), энтерококки (например, Enterococcus faecalis или Enterococcus faecium), виды коринебактерий (например, Corynebacterium diptheriae), бациллы (например, Bacillus anthracis), листерии (например, Listeria monocytogenes), виды рода Clostridium (например, Clostridium perfringens, Clostridium tetanus, Clostridium botulinum, Clostridium difficile), виды рода Neisseria (например, Neisseria meningitidis или Neisseria gonorrhoeae), E. coli, виды рода Shigella, виды рода Salmonella, виды рода Yersinia (например, Yersinia pestis, Yersinia pseudotuberculosis или Yersinia enterocolitica), Vibrio cholerae, виды рода Campylobacter (например, Campylobacter jejuni или Campylobacter fetus), Helicobacter pylori, псевдомонады (например, Pseudomonas aeruginosa или Pseudomonas mallei), Haemophilus influenzae, Bordetella pertussis, Mycoplasma pneumoniae, Ureaplasma urealyticum, Legionella pneumophila, Treponema pallidum, Leptospira interrogans, Borrelia burgdorferi, микобактерии (например, Mycobacterium tuberculosis), Mycobacterium leprae, виды рода Actinomyces, виды рода Nocardia, хламидии (например, Chlamydia psittaci, Chlamydia trachomatis или Chlamydia pneumoniae), представители рода Rickettsia (например, Rickettsia ricketsii, Rickettsia prowazekii или Rickettsia akari), бруцеллы (например, Brucella abortus, Brucella melitensis или Brucella suis), Proteus mirabilis, Serratia marcescens, Enterobacter clocae, Acetinobacter anitratus, Klebsiella pneumoniae и Francisella tularensis. В конкретных вариантах осуществления бактерии

представляют собой стафилококки, стрептококки, энтерококки, бациллы, виды рода Clostridium, E. coli, иерсинии, псевдомонады, Proteus mirabilis, Serratia marcescens, Enterobacter clocae, Acetinobacter anitratus, Klebsiella pneumoniae или Мусоbacterium leprae. В более конкретных вариантах осуществления бактерии представляют собой Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, Streptococcus pyogenes, Pseudomonas aeruginosa, Enterococcus faecalis, Proteus mirabilis, Serratia marcescens, Enterobacter clocae, Acetinobacter anitratus, Klebsiella pneumoniae и/или Escherichia coli.

Без дальнейшего уточнения считается, что специалист в данной области техники, используя предыдущее описание, может использовать настоящее изобретение в наиболее полной степени. Следующие примеры являются только иллюстративными и никоим образом не ограничивают остальную часть раскрытия.

ПРИМЕРЫ

Следующие примеры приведены для того, чтобы предоставить специалистам в данной области техники полное раскрытие и описание того, как получают и оценивают соединения, композиции, изделия, устройства и/или способы, описанные и заявленные в данном документе, и носят исключительно иллюстративный характер и не предназначены для ограничения объема того, что авторы настоящего изобретения считают своим изобретением. В данном документе были предприняты усилия для обеспечения точности числовых значений (например, количества, температуры и т. д.), однако следует учитывать некоторые ошибки и отклонения. Если не указано иное, части представляют собой части по весу, температура указана в градусах Цельсия или равна температуре окружающей среды, и давление равно атмосферному или близко к таковому. Существуют многочисленные варианты и комбинации условий реакции, например концентраций компонентов, необходимых растворителей, смесей растворителей, температуры, давления и других диапазонов и условий реакции, которые можно использовать для оптимизации чистоты и выхода продукта, получаемого в описанном способе. Для оптимизации таких условий способа потребуется только выполнение уместных и обычных экспериментов.

ПРИМЕР 1. Пан-каспазное ингибирование в качестве направленной на хозяина иммунотерапии против MRSA и других бактериальных инфекций кожи. Staphylococcus aureus вызывает большинство инфекций кожи у людей, и появление метициллинрезистентных штаммов S. aureus (MRSA) представляет собой серьезную угрозу для состояния здоровья населения. Существует острая клиническая потребность в отличном антибиотического иммунотерапевтическом средстве для лечения инфекций, обусловленных MRSA, И предупреждения распространения устойчивости антибиотикам. В данном документе пан-каспазный ингибитор, представляющий собой хинолин-val-asp-дифторфеноксиметилкетон (Q-VD-OPH), исследовали на эффективность в отношении инфекции кожи, обусловленной MRSA, у мышей. Однократная системная доза Q-VD-OPH обеспечивала быстрое уменьшение размеров поражений кожи и выведение бактерий по сравнению с таковыми у мышей дикого типа (WT), обработанных средой-носителем или необработанных. Хотя Q-VD-OPH ингибировал инфламмасомозависимое образование «крапинок» ASC и опосредованную каспазой-1 выработку IL-1β, Q-VD-ОРН сохранял эффективность у мышей с дефицитом IL-1β, ASC, каспазы-1, каспазы-11 или гасдермина D. Это неожиданно показало, что эффективность Q-VD-OPH не зависит от инфламмасомо-опосредованного пироптоза. Вместо этого Q-VD-OPH снижал уровень апоптоза моноцитов и нейтрофилов. Кроме того, Q-VD-OPH усиливал некроптоз макрофагов с сопутствующим повышением уровней TNF в сыворотке крови, и TNF-вырабатывающих нейтрофилов, и моноцитов/макрофагов, и нейтрофилов в инфицированной коже. Соответственно, Q-VD-OPH не был эффективен у мышей с дефицитом TNF (с ассоциированным снижением притока и некроптоза нейтрофилов), у мышей с дефицитом TNF/IL-1R и у мышей WT, обработанных антителами к TNF. Эффективность Q-VD-OPH in vivo, вероятно, проявлялась за счет ингибирования нескольких каспаз, поскольку исследования in vitro показали, что комбинированное ингибирование каспаз 3, 8 и 9 обеспечивает снижение уровня апоптоза, а комбинированное ингибирование каспаз 1, 8 и 11 обеспечивает увеличение содержания TNF. Наконец, Q-VD-OPH также оказывал терапевтическое действие в отношении инфекций кожи, обусловленных Streptococcus pyogenes и Pseudomonas aeruginosa, у мышей. В совокупности пан-каспазное ингибирование представляет собой перспективную направленную на хозяина иммунотерапию против MRSA и других бактериальных инфекций кожи.

Материалы и способы

Ингибиторы каспазы. Пан-каспазный ингибитор, представляющий собой хинолин-val-asp-дифторфеноксиметилкетон (Q-VD-OPH) (Cayman Chemicals), растворяли в DMSO с получением исходного раствора с концентрацией 5 мг/мл. Дозу in vivo, составляющую 20 мг/кг, разбавленную в стерильном PBS, вводили мышам внутрибрюшинно (i. р.). Для исследований в культуре in vitro Q-VD-OPH (10, 100 и 10000 мкг/мл), а также специфические ингибиторы каспазы, представляющие собой Z-WEHD-FMK (ингибитор каспазы-1) (100 мкМ) (R&D Systems), Z-DQMD-FMK (ингибитор каспазы-3) (10 мкМ) (R&D Systems), Z-IETD-FMK (ингибитор каспазы-8) (100 мкМ) (R&D Systems), Z-LEHD-FMK (ингибитор каспазы-9) (100 мкМ) (R&D Systems), ваделолактон (ингибитор каспазы-11) (20 мкМ) (Santa Cruz Biotechnology) и пан-каспазный ингибитор эмрикасан (Selleckchem) (9 мкг/мл) получали в соответствии с инструкциями производителя. Для каспазы-7 не существует специфического ингибитора.

Штаммы бактерий. Биолюминесцентный штамм S. aureus USA300 LAC::lux был получен из внебольничного, устойчивого к метициллину изолята S. aureus (MRSA) USA300 LAC, полученного в результате вспышки инфекции кожи в окружной тюрьме Лос-Анджелеса_(Лос-Анджелес, Калифорния, США) и был любезно предоставлен Татту Kielian (Университет Небраски). Биолюминесцентный штамм S. pyogenes Xen20 (PerkinElmer, Хопкинтон, Массачусетс) был получен из родительского штамма S. pyogenes 591 серотипа М49. Биолюминесцентный штамм P. aeruginosa Xen41 (PerkinElmer) был получен из родительского штамма PAO1. Все из USA300 LAC::lux, Xen20 и Xen41

обладают модифицированным опероном lux из Photorhabdus luminescens, стабильно интегрированным в бактериальную хромосому, так что испускание сине-зеленого света живыми и метаболически активными бактериями сохраняется во всем потомстве без селекции.

Получение бактерий. Бактерии S. aureus USA300 LAC::lux высевали штрихованием на чашку с триптон-соевым агаром (TSA) (триптон-соевый бульон [TSB] плюс 1,5% бактоагара; BD Biosciences) и выращивали в течение ночи при 37°C в бактериальном инкубаторе. Отдельные колонии культивировали в TSB при 37°C в инкубаторе со встряхиванием (240 об./мин.) в течение ночи (~18 часов), после чего проводили пересев в соотношении 1:50 и культивирование при 37°C в течение 2 часов для получения бактерий в среднелогарифмической фазе роста. Штамм S. pyogenes Xen20 высевали штрихованием на чашки с ТНУ (бульон Тодда-Хьюитта [Neogen] плюс 0,5% дрожжевой экстракт [MilliporeSigma] плюс 1,5% бактоагар) и выращивали в течение ночи в бактериальном инкубаторе. Отдельные колонии Хеп20 выращивали в течение ночи в бульоне ТНУ (бульон Тодда-Хьюитта [Neogen] плюс 0,5% дрожжевой экстракт [MilliporeSigma]) при 37° без встряхивания с последующим разбавлением 1:25 в бульоне ТНУ и выращивали в при 37°C без встряхивания течение 4 часов для получения среднелогарифмической фазе роста. Бактерии Р. aeruginosa штамма Xen41 высевали штрихованием на чашку со средой Луриа-Бертани (LB) (бульон LB плюс 1,5% бактоагара) и выращивали в течение ночи в бактериальном инкубаторе. Отдельные колонии штамма Р. aeruginosa выращивали в течение ночи в бульоне LB при 37°C при встряхивании со скоростью 240 об./мин., затем разбавляли 1:50 и выращивали в течение 2,5 часов, чтобы получить бактерии в среднелогарифмической фазе роста. В случае USA300 LAC::lux, Xen41 и Xen20 каждый штамм бактерий отдельно осаждали, промывали и ресуспендировали в PBS и измеряли оптическую плотность при 600 нм (A₆₀₀) для оценки количества КОЕ для предварительно определенного инокулята (USA300 LAC::lux [3×10⁷] KOE(25)], S. pyogenes Xen20 [5×10⁵ KOE] или P. aeruginosa Xen41 [5×10⁶ KOE] (43)) для каждого штамма, что подтверждали после культивирования на чашках в течение ночи.

Мыши. Все мыши имели генетический фон C57BL/6. Мышей C57BL/6 дикого типа (WT), мышей с ASC-цитрин (B6.Cg-Gt(ROSA)26Sor^{tm1.1(CAG-Pycard/mCitrine*,-CD2*)Dtg}/J), каспаза- $1/11^{-l-}$ мышей (B6N.129S2-Casp1^{tm1Flv}/J), TNF^{-l-} (B6;129S-Tnf^{tm1Gkl}/J) и IL-1R^{-l-} мышей (B6.129S7-il1r1^{tmlmx}/J) получали от Jackson Laboratories (Бар-Харбор, Мэн). Мышей с дефицитом как TNF, так и IL-1R (TNF/IL-1R^{-l-} мышей) получали путем скрещивания TNF^{-l-} мышей с IL-1R^{-l-} мышами. IL-1β^{-l-} мыши были ранее созданы и предоставлены Yoichiro Iwakura (Токийский университет). ASC^{-l-}, GSDMD^{-l-} (с дефицитом гасдермина D), каспаза- 1^{-l-} и каспаза- 11^{-l-} мыши были созданы и предоставлены Genentech (Сан-Франциско, Калифорния). Все мыши были выращены и содержались в специальных условиях, свободных от патогенов, в животноводческом комплексе, аккредитованном Американской ассоциацией по аккредитации ухода за лабораторными животными (AAALAC) при Университете Джона Хопкинса, и размещались в соответствии с процедурами,

описанными в Руководстве по уходу за лабораторными животными и их использованию (National Academies Press, 2011).

Модели бактериальных инфекций кожи на мышах in vivo. Все исследования на животных были одобрены Комитетом по уходу за животными и их использованию Университета Джона Хопкинса. Для всех экспериментов использовали 6-8-недельных мышей, сопоставимых по полу и возрасту. Спинные поверхности анестезированных (изофлуран [2%] ингаляционно) мышей выбривали и инокулировали путем внутрикожной (i. d.) инъекции CA-MRSA штамма USA300 LAC::lux (3×10⁷ KOE (25, 26)), S. pyogenes штамма Xen20 (5×10⁵ KOE (42)) или Р. aeruginosa штамма Xen41 (5×10⁶ KOE (43)) в 100 мкл PBS с помощью инсулинового шприца калибра 29. В некоторых экспериментах посредством і. р. инъекции вводили mAb к TNF или mAb изотипического контроля в дни -1, 0 и 1 относительно инокуляции кожи посредством введения S. aureus. Примечательно, что в случае Р. aeruginosa Xen41 такая і. d. инокуляция приводила к гибели 40% необработанных мышей, тогда как ни одна из мышей, обработанных с помощью Q-VD-OPH, не погибала вследствие инфекции (ФИГ. 8E).

<u>Измерение общего размера поражения</u>. Общий размер поражения (см²) измеряли по цифровым фотографиям кожи спины анестезированных мышей (2% изофлуран) с применением программного обеспечения ImageJ и миллиметровой линейки в качестве эталона.

Биолюминесцентная и флуоресцентная визуализация всего животного in vivo. Биолюминесцентная визуализация in vivo (BLI) для обеспечения приблизительной оценки бактериальной нагрузки in vivo (при применении в сочетании с биолюминесцентными штаммами бактерий USA300 LAC::lux, Xen20 или Xen41) и флуоресцентная визуализация in vivo (FLI) (при применении в сочетании с мышами с ASC-цитрин) проводились на анестезированных мышах (2% изофлуран) с применением системы визуализации in vivo Lumina III (IVIS) (PerkinElmer). Для BLI in vivo данные представляют в цветовой шкале, наложенной на полутоновую фотографию мышей, и количественно оценивают в пределах кругового участка интереса (ROI) размером 1×10³ пикселей как общий поток (фотонов/с). Сигналы FLI для ASC-цитрина измеряли с применением длины волны возбуждения 488 нм, длины волны испускания 507 нм и времени экспозиции 0,5 секунды. Данные FLI in vivo представлены в цветовой шкале, наложенной на полутоновую фотографию мышей, и количественно определены в пределах прямоугольного ROI как общая эффективность излучения ([фотонов/с]/[мВт/см²]).

<u>Подсчет КОЕ ех vivo</u>. Гомогенаты ткани кожи получали путем проведения панчбиопсии пораженной кожи размером 10 мм (Acuderm) и гомогенизации каждого образца (гомогенизатор серии Pro200; Pro Scientific) в Reporter Lysis Buffer (Promega), содержащем таблетки коктейля ингибиторов протеаз (Roche Life Sciences) при 4°C. Подсчет КОЕ ех vivo проводили после внесения серийно разбавленных гомогенатов тканей кожи на ночь в чашки с TSA.

<u>Кинетика кривой роста бактерий</u>. Бактериальные бульонные культуры S. aureus

USA300 LAC::lux, S. pyogenes штамма Xen20 или P. aeruginosa штамма Xen41 получали, как описано выше. После культивирования в течение ночи культуры разбавляли 1:100 в соответствующих средах для роста. Культуры бактерий инкубировали либо со средойносителем (Veh, DMSO: PBS), либо с различными логарифмическими концентрациями Q-VD-OPH (10 мкг/мл, 100 мкг/мл и 1000 мкг/мл) в общем объеме 200 мкл. Рост бактерий (ОD₆₀₀) и биолюминесценцию (лм) (в качестве меры бактериального метаболизма, поскольку оперон lux обеспечивает выработку света в ответ на альдегиды, образующиеся в ходе нормального бактериального метаболизма) измеряли в трех повторностях для 10-часовых культур при 37°C, и измерения регистрировали с интервалом в 20 минут в планшет-ридере Gen5 (BioTek).

Анализы активности протеазы. Анализы активности протеазы проводили с помощью EnzChek Gelatinase/Collagenase Assay Kit и EnzChek Elastase Assay Kit (ThermoFisher) в соответствии с инструкциями производителя. Вкратце, различные концентрации (1, 10 или 100 нг) стафопаина A (sspP), стафопаина B (sspB) или стрептопаина (speB) (CUSABIO) с или без Q-VD-OPH (10, 100, 1000 мкг/мл) инкубировали с 1 мкг желатина DQ или эластина DQ (ThermoFisher) в прилагаемом буфере для расщепления в 96-луночных черных планшетах (Corning, NY) в течение 20 часов. Также осуществляли положительные контроли с помощью коллагеназы (0,4 Ед./мл) и эластазы (0,25 Ед./мл), с контролями ингибиторов в присутствии или отсутствии ингибиторов протеаз, представляющих собой 1, 10-фенантролин (1 мМ) или Nметоксисукцинил-Ala-Ala-Pro-Val-хлорметилкетон (0,1)MMсоответственно. Относительную интенсивность флуоресценции анализировали с помощью планшетридера Gen5 (BioTek; длина волны возбуждения 485 нм; длина волны испускания возбуждения 538 нм).

Выделение и условия культивирования макрофагов, происходящих из костного мозга. Макрофаги, происходящие из костного мозга (BMDM), получали путем дифференциации клеток-предшественников костного мозга, полученных из большеберцовой кости и бедра мышей C57BL/6 WT в возрасте от 8 до 12 недель в полной среде RPMI 1640, содержащей 20 нг/мл M-CSF (Sigma-Aldrich) в течение 7 дней при 37°C и 5% CO_2 в инкубаторе с увлажнением, с заменой среды каждые 3 дня. Чистоту BMDM определяли с помощью проточной цитометрии, и эти культуры содержали 96,64% BMDM $CD11b^+$. Затем BMDM повторно высевали в 96-луночные планшеты при концентрации 2,5 \times 10^5 клеток/мл для всех экспериментальных анализов.

Выделение нейтрофилов мыши и условия культивирования. Нейтрофилы мыши получали из костного мозга мышей C57BL/6 WT в возрасте от 8 до 12 недель с помощью разделения на магнитных шариках с антителами к Ly6G MACs в соответствии с протоколами производителя (Miltenyi Biotec, Inc.). Чистоту нейтрофилов мышей определяли с помощью проточной цитометрии, и эти культуры содержали 97,5% Ly6G $^{\rm hi}$ CD11 $^{\rm h}$ нейтрофилов. Нейтрофилы культивировали в 96-луночных планшетах с концентрацией 1,5 \times 10 $^{\rm 5}$ клеток/мл, содержащих полную среду RPMI, для всех

экспериментальных анализов.

Культуры BMDM и нейтрофилов со стимуляцией с помощью S. aureus \pm ингибиторы каспазы. Использовали ранее описанную стимуляцию in vitro BMDM и нейтрофилов с помощью живых S. aureus (9). ВМDМ или нейтрофилы мыши культивировали в полной среде RPMI 1640 при плотности 2.5×10^5 и 1.5×10^5 клеток на 200 мкл/лунка в 96-луночном планшете для ВМDМ и нейтрофилов соответственно. Эти культуры клеток инкубировали с живым S. aureus при множественности заражения (MOI) бактерий к клеткам 5:1 при 37°C и 5% CO₂, и в первый 1 час добавляли гентамицин (20 мг/мл) и выращивание культур продолжали в общей сложности в течение 6 часов. В некоторых экспериментах к культурам одновременно с S. aureus добавляли специфические ингибиторы по отдельности или в комбинации, в том числе ингибиторы каспазы Z-WEHD-FMK (100 мкМ), Z-DQMD-FMK (10 мкМ), Z-IETD-FMK (100 мкМ), Z-LEHD-FMK (100 мкМ), Ваделолактон (20 мкМ), Q-VD-OPH (10 мкг/мл) или эмрикасан (9 мкг/мл). Положительный контроль некроптоза осуществляли путем культивирования ВМDМ или РМN при 37°C и 5% CO₂ в течение 8 часов с миметиком SMAC (антагонист IAP) (100 нМ) (Sigma-Aldrich), рекомбинантным TNF мыши (20 нг/мл) и Z-VAD-FMK (20 мкМ) (R&D Systems).

<u>Гистология</u>. Образцы панч-биопсии кожи (10 мм) собирали в день 3, фиксировали в формалине (10%) и заливали в парафин. Срезы (4 мкм) помещали на предметные стекла и окрашивали гематоксилином и эозином (H&E) и красителем по Граму и сканировали в цифровом виде в Johns Hopkins Reference Histology Laboratory в соответствии с рекомендациями, используемыми для клинических образцов. Изображения анализировали с использованием программного обеспечения для анализа изображений Арегіо ImageScope (v12.4) (Leica Biosystems). Площадь некротического поражения кожи (мм) определяли путем осуществляемого в ручном режиме измерения ширины некротического поражения кожи, наблюдаемого в каждом срезе, полученном с использованием Н&E. Площадь абсцесса определяли путем осуществляемого в ручном режиме определения границ нейтрофильного абсцесса в каждом срезе, окрашенном с помощью Н&E, и расчета площади при анализе изображения. Ширину бактериальной полосы (мм) определяли путем измерения ширины бактериальной полосы в ручном режиме в каждом окрашенном по Граму срезе.

<u>Уровни IL-1β и TNF в сыворотке крови</u>. Уровни белка IL-1β и TNF в сыворотке крови (пг/мл) измеряли в сыворотке крови, собранной в дни 1 и 3 после инокуляции кожи посредством введения S. aureus \pm обработка Q-VD-OPH, с использованием систем для анализа белка Bio-Plex и нормализовали по отношению к общему белку в соответствии с рекомендации производителя (Bio-Rad).

<u>Проточная цитометрия</u>. Собирали образцы панч-биопсии кожи размером 10 мм, измельчали и подвергали ферментативному расщеплению в 3 мл RPMI, содержащей 100 мкг/мл ДНКазы I (Sigma-Aldrich) и 1,67 ед. Вунша/мл Liberase TL (Roche) в течение 1 часа при 37°C и встряхивании при 140 об./мин. Суспензии отдельных клеток получали после

фильтрации расщепленных образцов через фильтр для клеток с размером пор 40 мкл с помощью поршня шприца объемом 3 мл, после чего клетки промывали в RPMI. Суспензию отдельных клеток промывали в буфере для промывки (Invitrogen), ресуспендировали в буфере для связывания аннексина-V и окрашивали красителем аннексин-V (BD Biosciences). Окрашенные клетки промывали в буфере для связывания аннексина-V. Суспензию отдельных клеток инкубировали с TruStain fcX (Biolegend) для блокирования связывания с Fc-рецепторами и ресуспендировали для мечения mAb к маркерам клеточной поверхности (дополнительная таблица S2). Маркеры клеточной поверхности включали CD45, CD11b, CD11c, CD115, CD207, Ly6C, Ly6G и F4/80 в сбалансированном солевом растворе Хэнкса (HBSS) с 2% телячьей сывороткой и 5 мМ Hepes вместе с буфером Brilliant Stain Buffer (BD Biosciences). Клетки промывали с помощью PBS и окрашивали в отношении жизнеспособности (Zombie Aqua Fixable Viability Kit-BioLegend). Меченные на поверхности клетки фиксировали в наборе BD Cytofix/Cytoperm Buffer (BD Biosciences). Клетки дополнительно метили в отношении внутриклеточного pMLKL, который выявляли с помощью mAb pMLKL, биотинилированного с помощью набора Biotin conjugation/Fast/Type A (Abcam) в соответствии с инструкциями производителя, вместе с другими внутриклеточными mAb к IL-1β и TNF (дополнительная таблица S1). Для каждого эксперимента осуществляли соответствующий изотипический контроль IgG (дополнительная таблица S2) и контроль стрептавидина для внутриклеточного мечения с помощью mAb. Клетки, меченные с помощью mAb, затем промывали в буфере для внутриклеточного окрашивания и ресуспендировали в стабилизирующем фиксаторе (BD Biosciences). Обнаружение клеток проводили на проточном цитометре BD LSRFortessa (BD Biosciences), а данные анализировали с использованием программного обеспечения Cytobank (Cytobank). Для иммунофенотипирования моноцитов, макрофагов и нейтрофилов в отношении клеток сначала применяли гейты для отбора живых клеток, синглетов и CD45⁺ клеток (панлейкоцитарный маркер), CD11b⁺ CD11c⁻ и CD115⁺ клеток (моноциты), CD11b⁺ F4/80⁺ клеток (макрофаги) и CD11b⁺ CD11c⁻ и клетки Ly6G^{hi}Ly6C^{int/low} клеток (нейтрофилы) (ФИГ. 10). Для иммунофенотипирования клеток Лангерганса и дендритных клеток (DC) моноцитарного происхождения в отношении клеток сначала применяли гейты для отбора CD45⁺ клеток, а затем CD207⁺CD103⁻ клеток (клетки Лангерганса) и CD45⁺CD11c⁺CD115⁺ DC моноцитарного происхождения (ФИГ. 11), с модификацией ранее описанных способов (61). Абсолютные числа соответствующих популяций клеток рассчитывали как (Общее количество живых клеток Х [% популяции клеток/100]).

<u>Анализ формы импульса (PuLSA)</u>. Анализ наличия «крапинок» ASC-цитрин выполняли с использованием анализа PuLSA, как описано ранее (29), и в соответствии со стратегией гейтирования проточной цитометрии (ФИГ. 11). Суспензию отдельных клеток из пунктатов кожи (как описано выше) промывали с помощью PBS и окрашивали в отношении жизнеспособности (Zombie Aqua Fixable Viability Kit-BioLegend). Окрашенные живые/мертвые клетки инкубировали с TruStain fcX (Biolegend) для блокирования

связывания с Fc-рецепторами и ресуспендировали для мечения с помощью mAb к маркерам поверхности (см. дополнительную таблицу S3) в сбалансированном солевом растворе Хэнкса (HBSS) с 2% телячьей сывороткой и 5 мМ Hepes вместе с буфером Brilliant Stain Buffer (BD Biosciences). Окрашенные клетки промывали в буфере HBSS и ресуспендировали в стабилизирующем фиксаторе (BD Biosciences). Обнаружение клеток проводили на проточном цитометре BD LSR Fortessa (BD Biosciences), а данные анализировали с использованием программного обеспечения Cytobank (Cytobank). В отношении клеток сначала применяли гейты для отбора живых клеток и синглетов, обрабатывали для высокоразмерного компьютерного анализа методом проточной цитометрии для идентификации популяций клеток с экспрессией ASC-цитрин, в том (CD45⁺CD11b⁺Ly6G^{hi}Gr1⁺Ly6C^{low}), нейтрофилов числе клеток Лангерганса (CD45⁺CD207⁺CD103⁻), дендритных клеток (DC) моноцитарного происхождения (CD45⁺CD11c⁺CD115⁺) и моноцитов (CD45⁺CD11b⁺CD115⁺) (ФИГ. 11). Данные по «крапинкам» ASC представлены в виде общего количества ASC-цитрин (% клеток ASCцитрин/живых клеток) и общего количества «крапинок» ASC.

Проточная цитометрия для BMDM и нейтрофилов для экспериментов in vitro. Культивированные ВМDМ или нейтрофилы промывали в буфере для промывки (Invitrogen) и ресуспендировали в буфере для связывания аннексина-V и окрашивали красителем аннексин-V-FITC (BD Biosciences). Окрашенные клетки промывали в буфере для связывания аннексина-V. Суспензию отдельных клеток инкубировали с TruStain fcX (Biolegend) для блокирования связывания с Fc-рецепторами и ресуспендировали для мечения с помощью mAb к маркерам клеточной поверхности. Маркеры клеточной поверхности включали CD11b (клон BV786; BD Biosciences) для BMDM и Ly6G-PE-Cy7 (BD Biosciences) для нейтрофилов в сбалансированном солевом растворе Хэнкса (HBSS) с 2% телячьей сывороткой и 5 мМ Hepes. Клетки промывали с помощью PBS и окрашивали в отношении жизнеспособности (Zombie UV Fixable Viability Kit; BioLegend). Меченные на поверхности клетки фиксировали в наборе BD Cytofix/Cytoperm Buffer (BD Biosciences). Клетки дополнительно метили на наличие внутриклеточного TNF-APC (BD Biosciences). Для каждого эксперимента осуществляли соответствующие изотипические контроли IgG для внутриклеточного мечения с помощью mAb. Клетки, меченные с помощью mAb, затем промывали в буфере для внутриклеточного окрашивания и ресуспендировали в стабилизирующем фиксаторе (BD Biosciences). Обнаружение клеток проводили на проточном цитометре BD LSRFortessa (BD Biosciences), а данные анализировали с использованием программного обеспечения Cytobank (Cytobank). Для гейтирования ВМDМ и нейтрофилов в отношении внутриклеточной экспрессии аннексина-V и TNF, в отношении BMDM и нейтрофилов сначала применяли гейты для отбора живых клеток, синглетов и CD11b+ клеток (BMDM) и CD11b+Ly6Ghi клеток (нейтрофилы) (дополнительная ФИГ. 18).

<u>Вестерн-блот-анализ</u>. 1 мл или 200 мл охлажденного льдом буфера 1XRIPA (Sigma-Aldrich), содержащего 1X коктейля ингибиторов протеаз и фосфатаз Halt (Thermofisher),

добавляли к образцам панч-биопсии кожи (10 мм), собранным в день 1, или к культивируемым клеткам ВМDМ или РМN. Образцы кожи гомогенизировали и лизаты клеток инкубировали на льду в течение 30 минут и центрифугировали при 14000 об./мин. в течение 20 минут при 4°С. Концентрацию белка определяли с помощью модифицированного анализа белка по Лоури (ThermoFisher). Равное количество белка анализировали на 4-12% геле Bolt Bis-Tris (Invitrogen) и переносили посредством электрофоретического переноса на поливинилидендифторидную мембрану (Bio-Rad). Мембраны блокировали с помощью Blocker BSA или SuperBlock Blocking Buffer (ThermoFisher), инкубировали в течение ночи при 4°С с первичными антителами, в том числе к рМLКL, MLKL, ICAD или β-актину (Abcam) (дополнительная таблица S4). Вторичные антитела, конъюгированные с HRP, инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре. Изображения получали с применением ChemiDocXRS (Bio-Rad). Мембрану PVDF освобождали с помощью буфера для очистки Restore Plus Western Blot (ThermoFisher) между обнаружением отдельных белков.

<u>Анализ блотов белков</u>. 7,5-10 нг sspP, sspB или speB инкубировали с 10 мг/мл Q-VD-OPH или без него в течение 2 часов при 37°C, белок разделяли на 4-12% геле Bolt Bis-Tris (Invitrogen) и подвергали электрофоретическому переносу на мембрану PVDF (Bio-Rad). Мембрану окрашивали с помощью набора MemCode Reversible Protein Stain (ThermoFisher). Цифровые фотографии и изображения получали и анализировали с помощью ChemiDocXRS (BioRad).

Статистический анализ. Данные между 2 группами для сравнений за различные периоды (размеры поражений и BLI in vivo) сравнивали с применением 2-факторного анализа ANOVA, а для одиночных сравнений (ex vivo KOE и данные проточной цитометрии в определенные моменты времени) сравнивали с применением 2-стороннего непарного t-теста Стьюдента. Данные для сравнений за различные периоды среди нескольких групп (≥3 группы) сравнивали с помощью 2-факторного ANOVA-теста для множественных сравнений. Р-значения, полученные при множественных сравнениях, были скорректированы с помощью восходящего способа Бонферрони, контролировать общую групповую вероятность ошибки. Данные представлены в виде среднего ± стандартная ошибка среднего (SEM), а скрипичные диаграммы представлены с помощью медианы и межквартильного размаха (ICR). Кривые выживаемости Каплана-Мейера сравнивали с применением логарифмического критерия Мантеля-Кокса. Все статистические анализы рассчитывали с применением программного обеспечения Prism (версия 9) (GraphPad; La Jolla, CA) для macOS (v11) и программы для статистической обработки данных на языке R (v4.0.2) с пакетом ggplot2 (v3.3.3). Значения P <0,05 считались статистически значимыми.

<u>Результаты</u>

<u>Обработка с помощью Q-VD-OPH показала заметную эффективность в отношении инфекции кожи, обусловленной CA-MRSA, у мышей</u>. Чтобы определить, характеризуется ли пан-каспазный ингибитор Q-VD-OPH эффективностью в качестве отличного от

антибиотического иммунотерапевтического средства, направленного на использовали модель инфекции кожи, обусловленной CA-MRSA, на мышах (25, 26). Модель включает внутрикожную (i. d.) инокуляцию биолюминесцентного штамма CA-MRSA (USA300 LAC::lux) в спины мышей WT C57BL/6, и бактериальную нагрузку отслеживали неинвазивно и за различные периоды с помощью биолюминесцентной визуализации in vivo (BLI). Результаты BLI in vivo близко соответствуют результатам определения КОЕ ex vivo при выделении из инфицированной кожи в различные моменты времени после инокуляции (R^2 =0,9996 (27)). Мышей WT не обрабатывали (WTнеобработанные) или обрабатывали с помощью однократной дозы среды-носителя (DMSO+PBS; WT-среда-носитель) или Q-VD-OPH (WT-QVD-OPH) внутрибрющинно (і. р.) через 4 часа после инокуляции с помощью CA-MRSA (ФИГ. 1A-1E), то же самое время, которое использовалось для оценки эффективности антибиотиков, вводимых перорально и подкожно мышам (27). Примечательно, что обработка с помощью Q-VD-ОРН обеспечивала быстрое и существенное уменьшение размеров поражений кожи (ФИГ. 1A, 1C), бактериальной нагрузки (измеряемой с помощью сигналов BLI in vivo [ФИГ. 1B, 1D] и подсчета КОЕ ex vivo в день 3 [ФИГ. 1E]), по сравнению с мышами, обработанными средой-носителем, или необработанными мышами. Поскольку значимых различий между полученными мышей, обработанных результатами, для средой-носителем, необработанных мышей, не наблюдалось, необработанных мышей использовали в качестве контрольной группы сравнения во всех последующих экспериментах. Следует отметить, что эффективность Q-VD-OPH в отношении инфекции кожи, обусловленной S. aureus, in vivo не была обусловлена прямой антибактериальной активностью в отношении роста S. aureus , поскольку инкубация Q-VD-OPH в бульонных культурах с логарифмическими концентрациями Q-VD-OPH (т. е. 10, 100 и 1000 мкг/мл) не приводила к различиям в абсорбции, биолюминесценции и КОЕ in vitro по сравнению с бульонными культурами, инкубированными только со средой-носителем (ФИГ. 9А-9С). Важно отметить, что концентрация Q-VD-OPH 1000 мкг/мл более чем в 2 раза превышает концентрацию і. р. дозы 20 мг/кг, которую вводили мышам до фармакокинетического распределения Q-VD-OPH в крови, тканях и органах мышей in vivo.

Через 3 дня после инокуляции бактериями получали биоптаты кожи и гистологические срезы окрашивали гематоксилином и эозином (H&E) или красителем по Граму и анализировали путем анализа изображения (ФИГ. 1F-1J). На срезах, окрашенных с помощью Н&E, Q-VD-OPH приводил к уменьшению ширины некротического поражения кожи и площади абсцесса по сравнению с необработанными мышами (ФИГ. 1F, 1H, 1I). На окрашенных по Граму срезах Q-VD-OPH приводил к уменьшению длины бактериальной полосы по сравнению с необработанными мышами (ФИГ. 1G, 1J). В совокупности Q-VD-OPH показал терапевтическую эффективность в этой модели инфекции, обусловленной CA-MRSA, на мышах, обеспечив уменьшение поражений кожи и бактериальной нагрузки.

Обработка с помощью Q-VD-OPH обеспечивает увеличение уровня

рекрутирования моноцитов/макрофагов, и его эффективность не зависит от активности І І-1В. В моноцитах, макрофагах и нейтрофилах порообразующие токсины S. aureus (например, α-токсин, PVL и LukAB) индуцируют опосредованный инфламмасомой NLRP3/ASC зависимый от каспазы-1 процессинг про-IL-1β в активную и секретируемую форму IL-1β in vitro (6-8), которая индуцирует рекрутирование нейтрофилов и защиту хозяина от инфекций кожи и других типов инфекций, обусловленных S. aureus, in vivo (9-11). процентные И абсолютные числа Таким образом, доли моноцитов (CD45⁺CD11b⁺CD115⁺), (CD45⁺CD11b⁺F4/80⁺) макрофагов или нейтрофилов $(CD45^{+}Ly6G^{hi}Ly6C^{int/hi})$ в биоптатах из инфицированной кожи в день 1 после инокуляции кожи с помощью CA-MRSA оценивали у мышей, обработанных с помощью Q-VD-OPH, и необработанных мышей (стратегия гейтирования проточной цитометрии показана в дополнительных данных, получаемые в режиме онлайн, ФИГ. 10А-10D). Процентные доли моноцитов и макрофагов были статистически повышенными. Напротив, различий в процентных долях и абсолютных числах нейтрофилов у мышей, обработанных с помощью Q-VD-OPH, по сравнению с необработанными мышами не наблюдали (ФИГ. 2А, 2В). Также оценивали степень, процентную долю и абсолютные числа клеток, вырабатывающих внутриклеточный про-IL-1 β (клетки про-IL-1 β ⁺), и обработка с помощью Q-VD-OPH приводила к увеличению средней интенсивности флуоресценции (MFI) и процентных долей общего количества лейкоцитов (CD45⁺про-IL-1β⁺) (ФИГ. 2C, 2D), особенно для макрофагов и нейтрофилов, но не моноцитов (ФИГ. 2E), у мышей, обработанных с помощью Q-VD-OPH, по сравнению с необработанными мышами. Любопытно, что уровни ІІ-1β в сыворотке крови уменьшались в дни 1 и 3 у мышей, обработанных с помощью Q-VD-OPH, по сравнению с неинфицированными мышами (ФИГ. 2F). Учитывая противоречие повышенного уровня внутриклеточного про-IL-1β (в нейтрофилах и моноцитах) при сниженном уровне IL-1β в сыворотке крови, авторы настоящего изобретения затем определяли, был ли IL-1β вовлечен в обеспечение эффективности Q-VD-OPH, путем осуществления модели инфекции кожи, обусловленной CA-MRSA, на мышах на $IL-1\beta^{-/-}$ мышах (ФИГ. 2G, 2H). У $IL-1\beta^{-/-}$ мышей Q-VD-OPH характеризовался заметной эффективностью со значительным уменьшением поражений кожи и сигналов BLI in vivo по сравнению с необработанными мышами, несмотря на более крупные поражения кожи и более высокую бактериальную нагрузку, наблюдаемые у необработанных IL-1β^{-/-} мышей. Следовательно, механизм эффективности Q-VD-OPH не зависит от активности IL-1β.

Q-VD-OPH ингибирует образование «крапинок» ASC. Определить, влияет ли обработка с помощью Q-VD-OPH на запускаемую инфламмасомой NLRP3/ASC активацию каспазы-1 (перед процессингом про-IL-1β и секрецией зрелого IL-1β), как описано при кожных инфекциях, обусловленных S. aureus, и других типах инфекций (9, 25, 26, 28), авторы настоящего изобретения исследовали образование «крапинок» ASC, которые необходимы для сборки инфламмасомы NLRP3. Модель инфекции кожи, обусловленной CA-MRSA, на мышах получали на мышах с ASC-цитрин (29) в

присутствии или в отсутствие обработки однократной дозой Q-VD-OPH і. р. через 4 часа. Бактериальную нагрузку оценивали с помощью визуализации BLI in vivo (ФИГ. 3A, 3B), а образование «крапинок» ASC оценивали с помощью визуализации флуоресценции in vivo (FLI) через 6 часов после введения Q-VD-OPH (ФИГ. 3C, 3D). Различий в сигналах визуализации BLI in vivo между мышами с ASC-цитрин, обработанными с помощью Q-VD-OPH, и необработанными мышами с ASC-цитрин, не наблюдали (ФИГ. 3A, 3B). Однако сигналы FLI in vivo показали, что Q-VD-OPH фактически ингибирует все образование «крапинок» ASC in vivo , которое, наоборот, увеличивалось у необработанных мышей (ФИГ. 3C, 3D). Чтобы подтвердить эти результаты in vivo, суспензии отдельных клеток из биоптатов кожи, инфицированной CA-MRSA, в дни 0 и 1 оценивали у мышей, обработанных с помощью Q-VD-OPH, и необработанных мышей. Наличие «крапинок» ASC оценивали с помощью анализа формы импульса (PuLSA) с использованием высокоразмерной вычислительной проточной цитометрии, как описано ранее (29) (стратегия гейтирования проточной цитометрии показана на ФИГ. 11). Как показано на графиках, полученных посредством viSNE, и посредством количественной оценки общей процентной доли и абсолютных чисел экспрессии ASC-цитрин (без оценки «крапинок» ASC), процентная доля общей экспрессии ASC-цитрин в живых клетках увеличивался с дня 0 по день 1, но значимо не отличался между мышами, обработанными с помощью Q-VD-OPH, и необработанными мышами (ФИГ. 3E, 3F). Однако, как показано на графиках, полученных посредством viSNE, и посредством количественной оценки общей процентной доли и абсолютных чисел ASC-«крапинок», у мышей, обработанных с помощью Q-VD-OPH, процентная доля клеток с ASC-«крапинками» существенно снижалась (ФИГ. 3G, 3H) по сравнению с необработанными мышами, что подтверждает данные in vivo на ФИГ. 3C, 3D. Наконец, и аналогично IL- $1\beta^{-/-}$ мышам (ФИГ. 2G, 2H), Q-VD-OPH сохранял высокую эффективность у ASC^{-/-} мышей со значительно меньшими повреждениями кожи и сигналами BLI in vivo по сравнению с необработанными мышами, несмотря на более крупные поражения кожи и более высокую бактериальную нагрузку, наблюдаемые у необработанных ASC^{-/-} мышей (ФИГ. 3I, 3J). В совокупности, несмотря на то, что Q-VD-ОРН ингибировал сборку инфламмасомного комплекса ASC, Q-VD-ОРН попрежнему характеризовался эффективностью в отношении инфекции, обусловленной СА-MRSA, в отсутствие активности ASC (у ASC-- мышей), что указывает на то, что эффективность Q-VD-OPH не зависит от образования инфламмасомного комплекса ASC.

<u>Каспазы 1 и 11 или опосредованный гасдермином D пироптоз не были вовлечены в обеспечение эффективности Q-VD-OPH.</u> Поскольку обработка с помощью Q-VD-OPH ингибирует образование «крапинок» ASC (ФИГ. 3A-H) и, как известно, ингибирует каспазы 1 и 11 (23, 24), которые являются ключевыми каспазами, активируемыми ASC-зависимыми инфламмасомами, авторы настоящего изобретения определяли, характеризовалась ли обработка с помощью Q-VD-OPH эффективностью у мышей с дефицитом каспаз 1 и 11. Модель инфекции кожи, обусловленной CA-MRSA, на мышах осуществляли на каспаза-1--- мышах, каспаза-11--- мышах или мышах с дефицитом обеих

каспаз 1 и 11 (каспаза-1/11^{-/-} мыши) в присутствии или отсутствие обработки однократной дозой Q-VD-OPH і. р. через 4 часа (ФИГ. 4А-4F). Следует отметить, что размеры поражений кожи и сигналы BLI іп vivo у каспаза-1^{-/-} мышей (ФИГ. 4А, 4В), каспаза-11^{-/-} мышей (ФИГ. 4С, 4D) и каспаза-1/11^{-/-} мышей (ФИГ. 4E, 4F) значимо не отличались от таковых у необработанных мышей WT, что указывает на то, что дефицит каспаз 1 и 11 по отдельности или в комбинации не влияет на защиту хозяина от инфекции кожи, обусловленной CA-MRSA. Однако обработка с помощью Q-VD-OPH приводила к заметному уменьшению размеров поражений кожи и сигналов BLI іп vivo у каспаза-1^{-/-} мышей (ФИГ. 4A, 4B), каспаза-11^{-/-} мышей (ФИГ. 4C, 4D) и каспаза-1/11^{-/-} мышей (ФИГ. 4E, 4F). Следовательно, эффективность Q-VD-OPH не зависела от активности каспаз 1 и 11 (по отдельности или в комбинации).

Известно, что каспазы 1 и 11 активируют гасдермин-D (GSDMD), который является критическим порообразующим белком, важным для секреции IL-1 β из клеток и для инфламмасомо-опосредованного пироптоза (30). Чтобы определить, проявляется ли эффективность Q-VD-OPH в результате инфламмасомо-опосредованного пироптоза, зависящего от гасдермина D, на гасдермин D^{-/-} мышах осуществили модель инфекции кожи, обусловленной CA-MRSA, на мышах (ФИГ. 4G, 4H). Аналогично с IL-1 β -/- мышами, каспаза-1-/- мышами, каспаза-11-/- мышами и каспаза-1/11-/- мышами, Q-VD-OPH сохранял эффективность у гасдермин D-/- мышей со значительно сниженными поражениями кожи и сигналами BLI in vivo по сравнению с необработанными мышами, несмотря на более крупные поражения кожи и более высокую бактериальную нагрузку у необработанных гасдермин D-/- мышей. В совокупности эти данные указывают на то, что эффективность Q-VD-OPH не зависела от активности гасдермина D.

Q-VD-OPH обеспечивает уменьшение апоптотических количества нейтрофилов/моноцитов и увеличение количества некроптозных макрофагов. Учитывая, что обработка с помощью Q-VD-OPH по-прежнему было эффективной у мышей с дефицитом ІL-1β, каспаз 1 и 11 или гасдермина-D, активность ІL-1β или инфламмасомоопосредованный пироптоз не были вовлечены в механизм обеспечения эффективности О-VD-OPH . Поэтому авторы настоящего изобретения оценивали, вовлечены ли в обеспечение эффективности Q-VD-OPH другие механизмы гибели клеток, возникающие при инфекциях, обусловленных S. aureus, в том числе апоптоз (12-14, 31-34) и некроптоз (15, 16, 35-37). Инфекцию кожи, обусловленную CA-MRSA, осуществляли у мышей WT \pm обработка однократной дозой Q-VD-OPH і. р. через 4 часа после инокуляции и суспензии отдельных клеток из биоптатов инфицированной кожи в день 1 оценивали на любые изменения процентных долей клеток, подвергшихся раннему апоптозу (ФИГ. 5А-5С) или некроптозу (ФИГ. 5D-G). Обработка с помощью Q-VD-ОРН приводила к значительному уменьшению процентных долей и абсолютных чисел клеток с ранним апоптозом в общем числе лейкоцитов ($CD45^{+}$ аннексин V^{+}), моноцитов и нейтрофилов, но не макрофагов, по сравнению с необработанными мышами (ФИГ. 5А-5С) (см. стратегию гейтирования проточной цитометрии [ФИГ. 10А-10D]). Затем также оценивали степень, процентные

доли и абсолютные числа клеток, подвергшихся некроптозу (pMLKL⁺). Обработка с помощью Q-VD-OPH приводила к значительно большему MFI, процентным долям и абсолютным числам общих лейкоцитов и макрофагов, но не моноцитов или нейтрофилов, по сравнению с необработанными мышами (ФИГ. 5E-5G). В совокупности обработку с помощью Q-VD-OPH привела к снижению уровня апоптоза в нейтрофилах и моноцитах и усилению уровня некроптоза в макрофагах.

Клиренс бактерий, индуцированный Q-VD-OPH, зависит от активности TNF. Поскольку известно, что Q-VD-OPH ингибирует некроптоз в условиях инфекции, обусловленной гепатитом С (21), и TNF может инициировать некроптозную гибель клеток (38), оценивали роль TNF в обеспечении эффективности Q-VD-OPH. Модель инфекции кожи, обусловленной CA-MRSA, на мышах осуществляли на мышах WT ± обработка однократной дозой Q-VD-OPH і. р. через 4 часа после инокуляции и суспензии отдельных клеток из биоптатов инфицированной кожи в день 1 оценивали на любые изменения процентных долей и абсолютного числа клеток, вырабатывающих TNF (TNF⁺). Обработка с помощью Q-VD-OPH приводила к значительному увеличению MFI, процентных долей и абсолютного числа общих лейкоцитов (CD45⁺TNF⁺), моноцитов, макрофагов и нейтрофилов по сравнению с необработанными мышами (ФИГ. 6A-6C) (см. стратегия гейтирования проточной цитометрии [ФИГ. 10A-10D]). Соответственно, Q-VD-OPH приводил к повышенным уровням белка TNF в сыворотке в день 1 и 3 по сравнению с необработанными мышами (ФИГ. 6D).

чтобы определить, способствовали ли Q-VD-ОРН-индуцированные повышенные уровни TNF в иммунных клетках и сыворотке крови обработанных мышей терапевтическому механизму действия, на TNF^{-/-} мышах осуществляли модель инфекции кожи, обусловленной CA-MRSA (ФИГ. 6E, 6F). У TNF^{-/-} мышей, несмотря на то, что обработка с помощью Q-VD-OPH приводила к значительно меньшим размерам поражений, чем у необработанных мышей, не было значимой разницы в сигналах BLI in vivo между мышами, обработанными с помощью Q-VD-OPH, и необработанными мышами. Следовательно, O-VD-OPH не характеризовался эффективностью в снижении бактериальной нагрузки у TNF^{-/-} мышей, что указывает на то, что опосредованный TNF клиренс инфекции вовлечен в обеспечение эффективности Q-VD-OPH. Кроме того, чтобы оценить, выполняется ли эта роль TNF в обеспечении эффективности Q-VD-OPH независимо от роли ІІ-1β в защите хозяина, тот же эксперимент проводили на мышах с дефицитом как TNF, так и IL-1R (TNF/IL-1R^{-/-} мыши) (ФИГ. 6G, 6H). Аналогично, у TNF/IL-1R^{-/-}мышей, несмотря на то, что обработка с помощью Q-VD-OPH приводила к значительно меньшим размерам поражений, чем у необработанных мышей, не было значимой разницы в сигналах BLI in vivo между мышами, обработанными с помощью Q-VD-OPH, и необработанными мышами. Эти результаты резко контрастируют с заметной эффективностью Q-VD-OPH у IL- $1\beta^{-/-}$ мышей (ФИГ. 2G, 2H), что дополнительно указывает на то, что TNF (а не IL-1β) является преобладающим воспалительным цитокином, опосредующим эффективность Q-VD-OPH в отношении инфекции кожи,

обусловленной СА-MRSA. Наконец, чтобы подтвердить, что эти результаты не были обусловлены дефектом развития у TNF^{-/-} мышей, модель инфекции кожи, обусловленной СА-MRSA, на мышах осуществляли на мышах WT в присутствии системно вводимого нейтрализующего mAb к TNF (mAb к αTNF) (в дни -1, 0 и 1) (ФИГ. 6I). У мышей WT, которым вводили mAb к αTNF, обработка с помощью Q-VD-OPH приводила к значительно меньшим размерам поражений, чем у необработанных мышей, но значимой разницы в сигналах BLI in vivo между мышами, обработанными с помощью Q-VD-OPH, и необработанными мышами (ФИГ. 6J 6K) не наблюдалось, и результаты практически идентичны таковым у TNF^{-/-} мышей (ФИГ. 6E, 6F). В качестве отрицательного контроля, как и ожидалось, у мышей WT, которым вводили mAb изотипического контроля, Q-VD-OPH приводил к уменьшению сигналов BLI in vivo по сравнению с необработанными мышами (ФИГ. 12). Эти результаты указывают на ключевую роль TNF в опосредовании уменьшения бактериальной нагрузки в ответ на обработку с помощью Q-VD-OPH.

О-VD-ОРН обеспечивает уменьшение притока нейтрофилов и не обеспечивает увеличения уровня некроптоза в отсутствие TNF. Для оценки иммунного ответа на обработку с помощью Q-VD-ОРН у TNF^{-/-} мышей и мышей WT (ФИГ. 2A-2B) осуществляли модель инфекции кожи, обусловленной CA-MRSA, на мышах с обработкой с помощью Q-VD-ОРН или без него у TNF^{-/-} мышей. Процентные доли и абсолютное число нейтрофилов (CD45⁺Ly6G^{hi}Ly6C^{int/hi}) из биоптатов инфицированной кожи в день 1 после инокуляции кожи с помощью CA-MRSA у мышей, обработанных с помощью Q-VD-ОРН, были значительно снижены по сравнению с необработанными мышами, или мышами WT, обработанными с помощью Q-VD-ОРН, (ФИГ. 13B-13C по сравнению с ФИГ. 2A-2B) (см. стратегию гейтирования проточной цитометрии [ФИГ. 10A-10D и ФИГ. 5A]). Интересно, что увеличения процентных долей и абсолютного числа моноцитов у TNF^{-/-} мышей, обработанных с помощью Q-VD-ОРН (ФИГ. 13B-13C), по сравнению с мышами WT, обработанными с помощью Q-VD-ОРН (ФИГ. 2A-2B), не наблюдали. Однако процентные доли и абсолютное число макрофагов были статистически повышены у TNF^{-/-} мышей, обработанных с помощью Q-VD-ОРН (ФИГ. 13B-13C).

Кроме того, обработка с помощью Q-VD-OPH у $TNF^{-/-}$ мышей приводила к значительному уменьшению процентных долей и абсолютных чисел клеток с ранним апоптозом в общем числе лейкоцитов (CD45⁺аннексин V⁺), нейтрофилов, но не моноцитов или макрофагов, по сравнению с необработанными мышами WT и мышами WT, обработанными с помощью Q-VD-OPH (ФИГ. 14A-14C по сравнению с ФИГ. 5A-5C) (см. стратегию гейтирования проточной цитометрии [ФИГ. 10A-10D]). Затем также оценивали степень, процентную долу и абсолютные числа клеток, подвергшихся некроптозу (рМLKL⁺) у $TNF^{-/-}$ мышей. Интересно, что обработка с помощью Q-VD-OPH приводило к значительно большему MFI, процентным долям и абсолютным числам общих лейкоцитов у обработанных $TNF^{-/-}$ мышей по сравнению с необработанными $TNF^{-/-}$ мышами (ФИГ. 14D-14F). Однако MFI, процентные доли и абсолютные числа у $TNF^{-/-}$ мышей, обработанных с помощью Q-VD-OPH (540, 15%, 1.5×10^4 клеток соответственно) (ФИГ.

14E, 14F), были значительно снижены по сравнению с мышами WT, обработанными с помощью Q-VD-OPH (2250, 81%, 1.0×10^5 клеток соответственно) (ФИГ. 5E, 5F). Кроме того, pMLKL $^+$ клетки у TNF $^{-/-}$ мышей, обработанных с помощью Q-VD-OPH, представляли собой преимущественно нейтрофилы и макрофаги, но не моноциты по сравнению с необработанными мышами (ФИГ. 14G).

В совокупности обработка с помощью Q-VD-OPH привела к снижению уровня апоптоза в нейтрофилах и уменьшению общего некроптоза у TNF^{-/-} мышей, обработанных с помощью Q-VD-OPH. Кроме того, вестерн-блот-анализ обработанных с помощью Q-VD-OPH TNF^{-/-} мышей в модели инфекции кожи, обусловленной CA-MRSA, на мышах продемонстрировал снижение уровня некроптоза по сравнению с необработанными мышами WT или мышами WT, обработанными с помощью Q-VD-OPH, на что указывает экспрессия рМLКL и MLKL (ФИГ. 15). Кроме того, как отмечалось ранее, наблюдалось снижение уровня апоптоза (ICAD) у мышей с инфекцией кожи, обусловленной CA-MRSA, как у мышей WT, обработанных с помощью Q-VD-OPH, так и у TNF^{-/-} мышей (ФИГ. 15) с инфицированной кожей в день 1. В совокупности эти результаты позволяют сделать предположение, что даже при уменьшенном уровне апоптоза имеет место сниженный уровень притока нейтрофилов в месте инфекции у TNF^{-/-} мышей, обработанных с помощью Q-VD-OPH.

Комбинированное ингибирование каспаз 3, 8 и 9 обеспечивало снижение уровня апоптоза, а комбинированное ингибирование каспаз 1, 8 и 11 индуцировало выработку TNF, аналогично Q-VD-OPH или эмрикасану in vitro. Поскольку Q-VD-OPH ингибирует многие каспазы (т. е. каспазы 1, 3 и 7-12 ((17, 18)), неясно, ингибирование каких специфических каспаз с помощью Q-VD-OPH приводило к обеспечению терапевтической эффективности в отношении инфекции кожи, обусловленной CA-MRSA, in vivo. Чтобы определить, какие каспазы вовлечены, авторы настоящего изобретения применяли ранее описанную систему культивирования S. aureus, которая включала инкубацию макрофагов костного мозга мыши (ВМDМ) (ФИГ. 7) или нейтрофилов мыши (ФИГ. 16) с живыми S. aureus в течение 6 часов с добавлением гентамицина после первого часа культивирования (чтобы убить все S. aureus) (9). В эти культуры вносили ингибиторы каспаз 1, 3, 8, 9 или 11, Q-VD-OPH, эмрикасан или не обрабатывали (без обработки) и оценивали внутриклеточные уровни раннего апоптоза (аннексин-V⁺) (ФИГ. 7A, 7B, 16A, 16B, 17A, 17В и 17Е, 17F) и TNF (ФИГ. 7C, 7D, 16C, 16D, 17C, 17D и 17G, 17H) с помощью проточной цитометрии (как на ФИГ. 5С и 6С). Стратегия гейтирования для ВМОМ и PMN, культивируемых in vitro, показана на ФИГ. 18. Следует отметить, что никаких значимых различий в жизнеспособности клеток с любым из ингибиторов каспаз, Q-VD-ОРН или эмрикасаном в ВМDМ (~ 80% жизнеспособных клеток) или нейтрофилах (~ 50% жизнеспособных клеток) не наблюдали при измерении по процентной доле живых клеток с применением проточной цитометрии (отрицательные клетки при определении с помощью Zombie UV) (ФИГ. 19).

Что касается аннексин V^+ BMDM и нейтрофилов, ингибирование каспаз 1 или 11

приводило к тому, что процентные доли аннексин V+ ВМDМ и нейтрофилов значимо не отличалось от таковых при отсутствии обработки (27,89-38,31%) (ФИГ. 17А, 17В и ФИГ. 17Е, 17F), что дает возможность предположить, что ингибирование каспаз 1 или 11 не обеспечивает снижения индуцированного S. aureus апоптоза in vitro. Напротив, ингибирование каспаз 3, 8 или 9 приводило к значительно более низким процентным долям аннексин V+ ВМDМ и нейтрофилов по сравнению с таковым при отсутствии обработки (Р<0,05), но ни один из этих вариантов полностью не воспроизводил низкие процентные доли аннексин V⁺ BMDM и нейтрофилов, индуцированные с помощью Q-VD-ОРН или эмрикасана (<3% для обоих). Поскольку все из каспаз 3, 7, 8 и 9 вносят свой вклад в апоптоз (30), авторы настоящего изобретения предположили, что низкие процентные доли аннексин V+ клеток, индуцированные с помощью Q-VD-OPH или эмрикасана, могут быть связаны с комбинированным ингибированием каспаз 3, 7, 8 и 9 (30). Хотя для каспазы 7 не существует специфического ингибитора, ингибиторы каспаз 3, 8 и 9 были объединены в культурах, что привело к еще более низким процентным долям как аннексин V^+ BMDM (2-4%), так и нейтрофилов (~10%), что очень близко к содержанию аннексин V⁺ BMDM и нейтрофилов <3%, наблюдаемому при обработке с помощью Q-VD-OPH или эмрикасана.

Что касается TNF⁺ BMDM и нейтрофилов, ингибирование каспаз 1 или 8 приводило к значительно более низким процентным долям TNF⁺ BMDM и нейтрофилов по сравнению с отсутствием обработки (1,29-1,6%, Р<0,05% для обоих) (ФИГ. 17С, 17D и ФИГ. 17G, 17H). Ингибирование каспаз 3, 9 или 11 приводило к тому, что процентные доли TNF ВМDМ и нейтрофилов значимо не отличалось от таковых при отсутствии обработки. Учитывая, что ни один из отдельных ингибиторов каспаз не воспроизводил значительно более высокую индукцию TNF+ BMDM и нейтрофилов, индуцированную обработкой с помощью Q-VD-OPH (33,53% и 25,47% соответственно), авторы настоящего изобретения предположили, что высокие процентные доли TNF⁺ BMDM и нейтрофилов, индуцированные с помощью Q-VD-OPH, могут быть обусловлены комбинированной активностью провоспалительных каспаз, задействованных в выработке TNF. Эти каспазы включают каспазы 1 и 11 (которые опосредуют Nlrp3/ASC/гасдермин D-зависимый пироптоз (39) и каспазу-8 (которая усиливает активацию Nlrp3, расщепляет гасдермин D (40) и опосредует ТNF-индуцированный некроптоз (38). Поэтому ингибиторы каспаз 1, 8 и 11 были объединены в культурах, что привело к значительно более высоким процентным долям TNF⁺ BMDM (23,82%, P<0,05) и TNF⁺ нейтрофилов (13,49%), что близко к 33,53% TNF⁺ BMDM и 25,47% TNF⁺ нейтрофилов, наблюдаемых при обработке с помощью Q-VD-OPH или эмрикасана. Кроме того, аналогично тому, как это наблюдалось при инфекции кожи, обусловленной S. aureus, in vivo, уровень некроптоза увеличивался в BMDM и нейтрофилах, которые обрабатывали с помощью Q-VD-OPH, что анализировали с помощью вестерн-блот-анализа в отношении рМLKL и MLKL в ВМDМ и нейтрофилах (ФИГ. 20А, 20В).

В совокупности эти данные in vitro показывают, что активность Q-VD-OPH в

ингибировании апоптоза BMDM и нейтрофилов была обусловлена комбинированным ингибированием каспаз 3, 8 и 9, тогда как активность Q-VD-OPH в индукции TNF⁺ BMDM и нейтрофилов происходила за счет комбинированного ингибирования воспалительных каспаз 1, 8 и 11. Эти данные дают механистическое представление о том, как Q-VD-OPH способствует ингибированию апоптоза нейтрофилов и моноцитов (ФИГ. 5) и повышению выработки TNF моноцитами, макрофагами и нейтрофилами (ФИГ. 6) в ходе инфекции кожи, обусловленной S. aureus, in vivo.

Обработка с помощью Q-VD-OPH также эффективна против инфекций кожи, обусловленных S. pyogenes и P. aeruginosa, у мышей. Чтобы определить, является ли Q-**VD-OPH** отличным ОТ антибиотического опосредованным хозяином иммунотерапевтическим средством против других кожных патогенов, авторы настоящего изобретения оценивали его эффективность в отношении Streptococcus pyogenes (S. pyogenes) и Pseudomonas aeruginosa (P. aeruginosa), которые также являются частыми причинами бактериальных инфекций кожи у человека (4). Во-первых, модель і. d. инфекции кожи, обусловленной S. pyogenes, на мышах, осуществляли с применением биолюминесцентного штамма S. pyogenes (Xen20 (41)), вводимого в спины мышей WT C57BL/6, и через 4 часа вводили однократную дозу обработки с помощью Q-VD-OPH или обработку не осуществляли (необработанные), а затем измеряли размеры поражений и BLI in vivo, как показано на ФИГ. 1A-1D (ФИГ. 7A-7D). Обработка с помощью Q-VD-OPH приводила к значительному уменьшению размеров поражений кожи (ФИГ. 7А, 7С) и быстрому снижению бактериальной нагрузки по сравнению с необработанными мышами (ФИГ. 7B, 7D).

Bo-вторых, осуществляли модель инфекции кожи, обусловленной P. aeruginosa, на мышах посредством і. d. инокуляции биолюминесцентного штамма P. aeruginosa (Xen41(42)) в спины мышей WT C57BL/6 и обработку с помощью Q-VD-OPH осуществляли через 4 часа или обработку не осуществляли (необработанные), а затем измеряли размеры поражений и BLI in vivo как на ФИГ. 7A-7D (ФИГ. 8A-8D). Обработка с помощью Q-VD-OPH приводила к умеренному, но значительному уменьшению размеров поражений кожи (ФИГ. 8А, 8С) и бактериальной нагрузки по сравнению с необработанными мышами (ФИГ. 8В, 8D). Однако в этой модели инфекции кожи, обусловленной Р. aeruginosa, бактериальная инфекция распространилась, как это наблюдалось в других изначально локализованных моделях инфекции с использованием Хеп41(42), что привело к гибели 40% необработанных мышей. Примечательно, что ни одна из мышей, обработанных с помощью Q-VD-OPH, не погибла в результате инфекции (ФИГ. 8E). В совокупности обработка с помощью Q-VD-OPH характеризовалась аналогичной эффективностью в отношении другой инфекции кожи, обусловленной грамположительной бактерией S. pyogenes, а также характеризовалась терапевтической эффективностью и предупреждала смертность от инфекции кожи, обусловленной грамотрицательной бактерией P. aeruginosa. Аналогично таковой в случае S. aureus, эффективность in vivoQ-VD-OPH в отношении инфекций кожи, обусловленных S.

руоденея и Р. aeruginosa, не была обусловлена влиянием на рост бактерий, поскольку инкубирование бульонных культур S. pyogenes (ФИГ. 21A, 21B) или Р. aeruginosa (ФИГ. 21C, 21D) с логарифмическими концентрациями Q-VD-OPH (т. е. 10, 100 и 1000 мкг/мл) не приводило к различиям в абсорбции и биолюминесценции in vitro по сравнению с культурами, инкубированными только со средой-носителем. В совокупности эти результаты указывают на возможный широкий спектр терапевтической активности панкаспазного ингибирования в отношении множества различных типов бактериальных инфекций кожи и инновационный подход к его применению.

Обсуждение

Иммунные механизмы, защищающие от инфекций, обусловленных S. aureus, оставались невыясненными, что препятствовало разработке эффективной иммунотерапии или вакцины против этого важного патогена человека, который становится все более устойчивым к антибиотикам (5). Целью авторов настоящего изобретения являлось определение того, может ли потенциальное ингибирование путей гибели клеток (т. е. пироптоза, апоптоза и некроптоза) с помощью системно вводимого пан-каспазного ингибитора Q-VD-OPH (17, 18) способствовать защите хозяина от инфекции кожи, обусловленной CA-MRSA, в модели на мышах. Однократная доза Q-VD-ОРН не влияла на уровень пироптоза, а скорее обеспечивала снижение уровня апоптоза в нейтрофилах и моноцитах и повышала уровень некроптоза в макрофагах. Это приводило к усилению выработки TNF, что приводило к быстрому клиренсу бактерий в отсутствие антибиотиков. Сниженный уровень апоптоза может быть воспроизведен путем комбинированного ингибирования каспаз 3, 8 и 9 in vitro, в то время как повышенная выработка TNF может быть воспроизведена путем комбинированного ингибирования каспаз 1, 8 и 11 in vitro, обеспечивая понимание механизмов обеспечения эффективности Q-VD-OPH in vivo. Однако известно, что используемые ингибиторы каспаз обладают более широким спектром ингибирующих эффектов (43), и, учитывая многосоставность каспаз в управлении путями гибели клеток (44), необходимы дальнейшие исследования для полного понимания индивидуального вклада каспаз, вовлеченных в защиту хозяина от инфекций кожи, обусловленных CA-MRSA. Тем не менее, полученные авторами изобретения результаты обеспечивают настоящего доказательство концепции направленного пан-каспазного ингибирования в качестве отличной от антибиотической терапии, направленной на хозяина, против инфекций кожи, обусловленных CA-MRSA, и, возможно, других грамположительных и грамотрицательных бактериальных патогенов, как это наблюдалось в исследовании на моделях инфекции кожи, обусловленной S. pyogenes и P. aeruginosa. В соответствии с этой возможностью, эмрикасан, другой панкаспазный ингибитор, который индуцирует некроптоз путем ингибирования каспазы-8 (45), характеризовался эффективностью, аналогичной Q-VD-OPH. Важно отметить, что ответы, обусловленные пан-каспазным ингибированием, позволили выявить несколько новых идей относительно роли защитных и отличных от защитных механизмов клеточной гибели нейтрофилов, моноцитов и макрофагов, а также ответов TNF в защите хозяина

против обусловленных CA-MRSA инфекций кожи.

Во-первых, Q-VD-OPH характеризовался эффективностью в отношении инфекции кожи, обусловленной CA-MRSA, механизм которой не зависел от IL-1β, воспалительной реакции NLRP3/ASC и пироптоза, индуцированного гасдермином D (ФИГ. 1-4). Этот результат был неожиданным, поскольку IL-1β, инфламмасома NLRP3/ASC, а также активность каспазы-1 опосредуют защиту хозяина, рекрутирование нейтрофилов и клиренс бактерий в многочисленных моделях инфекций, обусловленных S. aureus, на мышах (например, инфекция кожи, абсцессы головного мозга и сепсис) (9, 25, 26, 28). Более того, порообразующие токсины S. aureus, такие как α-токсин, PVL и LukAB, индуцируют активацию моноцитов/макрофагов человека и мыши in vitro (6-8). Тем не менее, Q-VD-OPH показал заметную эффективность с уменьшением размеров поражений и бактериальной нагрузки у мышей с дефицитом IL-1β, ASC, каспазы-1, каспазы-11, обеих каспаз 1 и 11 и гасдермина D. Эта осуществленная эффективность Q-VD-OPH возникала даже при более крупных поражениях кожи и более высокой бактериальной нагрузке у мышей с дефицитом IL-1β, ASC и гасдермина D. Поскольку эффективность Q-VD-OPH не была обусловлена ІІ-1 вили инфламмасомо-опосредованным пироптозом, это побудило авторов настоящего изобретения оценить альтернативные механизмы защиты хозяина, которые способствовали эффективности.

Во-вторых, было обнаружено, что в обеспечение эффективности Q-VD-OPH в отношении инфекции кожи, обусловленной CA-MRSA, вовлечено снижение уровня апоптоза моноцитов и нейтрофилов, но не макрофагов. Q-VD-OPH характеризуется известными антиапоптотическими эффектами, вероятно, из-за ингибирования каспаз 3, 7, 8 и 9, вовлеченных в апоптоз (30). Действительно, комбинированное ингибирование каспаз 3, 8 и 9 обеспечивало снижение процентных долей апоптотических (аннексин V⁺) BMDM и нейтрофилов в степени, аналогичной таковой в случае Q-VD-OPH in vitro, что объясняет снижение содержания апоптотических моноцитов и нейтрофилов в ходе инфекции кожи, обусловленной CA-MRSA, in vivo. Примечательно, что Q-VD-OPH оценивали в качестве терапевтического средства, обеспечивающего снижение уровня опосредованной апоптозом гибели клеток в неинфекционных условиях на доклинических моделях вирусной инфекции и повреждения in vivo и in vitro (17-22). В частности, в модели инфекции, обусловленной вирусом иммунодефицита обезьян (SIV), у макакрезусов, обработка с помощью Q-VD-OPH способствовала клиренсу вируса, что было ассоциировано со снижением уровня гибели Т-клеток (20), аналогично снижению уровня апоптоза нейтрофилов и моноцитов в модели инфекции кожи, обусловленной CA-MRSA. Что касается бактерий, было показано, что Q-VD-OPH обеспечивает снижение уровня апоптоза эпителиальных клеток кишечника, ассоциированного с нарушением барьера в ответ на заражение с помощью Campylobacter jejuni, но не энтеропатогенной Escherichia coli in vitro (46, 47), и клеток сетчатки в ответ на заражение с помощью S. aureus in vivo и in vitro (33). Однако во всех этих исследованиях не изучалась роль Q-VD-OPH в обеспечении клиренса бактерий. Таким образом, результаты настоящего исследования

выявили ранее неизвестный терапевтический эффект Q-VD-OPH в защите хозяина от инфекций кожи, обусловленных S. aureus, S. pyogenes и P. aeruginosa. Потенциальным объяснением широкого спектра активности Q-VD-OPH в отношении этих различных видов бактерий является то, что все они являются прототипами пиогенных бактериальных инфекций, при которых требуется эффективный ответ со стороны нейтрофилов и моноцитов/макрофагов в абсцессе, чтобы отгородить инфекцию и способствовать клиренсу бактерий (9, 25, 26).

Q-VD-OPH В-третьих, эффективность в отношении инфекции кожи, обусловленной CA-MRSA, приводила к усилению некроптоза макрофагов (pMLKL⁺), что свидетельствует о сохранении выживаемости нейтрофилов и моноцитов (т. е. меньшем уровне некроптоза) по сравнению с макрофагами. Предыдущие исследования также показали, что нейтрофилы и моноциты/макрофаги человека и мыши также подвергаются некроптозу в ответ на заражение с помощью S. aureus in vitro (16, 35, 37). Однако в настоящем исследовании во всех этих типах миелоидных клеток наблюдалась повышенная выработка TNF, и Q-VD-OPH больше не оказывал терапевтического действия на клиренс бактерий у TNF^{-/-} мышей, TNF/IL-1R^{-/-} мышей и мышей WT, которым вводили mAb к αTNF (по сравнению с необработанными мышами). Таким образом, способность Q-VD-OPH обеспечивать усиление выработки TNF и ответов была важна для обеспечения его эффективности. Интересно, что, хотя уровень апоптоза нейтрофилов был снижен, у TNF-- мышей, обработанных с помощью Q-VD-OPH, наблюдался меньший приток нейтрофилов в инфицированную кожу. Кроме того, уровень некроптоза был снижен у TNF-/- мышей и TNF-/- мышей, обработанных с помощью Q-VD-OPH, по сравнению с мышами WT, что свидетельствует о существенной роли TNF в индуцировании некроптоза и притоке нейтрофилов. Примечательно, что эффект TNF в отношении снижения бактериальной нагрузки обеспечивался без уменьшения размеров поражений кожи, в отличие от результатов, полученных при использовании с Q-VD-OPH (который обеспечивал уменьшение и того, и другого). Хотя причина этого неясна, Q-VD-OPH, но не TNF, мог обеспечивать предупреждение обусловленной инфекцией клеточной гибели кератиноцитов, что обеспечивало сохранение эпидермиса, приводя к уменьшению размеров поражений кожи. Эта защитная роль Q-VD-OPH в отношении эпидермальных кератиноцитов будет в центре внимания будущих исследований авторов настоящего изобретения.

Защитная роль TNF во время инфекции, обусловленной S. aureus, становится все более актуальной, поскольку было показано, что ответы TNF индуцируются и оказывают защитное действие в моделях на мышах для инфекций кожи, абсцессов головного мозга, сепсиса и септического артрита, обусловленных S. aureus (25, 26, 28, 48). Важно отметить, что комбинированное ингибирование каспаз 1, 8 и 11 обеспечивало повышение процентных долей TNF⁺ BMDM и нейтрофилов в степени, аналогичной таковой для Q-VD-OPH in vitro, обеспечивая механистическое объяснение увеличения содержания моноцитов, макрофагов и нейтрофилов, вырабатывающих TNF, в ходе инфекции кожи,

обусловленной S. aureus, in vivo. Следует отметить, что результаты с Q-VD-OPH не исключают результатов исследований инфекции кожи, обусловленной CA-MRSA, и моделей сепсиса, выполненных в контексте ингибирования некроптоза (например, мыши с делецией MLKL или RIP3K или мыши, обработанные ингибиторами RIPK1 или RIPK3), которые показали в результате высокую бактериальную нагрузку и усиленное воспаление (в том числе выработка IL-1 β) (15). Аналогично, в модели пневмонии, обусловленной CA-MRSA, на мышах мыши с делецией MLKL или мыши, обработанные ингибитором RIPK1, имели в результате значительное усиление воспаления легких, которое зависело от порообразующих токсинов S. aureus (α -токсин, LukAB или растворимые в феноле модулины [PSM]) и усиленную выработку IL-1 β (36). Несмотря на то, что Q-VD-OPH не ингибирует некроптоз, эти исследования показывают, что иммунотерапевтические средства, нацеленные на блокирование некроптоза, могут уменьшить бактериальную нагрузку и чрезмерное воспаление с обеспечением терапевтического благоприятного эффекта.

Помимо эффектов Q-VD-OPH в отношении ответа хозяина, O-VD-OPH потенциально может ингибировать механизмы бактериальной вирулентности. В частности, авторы настоящего изобретения оценивали sspP и sspB, вырабатываемые S. aureus, которые инактивируют компоненты врожденного иммунитета, такие как хемокин нейтрофилов CXCR2, модулируют образование биопленок и могут обуславливать апоптозоподобную гибель клеток у нейтрофилов и моноцитов (49-51), а также speB, вырабатываемый S. pyogenes, который играет важную роль во многих механизмах вирулентности (в том числе при инфекциях кожи) и может активировать процессинг про-IL-1β в IL-1 β (52, 53). Авторы настоящего изобретения обнаружили, что Q-VD-OPH не влияет на активность sspP, sspP или speB в отношении активности желатиназы или протеолиза эластина (ФИГ. 22A, 22B). Кроме того, Q-VD-OPH не индуцировал какихлибо физических конформационных изменений и не обуславливал разрушения sspP, sspB или speB (ФИГ. 22C-22E). Возможно, что Q-VD-OPH может влиять и на другие бактериальные факторы вирулентности, но всестороннее исследование каждого бактериального механизма выходит за рамки данного исследования. Тем не менее, гораздо более вероятно, что эффекты Q-VD-OPH были связаны с ответом хозяина, что подтверждается обнаружением отсутствия эффективности Q-VD-OPH у TNF^{-/-} мышей, $TNF/IL-1R^{-1}$ мышей и у мышей WT, обработанных антителом к TNF.

Существуют некоторые ограничения. Во-первых, эффективность Q-VD-OPH оценивали в моделях инфекции, обусловленной CA-MRSA, S. pyogenes и P. aeruginosa, на мышах и для проверки этих результатов необходимы исследования в моделях на более крупных животных и людях. Это особенно важно, поскольку некоторые цитолитические токсины, вовлеченные в инфекциях человека, обусловленных S. aureus (таких как PVL), в моделях на мышах характеризуются меньшей степенью вовлеченности (5). Во-вторых, несмотря на то, что механизм Q-VD-OPH дополнительно оценивали в отношении инфекции кожи, обусловленной CA-MRSA, неясно, были ли вовлечены аналогичные

механизмы в других анатомических участках инфекции, обусловленной S. aureus и CA-MRSA (таких как при сепсисе или пневмонии), и в механизмах осуществления эффективности Q-VD-OPH в отношении S. pyogenes, P. aeruginosa и других бактериальных патогенов. Эти дополнительные эксперименты будут предметом будущих исследований авторов настоящего изобретения. Каспазы и особенно каспаза-8 важны для пролиферации и функционирования Т- и В-клеток (54, 55). Хотя в этом отчете авторы настоящего изобретения сосредоточились на влиянии Q-VD-OPH на врожденные ответы нейтрофилов и моноцитов/макрофагов, они планируют оценить потенциальное влияние Q-VD-OPH на такие адаптивные ответы иммунных клеток в их будущей работе. Наконец, Q-VD-OPH характеризуется широким спектром эффективности в отношении нескольких каспаз, и хотя авторы настоящего изобретения определили, что в обеспечение его эффективности, вероятно, вовлечено ингибирование каспаз 3, 8 и 9, вовлеченных в апоптозе (30), и каспаз 1, 8 и 11, вовлеченных в выработке TNF (38), возможно, более специфические ингибиторы каспаз, чем Q-VD-OPH, могут иметь аналогичный терапевтический эффект, обеспечивая возможность более целенаправленной терапии.

В заключение, пан-каспазное ингибирование представляет собой потенциальную направленную на хозяина иммунотерапию против инфекций кожи, обусловленных CA-MRSA, S. pyogenes и P. aeruginosa, основной механизм действия которой включает ингибирование апоптоза, что способствует выживанию нейтрофилов и моноцитов, а также усиливает TNF-опосредованные защитные ответы хозяина. В условиях растущей эпидемии устойчивых к антибиотикам бактериальных инфекций, которая распространяется среди населения всего мира, пан-каспазное ингибирование может представлять собой ценный альтернативный подход без антибиотиков для лечения таких все более распространенных и часто тяжелых инфекций.

Ссылки на литературные источники

- 1. D. M. P. De Oliveira, B. M. Forde, T. J. Kidd, P. N. A. Harris, M. A. Schembri, S. A. Beatson, D. L. Paterson, M. J. Walker, Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. Clinical microbiology reviews 33, (2020).
- 2. C. Y. Chiang, I. Uzoma, R. T. Moore, M. Gilbert, A. J. Duplantier, R. G. Panchal, Mitigating the Impact of Antibacterial Drug Resistance through Host-Directed Therapies: Current Progress, Outlook, and Challenges. mBio 9, (2018).
- 3. S. Y. Tong, J. S. Davis, E. Eichenberger, T. L. Holland, V. G. Fowler, Jr., Staphylococcus aureus infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. Clinical microbiology reviews 28, 603-661 (2015).
- 4. K. S. Kaye, L. A. Petty, A. F. Shorr, M. D. Zilberberg, Current Epidemiology, Etiology, and Burden of Acute Skin Infections in the United States. Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America 68, S193-S199 (2019).
- 5. L. S. Miller, V. G. Fowler, S. K. Shukla, W. E. Rose, R. A. Proctor, Development of a vaccine against Staphylococcus aureus invasive infections: Evidence based on human immunity, genetics and bacterial evasion mechanisms. FEMS microbiology reviews 44, 123-153 (2020).

- 6. E. A. Ezekwe, Jr., C. Weng, J. A. Duncan, ADAM10 Cell Surface Expression but Not Activity Is Critical for Staphylococcus aureus alpha-Hemolysin-Mediated Activation of the NLRP3 Inflammasome in Human Monocytes. Toxins 8, 95 (2016).
- 7. D. Holzinger, L. Gieldon, V. Mysore, N. Nippe, D. J. Taxman, J. A. Duncan, P. M. Broglie, K. Marketon, J. Austermann, T. Vogl, D. Foell, S. Niemann, G. Peters, J. Roth, B. Loffler, Staphylococcus aureus Panton-Valentine leukocidin induces an inflammatory response in human phagocytes via the NLRP3 inflammasome. Journal of leukocyte biology 92, 1069-1081 (2012).
- 8. J. H. Melehani, D. B. James, A. L. DuMont, V. J. Torres, J. A. Duncan, Staphylococcus aureus Leukocidin A/B (LukAB) Kills Human Monocytes via Host NLRP3 and ASC when Extracellular, but Not Intracellular. PLoS pathogens 11, e1004970 (2015).
- 9. J. S. Cho, Y. Guo, R. I. Ramos, F. Hebroni, S. B. Plaisier, C. Xuan, J. L. Granick, H. Matsushima, A. Takashima, Y. Iwakura, A. L. Cheung, G. Cheng, D. J. Lee, S. I. Simon, L. S. Miller, Neutrophil-derived IL-1beta is sufficient for abscess formation in immunity against Staphylococcus aureus in mice. PLoS pathogens 8, e1003047 (2012).
- 10. C. Kebaier, R. R. Chamberland, I. C. Allen, X. Gao, P. M. Broglie, J. D. Hall, C. Jania, C. M. Doerschuk, S. L. Tilley, J. A. Duncan, Staphylococcus aureus alpha-hemolysin mediates virulence in a murine model of severe pneumonia through activation of the NLRP3 inflammasome. The Journal of infectious diseases 205, 807-817 (2012).
- 11. X. Wang, W. J. Eagen, J. C. Lee, Orchestration of human macrophage NLRP3 inflammasome activation by Staphylococcus aureus extracellular vesicles. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 117, 3174-3184 (2020).
- 12. C. Y. Chi, C. C. Lin, I. C. Liao, Y. C. Yao, F. C. Shen, C. C. Liu, C. F. Lin, Panton-Valentine leukocidin facilitates the escape of Staphylococcus aureus from human keratinocyte endosomes and induces apoptosis. The Journal of infectious diseases 209, 224-235 (2014).
- 13. A. L. Genestier, M. C. Michallet, G. Prevost, G. Bellot, L. Chalabreysse, S. Peyrol, F. Thivolet, J. Etienne, G. Lina, F. M. Vallette, F. Vandenesch, L. Genestier, Staphylococcus aureus Panton-Valentine leukocidin directly targets mitochondria and induces Bax-independent apoptosis of human neutrophils. The Journal of clinical investigation 115, 3117-3127 (2005).
- 14. V. Winstel, O. Schneewind, D. Missiakas, Staphylococcus aureus Exploits the Host Apoptotic Pathway To Persist during Infection. mBio 10, (2019).
- 15. K. Kitur, S. Wachtel, A. Brown, M. Wickersham, F. Paulino, H. F. Penaloza, G. Soong, S. Bueno, D. Parker, A. Prince, Necroptosis Promotes Staphylococcus aureus Clearance by Inhibiting Excessive Inflammatory Signaling. Cell reports 16, 2219-2230 (2016).
- 16. T. Wong Fok Lung, I. R. Monk, K. P. Acker, A. Mu, N. Wang, S. A. Riquelme, S. Pires, L. P. Noguera, F. Dach, S. J. Gabryszewski, B. P. Howden, A. Prince, Staphylococcus aureus small colony variants impair host immunity by activating host cell glycolysis and inducing necroptosis. Nature microbiology 5, 141-153 (2020).
- 17. T. M. Caserta, A. N. Smith, A. D. Gultice, M. A. Reedy, T. L. Brown, Q-VD-OPh, a broad spectrum caspase inhibitor with potent antiapoptotic properties. Apoptosis: an

- international journal on programmed cell death 8, 345-352 (2003).
- 18. C. L. Keoni, T. L. Brown, Inhibition of Apoptosis and Efficacy of Pan Caspase Inhibitor, Q-VD-OPh, in Models of Human Disease. Journal of cell death 8, 1-7 (2015).
- 19. J. S. Braun, K. Prass, U. Dirnagl, A. Meisel, C. Meisel, Protection from brain damage and bacterial infection in murine stroke by the novel caspase-inhibitor Q-VD-OPH. Experimental neurology 206, 183-191 (2007).
- 20. M. Laforge, R. Silvestre, V. Rodrigues, J. Garibal, L. Campillo-Gimenez, S. Mouhamad, V. Monceaux, M. C. Cumont, H. Rabezanahary, A. Pruvost, A. Cordeiro-da-Silva, B. Hurtrel, G. Silvestri, A. Senik, J. Estaquier, The anti-caspase inhibitor Q-VD-OPH prevents AIDS disease progression in SIV-infected rhesus macaques. The Journal of clinical investigation 128, 1627-1640 (2018).
- 21. E. J. Lim, K. El Khobar, R. Chin, L. Earnest-Silveira, P. W. Angus, C. T. Bock, U. Nachbur, J. Silke, J. Torresi, Hepatitis C virus-induced hepatocyte cell death and protection by inhibition of apoptosis. The Journal of general virology 95, 2204-2215 (2014).
- 22. X. Teng, W. Chen, Z. Liu, T. Feng, H. Li, S. Ding, Y. Chen, Y. Zhang, X. Tang, D. Geng, NLRP3 Inflammasome Is Involved in Q-VD-OPH Induced Necroptosis Following Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury. Neurochemical research 43, 1200-1209 (2018).
- 23. S. S. Burgener, N. G. F. Leborgne, S. J. Snipas, G. S. Salvesen, P. I. Bird, C. Benarafa, Cathepsin G Inhibition by Serpinb1 and Serpinb6 Prevents Programmed Necrosis in Neutrophils and Monocytes and Reduces GSDMD-Driven Inflammation. Cell reports 27, 3646-3656 e3645 (2019).
- 24. D. W. Lee, S. Faubel, C. L. Edelstein, A pan caspase inhibitor decreases caspase-1, IL-1alpha and IL-1beta, and protects against necrosis of cisplatin-treated freshly isolated proximal tubules. Renal failure 37, 144-150 (2015).
- 25. C. A. Dillen, B. L. Pinsker, A. I. Marusina, A. A. Merleev, O. N. Farber, H. Liu, N. K. Archer, D. B. Lee, Y. Wang, R. V. Ortines, S. K. Lee, M. C. Marchitto, S. S. Cai, A. G. Ashbaugh, L. S. May, S. M. Holland, A. F. Freeman, L. G. Miller, M. R. Yeaman, S. I. Simon, J. D. Milner, E. Maverakis, L. S. Miller, Clonally expanded gammadelta T cells protect against Staphylococcus aureus skin reinfection. The Journal of clinical investigation 128, 1026-1042 (2018).
- 26. M. C. Marchitto, C. A. Dillen, H. Liu, R. J. Miller, N. K. Archer, R. V. Ortines, M. P. Alphonse, A. I. Marusina, A. A. Merleev, Y. Wang, B. L. Pinsker, A. S. Byrd, I. D. Brown, A. Ravipati, E. Zhang, S. S. Cai, N. Limjunyawong, X. Dong, M. R. Yeaman, S. I. Simon, W. Shen, S. K. Durum, R. L. O'Brien, E. Maverakis, L. S. Miller, Clonal Vgamma6(+)Vdelta4(+) T cells promote IL-17-mediated immunity against Staphylococcus aureus skin infection. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 116, 10917-10926 (2019).
- 27. Y. Guo, R. I. Ramos, J. S. Cho, N. P. Donegan, A. L. Cheung, L. S. Miller, In vivo bioluminescence imaging to evaluate systemic and topical antibiotics against community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus-infected skin wounds in mice. Antimicrobial agents and chemotherapy 57, 855-863 (2013).

- 28. T. Kielian, E. D. Bearden, A. C. Baldwin, N. Esen, IL-1 and TNF-alpha play a pivotal role in the host immune response in a mouse model of Staphylococcus aureus-induced experimental brain abscess. Journal of neuropathology and experimental neurology 63, 381-396 (2004).
- 29. F. Hoss, V. Rolfes, M. R. Davanso, T. T. Braga, B. S. Franklin, Detection of ASC Speck Formation by Flow Cytometry and Chemical Cross-linking. Methods in molecular biology 1714, 149-165 (2018).
- 30. I. Jorgensen, M. Rayamajhi, E. A. Miao, Programmed cell death as a defence against infection. Nature reviews. Immunology 17, 151-164 (2017).
- 31. J. Knop, F. Hanses, T. Leist, N. M. Archin, S. Buchholz, J. Glasner, A. Gessner, A. K. Wege, Staphylococcus aureus Infection in Humanized Mice: A New Model to Study Pathogenicity Associated With Human Immune Response. The Journal of infectious diseases 212, 435-444 (2015).
- 32. S. D. Kobayashi, K. R. Braughton, A. M. Palazzolo-Ballance, A. D. Kennedy, E. Sampaio, E. Kristosturyan, A. R. Whitney, D. E. Sturdevant, D. W. Dorward, S. M. Holland, B. N. Kreiswirth, J. M. Musser, F. R. DeLeo, Rapid neutrophil destruction following phagocytosis of Staphylococcus aureus. Journal of innate immunity 2, 560-575 (2010).
- 33. P. K. Singh, A. Kumar, Mitochondria mediates caspase-dependent and independent retinal cell death in Staphylococcus aureus endophthalmitis. Cell death discovery 2, 16034 (2016).
- 34. J. H. Wang, Y. J. Zhou, P. He, Staphylococcus aureus induces apoptosis of human monocytic U937 cells via NF-kappaB signaling pathways. Microbial pathogenesis 49, 252-259 (2010).
- 35. M. C. Greenlee-Wacker, K. M. Rigby, S. D. Kobayashi, A. R. Porter, F. R. DeLeo, W. M. Nauseef, Phagocytosis of Staphylococcus aureus by human neutrophils prevents macrophage efferocytosis and induces programmed necrosis. Journal of immunology 192, 4709-4717 (2014).
- 36. K. Kitur, D. Parker, P. Nieto, D. S. Ahn, T. S. Cohen, S. Chung, S. Wachtel, S. Bueno, A. Prince, Toxin-induced necroptosis is a major mechanism of Staphylococcus aureus lung damage. PLoS pathogens 11, e1004820 (2015).
- 37. Y. Zhou, C. Niu, B. Ma, X. Xue, Z. Li, Z. Chen, F. Li, S. Zhou, X. Luo, Z. Hou, Inhibiting PSMalpha-induced neutrophil necroptosis protects mice with MRSA pneumonia by blocking the agr system. Cell death & disease 9, 362 (2018).
- 38. M. Fritsch, S. D. Gunther, R. Schwarzer, M. C. Albert, F. Schorn, J. P. Werthenbach, L. M. Schiffmann, N. Stair, H. Stocks, J. M. Seeger, M. Lamkanfi, M. Kronke, M. Pasparakis, H. Kashkar, Caspase-8 is the molecular switch for apoptosis, necroptosis and pyroptosis. Nature 575, 683-687 (2019).
- 39. R. K. S. Malireddi, P. Gurung, S. Kesavardhana, P. Samir, A. Burton, H. Mummareddy, P. Vogel, S. Pelletier, S. Burgula, T. D. Kanneganti, Innate immune priming in the absence of TAK1 drives RIPK1 kinase activity-independent pyroptosis, apoptosis,

- necroptosis, and inflammatory disease. The Journal of experimental medicine 217, (2020).
- 40. P. Orning, D. Weng, K. Starheim, D. Ratner, Z. Best, B. Lee, A. Brooks, S. Xia, H. Wu, M. A. Kelliher, S. B. Berger, P. J. Gough, J. Bertin, M. M. Proulx, J. D. Goguen, N. Kayagaki, K. A. Fitzgerald, E. Lien, Pathogen blockade of TAK1 triggers caspase-8-dependent cleavage of gasdermin D and cell death. Science 362, 1064-1069 (2018).
- 41. R. W. t. Davis, H. Eggleston, F. Johnson, M. Nahrendorf, P. E. Bock, T. Peterson, P. Panizzi, In Vivo Tracking of Streptococcal Infections of Subcutaneous Origin in a Murine Model. Molecular imaging and biology 17, 793-801 (2015).
- 42. J. M. Thompson, R. J. Miller, A. G. Ashbaugh, C. A. Dillen, J. E. Pickett, Y. Wang, R. V. Ortines, R. S. Sterling, K. P. Francis, N. M. Bernthal, T. S. Cohen, C. Tkaczyk, L. Yu, C. K. Stover, A. DiGiandomenico, B. R. Sellman, D. L. Thorek, L. S. Miller, Mouse model of Gram-negative prosthetic joint infection reveals therapeutic targets. JCI insight 3, (2018).
- 43. G. P. McStay, G. S. Salvesen, D. R. Green, Overlapping cleavage motif selectivity of caspases: implications for analysis of apoptotic pathways. Cell death and differentiation 15, 322-331 (2008).
- 44. M. Doerflinger, Y. Deng, P. Whitney, R. Salvamoser, S. Engel, A. J. Kueh, L. Tai, A. Bachem, E. Gressier, N. D. Geoghegan, S. Wilcox, K. L. Rogers, A. L. Garnham, M. A. Dengler, S. M. Bader, G. Ebert, J. S. Pearson, D. De Nardo, N. Wang, C. Yang, M. Pereira, C. E. Bryant, R. A. Strugnell, J. E. Vince, M. Pellegrini, A. Strasser, S. Bedoui, M. J. Herold, Flexible Usage and Interconnectivity of Diverse Cell Death Pathways Protect against Intracellular Infection. Immunity 53, 533-547 e537 (2020).
- 45. G. Brumatti, C. Ma, N. Lalaoui, N. Y. Nguyen, M. Navarro, M. C. Tanzer, J. Richmond, M. Ghisi, J. M. Salmon, N. Silke, G. Pomilio, S. P. Glaser, E. de Valle, R. Gugasyan, M. A. Gurthridge, S. M. Condon, R. W. Johnstone, R. Lock, G. Salvesen, A. Wei, D. L. Vaux, P. G. Ekert, J. Silke, The caspase-8 inhibitor emricasan combines with the SMAC mimetic birinapant to induce necroptosis and treat acute myeloid leukemia. Science translational medicine 8, 339ra369 (2016).
- 46. V. K. Viswanathan, A. Weflen, A. Koutsouris, J. L. Roxas, G. Hecht, Enteropathogenic E. coli-induced barrier function alteration is not a consequence of host cell apoptosis. American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology 294, G1165-1170 (2008).
- 47. E. Butkevych, F. D. Lobo de Sa, P. K. Nattramilarasu, R. Bucker, Contribution of Epithelial Apoptosis and Subepithelial Immune Responses in Campylobacter jejuni-Induced Barrier Disruption. Frontiers in microbiology 11, 344 (2020).
- 48. O. Hultgren, H. P. Eugster, J. D. Sedgwick, H. Korner, A. Tarkowski, TNF/lymphotoxin-alpha double-mutant mice resist septic arthritis but display increased mortality in response to Staphylococcus aureus. Journal of immunology 161, 5937-5942 (1998).
- 49. A. J. Laarman, G. Mijnheer, J. M. Mootz, W. J. van Rooijen, M. Ruyken, C. L. Malone, E. C. Heezius, R. Ward, G. Milligan, J. A. van Strijp, C. J. de Haas, A. R. Horswill, K. P. van Kessel, S. H. Rooijakkers, Staphylococcus aureus Staphopain A inhibits CXCR2-

dependent neutrophil activation and chemotaxis. The EMBO journal 31, 3607-3619 (2012).

- 50. J. M. Mootz, C. L. Malone, L. N. Shaw, A. R. Horswill, Staphopains modulate Staphylococcus aureus biofilm integrity. Infection and immunity 81, 3227-3238 (2013).
- 51. J. Smagur, K. Guzik, L. Magiera, M. Bzowska, M. Gruca, I. B. Thogersen, J. J. Enghild, J. Potempa, A new pathway of staphylococcal pathogenesis: apoptosis-like death induced by Staphopain B in human neutrophils and monocytes. Journal of innate immunity 1, 98-108 (2009).
- 52. C. N. LaRock, J. Todd, D. L. LaRock, J. Olson, A. J. O'Donoghue, A. A. Robertson, M. A. Cooper, H. M. Hoffman, V. Nizet, IL-1beta is an innate immune sensor of microbial proteolysis. Science immunology 1, (2016).
- 53. M. Saouda, W. Wu, P. Conran, M. D. Boyle, Streptococcal pyrogenic exotoxin B enhances tissue damage initiated by other Streptococcus pyogenes products. The Journal of infectious diseases 184, 723-731 (2001).
- 54. J. D. Graves, A. Craxton, E. A. Clark, Modulation and function of caspase pathways in B lymphocytes. Immunological reviews 197, 129-146 (2004).
- 55. S. Lakhani, R. A. Flavell, Caspases and T lymphocytes: a flip of the coin? Immunological reviews 193, 22-30 (2003).

ПРИМЕР 2. Ген РНКазы L, использующейся для защиты от вирусов, действует как репрессор регенерации. Ответы млекопитающих на повреждение характеризуются скорее фиброзом и рубцеванием, чем функциональной регенерацией. Ограниченная способность к регенерации у млекопитающих может отражать потерю программ прорегенерации или активное подавление генами, функционирующими подобно супрессорам опухолей. Чтобы раскрыть программы, управляющие регенерацией у млекопитающих, авторы настоящего изобретения провели всесторонний скрининг транскриптов у субъектов-людей после лечения с помощью лазерного омоложения и сопоставили эти транскрипты с транскриптами, обнаруженными у мышей с усиленным индуцированным раной de novo образованием волос (WIHN), редким примером органогенеза млекопитающих 1,2. Авторы настоящего изобретения обнаружили, что противовирусная эндорибонуклеаза РНКаза L является мощным суппрессором регенерации. У RNasel^{-/-} мышей видна заметная регенеративная способность с повышенным WIHN за счет возросшего уровня IL-36а. В соответствии с известной ролью РНКазы L в стимуляции каспазы-1 авторы настоящего изобретения обнаружили, что фармакологическое ингибирование каспаз способствует регенерации новым IL-36-зависимым образом. Кроме того, эти ответы не ограничиваются кожей, а распространяются на другие органы, такие как толстая кишка, что позволяет предположить, что суппрессия регенерации является фундаментальной характеристикой эпителиального заживления ран. В совокупности, эта работа дает возможность предположить, что РНКаза L функционирует как ген-репрессор регенерации в функциональном компромиссе, который отдает приоритет противовирусным способностям хозяина и является целью для улучшения заживления во многих эпителиальных органах, возможно, даже во время вирусной инфекции.

Материалы и способы

Мышиные линии. Все мыши дикого типа и контрольные мыши, использованные для экспериментов in vivo, имели фон C57BL/6J. Все мыши были одного возраста и содержались вместе до 6-недельного возраста. Мыши с нокаутом Rnasel (Rnasel tm1Slvm) 35 из лаборатории Сильвермана (соавтор R.H.S.) ранее подвергались обратному скрещиванию с фоном C57BL/6. Мыши с нокаутом IL36r (Il1rl2^{tm1Hblu}) были приобретены по соглашению о передаче материала между Медицинской школой Университета Джонса Хопкинса и Amgen, Inc. Мыши с двойным нокаутом Rnasel и IL36r получали путем скрещивания обеих линий до тех пор, пока не были получены жизнеспособные гомозиготные мыши. Все используемые трансгенные варианты подвергали генотипированию с подтверждением трансгенного статуса с применением соответствующих праймеров (таблица 1). Все мыши были выведены и размещены в учреждении в соответствии с Американской ассоциацией животными ухода за лабораторными (AAALAC), экспериментальные процедуры были рассмотрены и одобрены Институциональным комитетом по уходу и использованию животных Университета Джона Хопкинса (IACUC).

Анализ индуцированного раной de novo образования волос (WIHN). Все экспериментальные хирургические процедуры in vivo выполняли, как описано ранее в^{1,2,6}-8. Вкратце, после воздействия испаряющей анестезии (Бакстер, Изофлуран) спинную сторону мышей мужского и женского пола в возрасте 3 недель (21 день) выбривали примерно на 8-10 г веса. С помощью хирургических ножниц иссекали приблизительно $1,26 \text{ см}^2 \times 1,25 \text{ см}^2$ кожи с созданием глубоких ран в фасции. Через 3 дня после нанесения раны под место образования струп вводили однократную дозу (50 мкл) 100 мкг/мл высокомолекулярной (HMW) полиинозин-полицитидиловой кислоты (Invivogen, tlrl-pic) путем инъекции мышам дикого типа и трансгенным мышам, как описано ранее в^{2,8}. Для функциональных экспериментов, характеризующих IL-36 в отношении WIHN, однократную дозу (50 мкл) 1 мкг/мл рекомбинантного мышиного белка IL-36α (R&D Systems, 7059-ML/CF) вводили под место образования струпа через 7 дней после нанесения раны. Для экспериментов по восстановлению с применением низкомолекулярного пан-каспазного ингибитора широкого спектра действия, 20 мкл 5 мг/мл Q-VD-OPh (в DMSO) разбавляли в 130 мкл фосфатно-солевого буфера (PBS) (конечная концентрация 1,33 мМ) и вводили внутрибрющинно мышам за 24 часа до нанесения раны и примерно через 10 дней после нанесения раны (отслоение струпа). Примерно через 3 недели после нанесения раны (~21 день) образованные de novo волосяные фолликулы в реэпителизированной ткани кожи количественно оценивали с помощью отражательной конфокальной сканирующей лазерной микроскопии (CSLM), как было показано ранее $B^{2,8}$.

Выделение и культивирование кератиноцитов человека и мыши. Первичные кератиноциты человека выделяли из свежей крайней плоти новорожденных, хранившейся в независимой от CO_2 среде (Gibco, 18045088), как описано ранее в^{2,8}, в соответствии с IRB Университета Джона Хопкинса (NA_0033375, NA_00075350, IRB00028768). После

удаления подкожного жира ткань крайней плоти подвергали ферментативному расщеплению в течение ночи при 4°C в 0,4% растворе диспазы II (Sigma, D4693). После дезагрегации ткани эпидермис инкубировали либо в 0,025% растворе трипсин/EDTA (Lonza, CC-5012) при 37°C, либо в аккутазе (CELLnTEC, CnT-Accutase-100) при комнатной температуре (~23°C). Листы эпидермиса пропускали через клеточный фильтр для получения кератиноцитов, которые культивировали в среде для роста кератиноцитов (KGM-Gold) с добавлением необходимых факторов роста и антибиотиков (Lonza, 192060). Первичные мышиные кератиноциты выделяли из хвостов, как описано выше, с добавлением 10 микромоль ингибитора гhо-киназы (Y-27632, Cayman Chemical, 10005583) в среде KGM-Gold, как показано ранее в³⁶. Все кератиноциты человека и мыши пассировали по меньшей мере один раз перед применением во всех экспериментах in vitro.

Концентрация белка в супернатанте in vitro. Для измерения секретируемых изоформ белка IL-36 супернатант среды из культивируемых мышиных или человеческих кератиноцитов концентрировали с применением центрифужного фильтрующего устройства Amicon Ultra с номинальным пределом молекулярной массы (NMWL), составляющим 3 кДа (MilliporeSigma, UFC200324). Все образцы подвергали концентрированию $\sim 20 \times$ перед использованием для последующих применений (например, для иммуноблоттинга).

Выделение РНК и анализ качества. Общую РНК (в том числе малую некодирующую РНК) из ткани выделяли с применением способа очистки на спин-колонке без фазового разделения на основе TRIzol (Zymo Research, R2073). Общую РНК из кератиноцитов человека очищали с применением набора RNeasy Mini Kit (Qiagen, 74106). В обоих случаях РНК инкубировали с ДНКазой I для эффективного расщепления ДНК перед элюированием. Чистоту и количество РНК рассчитывали с применением UV-Vis спектрофотометра (NanoDrop2000c (Thermo Fisher Scientific, ND-2000c). Общее качество РНК оценивали путем измерения соотношения рибосомных РНК 28S/18S и подсчета значений числа качества/целостности РНК (RQN/RIN) посредством капиллярного электрофореза с применением биоанализатора 2100 Bioanalyzer (Agilent, Санта-Клара, штат Калифорния, США) или анализатора фрагментов Fragment Analyzer CE (Agilent, Санта-Клара, штат Калифорния, США).

Количественная ПЦР в реальном времени (qRT-PCR). Для синтеза cDNA из мРНК использовали набор для обратной транскрипции с высокой пропускной способностью (Applied Biosystems, 4368813). Зонды ТаqМап против представляющих интерес целевых генов были разработаны с применением красителей флуоресцеина (FAM). Зонды против генов домашнего хозяйства RPLP0 и β -актина использовали для получения соответственно cDNA человека и мыши. Относительную экспрессию генов определяли с применением способа сравнения ($\Delta\Delta C_t$), полученного из пороговых различий циклов (C_t) с целевыми генами и генами домашнего хозяйства.

<u>Проточная цитометрия</u>. Суспензии клеток получали путем расщепления ткани кожи мыши в коктейле, состоящем из либеразы TL (Roche, 5401020001), ДНКазы I (Sigma,

DN25) и антибиотиков (Invitrogen, 15140) в RPMI 1640 (Gibco, 11875093). Для FACS клетки промывали и сначала окрашивали в отношении жизнеспособности с применением красителя Zombie Aqua (BioLegend, 423101). После блокировки клетки окрашивали смесью антител (расширенная таблица 2) и буфером BD Horizon Brilliant Violet (BV) (BD, 563794), чтобы свести к минимуму неспецифическое спектральное перекрытие аналогичных конъюгатов. Наконец, клетки ресуспендировали в стабилизирующем фиксаторе BD перед FACS. Все эксперименты по проточной цитометрии выполняли на BD LSR II, а последующий анализ данных проводили с помощью Cytobank.

Микроматрица in vivo. Общую РНК выделяли из ткани мышей во время реэпителизации кожи и отделения струпа от раны (~10 дней после нанесения раны) как у мышей дикого типа, так и у Rnasel^{-/-}мышей. РНК отправляли в центр JНМІ Deep Sequencing & Microarray и профилировали с применением платформы для мышиных матриц Affymetrix Clariom[™] S в соответствии с протоколами производителя. Генные чипы сканировали, создавая файлы интенсивности пикселей CEL, которые обрабатывали и анализировали с помощью программного обеспечения Partek[®] Genomics Suite[™], а для нормализации применяли алгоритм жесткого анализа на множестве чипов (Robust Multichip Analysis (RMA)).

Секвенирование circRNA in vivo. Биоптаты кожной ткани площадью 1 см² брали как у мышей дикого типа, так и у Rnasel^{-/-} мышей и отправляли в CD Genomics (Ширли, штат Нью-Йорк, США) для секвенирования. Вкратце, после выделения общей РНК образцы обрабатывали РНКазой R для расщепления линейной РНК. После подготовки библиотеки для конкретных нитей образцы секвенировали на HiSeq PE150 (Illumina, Caн-Диего, штат Калифорния, США). Авторы настоящего изобретения рассчитали дифференциальную экспрессию и обогащение для функционального анализа. Анализ дифференциальной экспрессии проводили с применением алгоритма обобщенного кратного изменения (GFOLD) и ранжировали гены, отвечающие порогу 0,5. Данные сопоставляли с эталонным геномом GRCm38.p6.

Секвенирование РНК in vitro. Общую РНК (в том числе малые РНК) из первичных кератиноцитов человека, обработанных ненацеливающей и нацеливающей на РНКазу L siRNA в присутствии или в отсутствие 10 мкг/мл поли(I:C), отправляли в Центр экспериментальной и вычислительной геномики (ECGC) в Комплексный онкологический центр Сиднея Киммела (SKCCC) для секвенирования РНК. Библиотеки получали с применением набора TruSeq Stranded Total RNA LT Sample Prep Kit (Illumina, 15031048) для отбора полиаденилированной РНК с последующим штрих-кодированием. Секвенирование проводили на платформе HiSeq2500 (Illumina, Сан-Диего, штат Калифорния, США), производя 50 миллионов считываний парных концов размером 100×100 п. о. Для преобразования файлов ВСL в файлы FASTQ применяли CASAVA 1.8.4 компании Illumina с использованием параметров по умолчанию. EBSeq RSEM-1.3.0 применяли для анализа дифференциальной экспрессии и для проведения выравниваний, а также для определения уровней экспрессии генов и транскриптов. Данные сопоставляли с

эталонным геномом GRCh38 с применением способа выравнивания сплайсированных транскриптов с эталоном (STAR). Загруженные данные можно найти в NIH GEO GSE164667.

<u>Гистология</u>. Биоптаты из толстой кишки мыши и ткани кожи удаляли и фиксировали в 4% параформальдегиде в течение ночи, а затем переносили в 70% этанол. Затем образцы отправляли в центр Johns Hopkins Oncology Tissue Services Core, где их помещали в парафин. Срезы тканей получали толщиной 4 мкм и помещали на предметные стекла с последующим окрашиванием гематоксилином и эозином (H&E).

Иммунофлуоресценция, иммуноцитохимия И иммуногистохимия. Иммунофлуоресценцию и флуоресцентную микроскопию тканей мыши проводили на депарафинированных срезах после термоиндуцированного извлечения антигена с помощью раствора для демаскировки (Agilent Dako, S169984-2). После промывки и пермеабилизации в универсальном буфере TBS-T (0,2% Triton X-100 в трис-буферном физиологическом растворе), срезы блокировали при комнатной температуре в 5% козьей, ослиной или фетальной бычьей сыворотке крови с 1% бычьего сывороточного альбумина. Затем срезы тканей инкубировали в течение ночи при 4°C с первичными антителами в предложенных концентрациях (расширенная таблица 3) в разбавителе для антител (Agilent S080983-2). После последующей промывки срезы конъюгированных с флуоресцентным красителем вторичных антителах, разбавленных в растворителе для антител, в течение 1 часа при комнатной температуре. После окончательной промывки срезы помещали в антифединговую среду для заливки VECTASHIELD® HardsetTM с DAPI (Vector Laboratories, H-1500) для окрашивания ядер. Кератиноциты человека получали аналогично, за исключением извлечения антигена. Все стекла визуализировали с помощью DFC365FX (Leica) или Eclipse E-800 (Nikon) при 10-, 20- и 40-кратном увеличении.

Модель колита. Для того чтобы вызвать колит, взрослых мышей дикого типа, Rnasel $^{-1}$ и II36 $^{-1}$ мышей кормили до 4% (масса/объем) 36-50 кДа декстрансульфата натрия (DSS) (MP Biomedicals, 160110) в стерильной воде 37 . Изменения веса отслеживали и записывали каждый день. Для экспериментов по восстановлению с применением панкаспазного ингибитора Q-VD-OPh мышам вводили те же концентрации, что и в экспериментах в отношении WIHN, и вводили их внутрибрюшинно в течение дня, когда отмечали начало заметной потери веса (\sim 3-4 день). В конечном итоге мышей умерщвляли и извлекали отрезки толстой кишки для общего исследования и последующего анализа FACS и белков.

<u>Иммуноблот-анализ</u>. Кератиноциты человека и ткань мыши ресуспендировали и лизировали в реагенте для экстракции белков млекопитающих M-PER (Thermo Fisher Scientific, 78501), содержащем коктейль ингибиторов протеазы широкого спектра действия на основе EDTA (Thermo Fisher Scientific, 87786). Затем образцы разрушали ультразвуком с применением зонда, а затем количественно определяли концентрации белка с помощью колориметрического анализа BCA (Thermo Fisher Scientific, 23225).

Белки и лэддеры загружали в денатурирующий гель NuPAGE Bis-Tris с градиентом 4-12% (Thermo Fisher Scientific, NP0321BOX) с последующим электрофорезом. Затем белки переносили и связывали с активированной метанолом мембраной PVDF (Bio-Rad, Геркулес, штат Калифорния, США). После кратковременной промывки 0,1% буфером Tween-20 мембраны инкубировали в блокирующем буфере с 5% обезжиренного сухого молока (NFDM) в течение 1 часа при комнатной температуре с последующей инкубацией в течение ночи с первичными антителами в блокирующем буфере при 4°C. Мембраны соответствующими инкубировали С вторичными промывали конъюгированными с пероксидазой хрена (HRP), при комнатной температуре в течение 1 часа. Все мембраны впоследствии аналогичным образом исследовали на β-актин в качестве контроля загрузки белков. Белки обнаруживали на мембранах с использованием HRP-реактивного хемилюминесцентного субстрата на основе люминола (Thermo Fisher Scientific, 34577) и визуализировали с помощью системы визуализации ChemiDoc XRS+ (Bio-Rad, Геркулес, штат Калифорния, США). Аналогичным образом обрабатывали концентрированный секретируемый белок из кератиноцитов мыши.

<u>Трансфекция siRNA</u>. Для исследования мышиных и человеческих кератиноцитов клетки высевали в количестве 50000 клеток/лунка (РНК) или 100000 клеток/лунка (белок) в 12-луночные или 6-луночные планшеты, соответственно. Использовали ненацеливающиеся и ген-специфические siRNA (Dharmacon) (расширенная таблица 4) для человека и мыши. Вкратце, 25 нМ siRNA объединяли с реагентом для трансфекции Lipofectamine® RNAiMAX (Thermo Fisher Scientific, 13778150) в среде ОРТІ-МЕМ с пониженным содержанием сыворотки (Gibco, 31985062) и добавляли к культивируемым кератиноцитам на 48 часов для достижения максимальной эффективности нокдауна генов.

Протеомный анализ. Для анализа белка получали кератиноциты мышей дикого типа и Rnasel^{-/-} мышей. Вкратце, после промывания солевым раствором образцы лизировали в детергенте 5% дезоксихолата натрия (DOC). После последовательной обработки пептидов (восстановление, алкилирование и трипсинолиз) последующее разделение и анализ выполняли на системе nanoACQUITY UPLC с масс-спектрометром с квадрупольно-линейной ионной ловушкой Tribrid Orbitrap (Thermo Fisher). сопоставления данных тандемных масс-спектров (MS-MS) применяли эталонный протеом мыши из UniProt в сочетании с алгоритмом Sequest HT. Соотношения распространенности белка рассчитывали путем сравнения пиков интенсивности ионов пептида MS1. Программное обеспечение на основе машинного обучения (Percolator) использовали для идентификации пептидов и проводили подтверждение при FDR по меньшей мере 0,05. Протеомика «Center versus Edge» доступна в репозитории данных Исследовательского центра металлотерапии Университета Мэриленда в Балтиморе, а данные протеомики масс-спектрометрии депонированы в Консорциум ProteomeXchange через партнерский репозиторий PRIDE с идентификатором набора данных PXD013854. Набор данных протеома siRNA RNaseL можно найти в px-submission № PXD023375 в консорциуме ProteomeXchange.

Измерения производных ретиноидов. Все образцы кожи in vivo от мышей дикого типа и Rnasel^{-/-} мышей собирали, быстро замораживали и хранили при -80°C. Затем образцы обрабатывали, как описано в Kim et al.8. Вкратце, после гомогенизации эндогенные ретиноиды экстрагировали под желтым светом низкой интенсивности посредством двухстадийного разделения жидкости. Многостадийное разделение было достигнуто с использованием методики высокоселективной жидкостной хроматографии в тандемной масс-спектрометрии (LC-MS/MS), LC-MRM³. Измерения уровня ретиноевой кислоты проводили с применением сверхбыстрого жидкостного хроматографа Shimadzu Prominence (UFLC_{XR}) (Shimadzu, Колумбия, штат Мэриленд, США) с массспектрометрами AB Sciex 5500/6500+ с гибридной тройной квадрупольно-линейной ионной ловушкой (QqQ(LIT)) (AB Sciex, Фремингем, штат Массачусетс, США) с применением химической ионизации при атмосферном давлении (APCI), проводимой в псевдомолекулярном режиме МН+. Для всех экспериментов в качестве эталонных контролей использовали 4,4-диметил-RA, ретинилацетат и общий ретиниловый эфир для ретиноевой кислоты, ретинола и ретинилового эфира, соответственно. Эндогенный ретинол и ретиниловый сложный эфир измеряли и анализировали с помощью UHPLC-UV с применением колонок с экспресс-разрешением Zorbax с обращенной фазой (SB-C18, Agilent) на системе ACQUITY UPLC H-класса на основе четвертичных соединений (Waters Corporation, Милфорд, штат Массачусетс, США) с помощью ультрафиолетового детектора.

Анализ микроматриц RNaseL. Анализ обогащения аннотаций белков и генов и онтологий проводили с применением базы данных для аннотаций, визуализации и интегрированных открытий (DAVID) и системы классификации PANTHER. Все поисковые анализы перечней генов были статистически значимыми с использованием точного критерия Фишера с поправкой на коэффициент ложных открытий Бенджамини-Хохберга (FDR) или поправкой Бонферрони. Микроматрицы для мышей с нулевой RNaseL доступны в GSE164003 NCBI GEO.

Межматричный анализ. GSE50418 NCBI GEO использовали для анализа аутбредных и инбредных штаммов; GSE131789 NCBI GEO использовали для лазерной матрицы человека; GSE92646 NCBI GEO использовали для кератиноцитов, обработанных поли I:С. Чтобы избежать прямого сравнения значений сигнала между различными платформами микроматриц, вместо этого авторы настоящего изобретения сравнивали результаты изменения кратности, поскольку сами значения изменения кратности экспрессии генов получаются в результате сравнения подобных (из одной и той же матрицы) значений, что позволяет избежать каких-либо различий между матрицами. Таким образом, каждый эксперимент с матрицей давал соотношение для каждого набора зондов образца с высокой регенерацией к образцу с низкой регенерацией. Кроме того, определенные ортологичные гены позволяют сравнивать результаты экспрессии между различными видами и модельными организмами. Используя эти принципы, авторы настоящего изобретения сравнивали предыдущие результаты, полученные на людях с

применением матрицы Affymetrix PrimeView, с результатами, полученными на мышах с применением матриц Affymetrix для мышей MoEx-1_0-st-v1 и Mouse Clariom_S 8 . Аннотации генных транскриптов каждой матрицы сначала обновляли до текущей номенклатуры HUGO/MGI/NCBI, после чего мышиные гены сопоставляли с их человеческими ортологами с использованием баз данных NCBI HomoloGene и SMI, а также базы данных HGNC Comparison of Orthology Predictions (HCOP) Комитета по номенклатуре генов человека 38 . Среди стандартного набора генов, который был идентичен для каждого эксперимента, соответствующие кратные изменения \log_2 для каждого ортологичного гена в каждом из трех биологических сравнений были затем упорядочены от тех, которые имели самый высокий средний коэффициент регенерации до самого низкого коэффициента регенерации. Этот порядок рангов усредняли по 3 экспериментам и снова отсортировывали от самого высокого до самого низкого среднего значения.

Анализ тепловых карт. Экспрессию генов стандартизировали для определения дифференциально экспрессированных генов и анализа обогащения GO и KEGG. Авторы настоящего изобретения использовали пакет R limma для определения DEG среди различных групп 39 . Для анализа обогащения аннотаций генов авторы настоящего изобретения использовали пакет ClusterProfiler 40 . Наконец, визуализацию этих результатов создавали с помощью пакета ggplots2 R.

<u>Количественная оценка и статистический анализ.</u> Все эксперименты in vivo и in vitro проводили по меньшей мере в отдельных экземплярах. Одномерный статистический анализ проводили с помощью t-теста Стьюдента, а многомерный анализ - с помощью ANOVA. Все статистические анализы и графические представления проводили с применением программного обеспечения GraphPad Prism. Статистическая значимость определяется как p-значение <0,05, полученное из расчета стандартной ошибки среднего.

Результаты

После ампутации у животных, таких как хвостатые амфибии, образуется кластер дедифференцированных клеток, известный как бластема, который координирует регенерацию всего придатка^{3,4}. Млекопитающие, напротив, лишены такой способности к эпиморфной регенерации. Исключением является индукция волосяных фолликулов de почо во взрослой коже после полноточечного эксцизионного ранения у мышей и кроликов, процесс, называемый индуцированным раной de novo образованием волос (WIHN)^{1,5}. Для WIHN характерен морфогенный каскад, повторяющий эмбриогенные кератиноцитов события, при котором мультипотентные предшественники взаимодействуют с мезенхимальными фибробластами для образования волосяных фолликулов de novo и окружающей кожи. Были достигнуты важные успехи в определении роли путей развития, таких как Wnt, Shh и Fgf, в развитии WIHN^{1,6,7}. Среди самых ранних медиаторов, активирующих эти пути развития - некодирующие РНК, некоторые из которых включают участки двухнитевой РНК (dsRNA), которые высвобождаются в качестве молекулярного паттерна, связанного с повреждением (DAMP), при повреждении тканей^{2,8,9}. Однако нижестоящие мишени этих dsRNA, которые способствуют

регенерации, изучены не полностью. Понимание всей совокупности этих путей регенерации позволит разработать активные терапевтические средства, способствующие заживлению, отличные от текущего медицинского стандарта лечения: простые поддерживающие меры после острой травмы.

Чтобы определить общие механизмы, определяющие регенерацию тканей, авторы настоящего изобретения провели анализ транскриптома опосредованного травмой омоложения у людей и мышей. Авторы настоящего изобретения исследовали пересечение 3 различных скринингов транскриптома и определили 200 основных генов в: (1) аутбредных линиях мышей дикого типа с высокой способностью к WIHN (C57BL/6 x FVB x SJL); (2) у субъектов-людей после лазерного омоложения для облегчения фотостарения; и (3) культивированных кератиноцитах человека, обработанных синтетической dsRNA поли(I):поли(C) (поли(I:C))⁸ в качестве положительного контроля. Наблюдается сильное перекрывание, включая всех представителей класса сенсоров dsRNA человека, семейства генов 2'-5'-олигоаденилатсинтетазы (OAS) (OAS1, OAS2, OAS3 и OASL; ФИГ. 23A, которые, как известно, индуцируются в ответ на поли(I:C) в ответе интерферона 10,11. Анализ генной онтологии показывает, что экспрессия РНК OAS преимущественно обнаруживается во всех трех наборах данных, как по отдельности (ФИГ. 23В), так и вместе (ФИГ. 23С). Эти результаты демонстрируют корреляцию между экспрессией OAS и регенеративными ответами у мышей и людей.

OAS представляют собой антивирусные ферменты, которые продуцируют 5'трифосфорилированные 2'-5' аденилиловые олигомеры, которые, в свою очередь, активируют эндорибонуклеазу РНКазу L^{12} . РНКаза L характеризуется разнообразными функциями, в том числе противовирусным иммунитетом и недавно установленным метаболизмом^{13,14}. Учитывая, что РНКаза L представляет собой точку схождения для нескольких различных OAS, авторы настоящего изобретения стремились определить роль РНКазы L в ходе регенерации. Таким образом, авторы настоящего изобретения сначала проверяли влияние потери функции РНКазы L на экспрессию генов на мышиной модели делеции в отношении всего тела и in vitro после сайленсинга генов в кератиноцитах человека. Общие пути, индуцируемые в обоих контекстах потери РНКазы L, включают как пути развития, так и пути морфогенеза (ФИГ. 23D), которые также видны при протеомном анализе (ФИГ. 28А-28В). Авторы настоящего изобретения также обнаружили, что circRNA более распространены в коже Rnasel -- мышей по сравнению с мышами дикого типа (WT), что подтверждает предыдущие результаты (ФИГ. 29A-29B). В частности, circRNA, полученные из генов, которые контролируют судьбу и раннее развитие стволовых клеток, таких как домен PWWP, содержащий 2A (circPwwp2a), активируются у Rnasel -- мышей (ФИГ. 29С-29D). Эти результаты свидетельствуют о том, что потеря РНКазы L изменяет пути регенеративного ответа посредством связанных изменений в репертуаре circRNA, что имеет значение для заживления ран¹⁵.

Известно, что двухнитевая РНК усиливает регенерацию, соответственно индуцируя и ингибируя состояния недифференцированных и дифференцированных клеток

посредством Tlr3². Таким образом, авторы настоящего изобретения добавляли dsRNA поли(I:C) к нормальным кератиноцитам взрослого человека с или без истощения РНКазы L, чтобы охарактеризовать полярность функции РНКазы L в контексте регенерации, чтобы стимулировать или подавлять регенерацию. Они обнаружили, что обработка посредством поли(I:C) в сочетании с потерей РНКазы L имеет даже больший эффект, чем добавление только поли(I:C), для гиперактивации экспрессии морфогенеза и транскриптов стволовых клеток, таких как WNT7B, TLR3 (toll-подобный рецептор 3), SHH (sonic hedgehog), KRT15 и KRT7 (ФИГ. 23E-23F). Параллельно происходит подавление транскриптов, связанных с дифференцировкой, в том числе FLG (филаггрин) и KRT10 (ФИГ. 23G). То же самое наблюдают в кератиноцитах мыши (ФИГ. 30A). Кроме того, несмотря на сообщения о неспецифичной или специфичной для типа клеток активации IFN, авторы настоящего изобретения не обнаружили заметных различий в мРНК IFN после истощения самой РНКазы L (ФИГ. 30В) 11,16. Благодаря известному каскаду активации dsRNA-OAS-PHКаза L эти результаты дают возможность предположить, что РНКаза L может быть геном-репрессором регенерации, потеря функции которого увеличивает регенерацию после повреждения.

Чтобы исследовать роль РНКазы L в регенерации in vivo, авторы настоящего изобретения получали раны у Rnasel^{-/-} мышей и контрольных мышей с соответствующими штаммами для измерения WIHN^{2,8,17}. В соответствии с изменениями экспрессии генов, описанными выше, у Rnasel-1- мышей наблюдается усиленная регенерация, о чем свидетельствует большая распространенность волосяных фолликулов de novo (ФИГ. 24A). Несмотря на более высокий исходный уровень, Rnasel-- мыши также демонстрируют сохранный регенеративный ответ после добавления экзогенной dsRNA. Учитывая установленную роль поли(I:C) в увеличении WIHN, этот аддитивный эффект демонстрирует отчетливую роль РНКазы L в подавлении регенерации (ФИГ. 24А). Хотя потеря Rnasel не оказывает существенного влияния на скорость закрытия раны (ФИГ. 24B, ФИГ. 33), у Rnasel^{-/-} мышей наблюдается улучшенное восстановление барьерной функции (ФИГ. 24C), что можно частично объяснить ролью РНКазы L как ингибитора клеточной миграции¹⁸. Интересно, что у Rnasel^{-/-} мышей гиподерма тоньше, что можно объяснить ролью РНКазы L во время адипогенеза $(\Phi U \Gamma. 32)^{19}$. Во время реэпителизации раны Rnasel ¹⁻ мыши экспрессируют более высокие уровни транскриптов морфогенеза (Tlr3, Il6, Wnt7b и EdaR), что согласуется с данными in vitro авторов настоящего изобретения в кератиноцитах человека и мыши (ФИГ. 24D, ФИГ. 23E, ФИГ. 26A). Даже в неповрежденной коже маркеры стволовых клеток Krt5 и Krt15 активируются у Rnasel-мышей на исходном уровне, что свидетельствует о том, что эти мыши праймированы для более сильной регенерации (ФИГ. 24Е). Подтверждая недавние выводы о том, что ретиноевая кислота (RA) является морфогеном, необходимым для регенерации и WIHN⁸, авторы настоящего изобретения обнаружили повышенные уровни RA, но не других производных ретиноидов, у Rnasel-/- мышей, как было измерено с помощью массспектрометрии (ФИГ. 33А-33С). Кроме того, учитывая недавние данные о том, что эндогенные некодирующие РНК регулируют WIHN, авторы настоящего изобретения обнаружили повышенные уровни агониста TLR3, U1 snRNA^{2,8,9,20} в участках с отсутствием раны и заживших ранах Rnasel^{-/-} мышей (ФИГ. 34). Вместе эти результаты демонстрируют, что РНКаза L действует как репрессор регенерации в коже, при этом потеря ее функции приводит к увеличению количества регенерированных волосяных фолликулов и маркеров морфогенеза волос и стволовых клеток.

Затем авторы настоящего изобретения сосредоточились на определении новых путей, которые вызывают регенерацию у Rnasel^{-/-} мышей. Анализ генной онтологии ран у Rnasel^{-/-} мышей во время фазы реэпителизации WIHN демонстрирует усиление хемотаксиса нейтрофилов (ФИГ. 24F). Действительно, после нанесения раны у Rnasel^{-/-} мышей наблюдают привлечение значительно большего числа нейтрофилов и нейтрофильных внеклеточных ловушек (NET) в раневое ложе, чем у контрольных групп с соответствующими штаммами (ФИГ. 24F)²¹. Анализ генной онтологии также выявил повышенные пути интерлейкина-1 (IL-1) у Rnasel^{-/-} мышей, что свидетельствует о том, что острое воспаление может способствовать регенерации (ФИГ. 24F). Таким образом, эта характеристика кожи Rnasel^{-/-} мышей предполагает, что представитель семейства IL-1, способный увеличивать число нейтрофилов, ответственен за повышение WIHN.

Чтобы найти такого кандидата, который обосновывает высокий WIHN у мышей с нокаутом RNaseL, авторы настоящего изобретения затем проанализировали два сценария высокого WIHN у мышей дикого типа на предмет того, что также может быть гиперактивировано при потере функции RNaseL. Во-первых, отличительной чертой WIHN является топографическая близость к образованию волосяных фолликулов de novo в центре, а не на периферии раны у мышей и кроликов. С помощью протеомики авторы настоящего изобретения определили 100 основных белков, присутствующих в центре раны по сравнению с границами раны⁸. Во-вторых, они определяли 100 основных транскриптов, экспрессированных в заживших ранах аутбредных мышей с высоким WIHN (C57BL/6 x FVB x SJL) по сравнению с чистым штаммом C57Bl/6 с низким WIHN, как упоминалось выше^{1,5}. На этом пересечении авторы настоящего изобретения идентифицировали специфический представитель семейства цитокинов IL-1 IL-36 и биологические процессы нейтрофилов и ферменты, такие как эластаза (Elane) (ФИГ. 25А-25B). IL-36α представляет собой DAMP, который регулирует воспаление эпидермиса. У людей генетические дефекты, приводящие к усилению функции IL-36, связаны с инфильтрацией кожи²²⁻²⁵. Фактически, отличие от нейтрофильной представителей семейства ІІ-1, которые каталитически активируются каспазами, семейство ІС-36 (а, β, у и антагонист рецептора, гп) также активируется протеазами нейтрофильного происхождения, такими как катепсин G (Ctsg) и Elane^{23,26,27}. Как можно было бы предсказать, уровни Rnasel снижаются у аутбредных мышей с высоким WIHN (ФИГ. 25В). Поэтому WIHN дикого типа демонстрирует сильную сигнатуру для IL-36а и нейтрофильных ферментов, известных для его активации (ФИГ. 25В). Это позволило предположить, что IL-36α является кандидатом для обоснования высокого WIHN у Rnasel

¹⁻ мышей, который сам по себе связан с инфильтрацией нейтрофилов и сигнатурой GO представителей семейства IL-1 (ФИГ. 25A).

Чтобы проверить, опосредует ли IL36 высокий уровень WIHN у мышей с нулевым уровнем РНКазы L, авторы настоящего изобретения исследовали роль IL-36 у мышей дикого типа, Il36r^{-/-} и Rnasel^{-/-} мышей. После повреждения кожи авторы настоящего изобретения обнаружили, что у Rnasel^{-/-} мышей значительно больший уровень IL-36α в раневом ложе (ФИГ. 25С), и что он наиболее высок в эпителиальной губе/лидирующем крае мигрирующих внутрь кератиноцитов (ФИГ. 25D), что указывает на его роль в заживлении. Это согласуется с результатами исследований in vitro, где культивированные Rnasel $^{-1}$ кератиноциты выделяют повышенный уровень общего IL-36 α (ФИГ. 25E). Далее авторы настоящего изобретения исследовали влияние введенного рекомбинантного белка IL-36α (rmIL-36α) на WIHN. По сравнению с контролем, обработанным средой-носителем, rmIL-36α, характеризовались получавшие vвеличенным образованных de novo волосяных фолликулов более чем в 2 раза (ФИГ. 25F-25G). Учитывая достаточность IL-36 для развития WIHN, авторы настоящего изобретения исследовали функциональную потребность в ІС-36 путем нанесения ран мышам, лишенным рецептора для IL-36 (II36r^{-/-} мыши). Потеря рецептора IL36 почти полностью отменяет регенерацию в обработанных средой-носителем, соответствующих по штамму контролях (ФИГ. 25H). Более того, наблюдавшееся ранее усиление WIHN под действием экзогенной dsRNA также отменяется (ФИГ. 25H). Чтобы определить эпистаз между РНКазой L и IL-36, авторы настоящего изобретения создали и подвергли образованию раны штамм с двойным нокаутом (Rnasel^{-/-}/II36r^{-/-} мыши). Rnasel^{-/-} /II36r^{-/-} мыши утрачивают повышенную способность к регенерации, наблюдаемую у Rnasel-1- мышей (ФИГ. 25I). Это позволяет предположить, что повышение активности IL-36 происходит нижележащим образом от потери РНКазы L. Повторяя эти результаты in vitro, авторы настоящего изобретения наблюдали, что одновременный транскрипционный сайленсинг как РНКазы L, так и IL-36а, в кератиноцитах человека приводит к снижению WNT7B и IL-6 по сравнению с кератиноцитами, нацеленными только на РНКазу L (ФИГ. 25J). Наконец, в кератиноцитах человека рекомбинантный ІС-36α способствует экспрессии WNT7B (ФИГ. 25K). В целом, эти результаты позволяют предположить, что потеря РНКазы L приводит к увеличению выработки IL-36α, усиливая WIHN. Далее авторы настоящего изобретения попытались определить механизм, посредством которого IL-36a индуцируется в ответ на делецию РНКазы L.

РНКаза L является известным активатором каспазы 1 посредством инфламмасомы Nlrp3; поэтому авторы настоящего изобретения задались вопросом, может ли IL-36α-опосредованный WIHN, как результат удаления РНКазы L, вместо этого быть вызван непосредственно ингибированием каспазы²⁸. Во-первых, авторы настоящего изобретения исследовали, приведет ли потеря Nlrp3 к увеличению регенерации, как это происходит при нокауте РНКазы L. Действительно, у Nlpr3-/- мышей наблюдается увеличение WIHN (ФИГ. 35A). Аналогично, клетки, обработанные ингибитором инфламмасомы МСС950,

также имеют больше маркеров регенерации по сравнению с контролем, количество которых еще больше увеличивается при добавлении экзогенной dsRNA (ФИГ. 35B).

Далее авторы настоящего изобретения задались вопросом, действует ингибирование каспазы аналогичным образом. Предыдущие сообщения указывают на снижение уровня каспазы 1 (про и активированной) в стимулированных мышах с нулевым Rnasel^{28,29}. Возможно, в качестве компенсации, мРНК каспазы повышается в кератиноцитах мыши, лишенных Rnasel (ФИГ. 30С). Несмотря на то, что каспазы протеолитически перерабатывают множество представителей семейства IL-1, таких как IL-1β, IL-18 и IL-33, они не перерабатывают семейство IL-36^{23,26,27}. Поэтому авторы настоящего изобретения предположили, что каспазы могут ингибировать ІL-36α через прямые или косвенные механизмы, учитывая отрицательную корреляцию РНКазы L и положительную корреляцию IL-36 с регенерацией³⁰. Чтобы изучить способность каспаз базально ингибировать экспрессию IL-36, авторы настоящего изобретения провели скрининг siRNA нескольких каспаз, а также активированных генов, наблюдаемых при сравнении матриц мышей in vivo и человека in vitro с делецией и истощением Rnasel, соответственно (ФИГ. 26А- 26В). Они обнаружили, что хотя другие каспазы и гены могут вносить свой вклад, ингибирование каспазы 1 последовательно приводит к самым высоким уровням белка ІL-36α (ФИГ. 26В-26С). Это предполагает, что ингибирование каспазы может быть эквивалентно ингибированию РНКазы L в способствовании WIHN.

Затем авторы настоящего изобретения исследовали, может ли ингибирование низкомолекулярных каспаз, которое в настоящее время проходит клинические испытания по ряду показаний, способствовать экспрессии ІС-36, приводить к регенерации и обеспечивать клиническую пользу. Они инъецировали мышам внутрибрюшинно необратимый пан-каспазный ингибитор Q-VD-OPh перед нанесением раны (ФИГ. 26D). После обработки и анализа FACS визуализация t-распределенного стохастического встраивания соседей (viSNE) выявила более высокие уровни нейтрофилов в коже мышей, получавших Q-VD-OPh, по сравнению с контролями, обработанными средой-носителем, что схоже с результатами для Rnasel-1- мышей (ФИГ. 26E). Эпителиальные кератиноциты мыши (MEK), обработанные Q-VD-OPh, также имеют более высокие уровни мРНК и белка IL-36α (ФИГ. 26F-26G). Никаких различий в уровнях белка или мРНК антагониста рецептора IL-36 (IL-36rn) не наблюдали, что позволяет предположить, что повышенные уровни IL-36α при ингибировании каспазы не опосредуются антагонистом через петлю обратной связи (ФИГ. 26G и ФИГ. 36A). Кроме того, различий в белке рецептора IL-36 не обнаружено. Повышенные гены морфогенеза (Tlr3), наблюдаемые у Rnasel^{-/-} мышей, снова повышены, на этот раз только с ингибированием каспаз, как и компенсаторное увеличение мРНК генов каспаз (ФИГ. 36A). Эти результаты воспроизводили с Z-WEHD-FMK, ингибитором каспазы группы 1, который в первую очередь нацелен на каспазу 1 $(\Phi \text{ИГ. 36B})$, а также с пан-каспазным ингибитором эмрикасаном $(\Phi \text{ИГ. 36C})^{31}$. Во всех случаях ингибирование каспазы приводит к повышению уровня общего ІL-36а. Важно отметить, что мыши дикого типа, получавшие Q-VD-OPh, проявляли больше WIHN по

сравнению с мышами, обработанными средой-носителем, в дополнение к более высоким уровням IL-36α в эпидермисе реэпителизированных ран (ФИГ. 26H-26J), в то время как у Il36r^{-/-} мышей, получавших Q-VD-OPh, этого не происходит (ФИГ. 26K-26L). Эти результаты в совокупности демонстрируют, что ингибирование каспазы способствует регенерации зависимым от IL-36 и PHКазы L образом.

Наконец, авторы настоящего изобретения стремились определить, ограничены ли регенеративные эффекты ингибирования каспазы кожей или могут иметь клиническое Они других органах. исследовали, может ЛИ низкомолекулярных каспаз предупредить или восстановить повреждение кишечника на модели колита, вызванного декстрансульфатом натрия (DSS) (ФИГ. 27A). Действительно, авторы настоящего изобретения обнаружили, что мыши, получавшие Q-VD-OPh, были защищены от потери веса, вызванной DSS, и сохраняли более длинную и лучшую морфологию толстой кишки по сравнению с контрольными мышами (ФИГ. 27В-27С, 27G). Этот эффект, по-видимому, является результатом ускоренного заживления, а не многостороннего просто уменьшения воспаления, вызванного пан-каспазным ингибированием с помощью Q-VD-OPh. В то время как DSS увеличивает количество циркулирующих нейтрофилов у мышей WT (ФИГ. 37A), авторы настоящего изобретения не наблюдали изменений в распространенности нейтрофилов во время регенеративной фазы после прекращения DSS между мышами, получавшими Q-VD-OPh, и контрольной группой в крови или даже кишечнике. (ФИГ. 37A-37C). Повышенную экспрессию IL-36a также наблюдают в кишечнике мышей WT, получавших Q-VD-OPh (ФИГ. 27D). Однако, аналогично соответствующим наблюдениям авторов настоящего изобретения в отношении кожи, Il36r^{-/-} мыши полностью лишены способности отвечать на Q-VD-OPh и демонстрируют кинетику повреждения, аналогичную контрольным мышам (ФИГ. 27Е-27G). Таким образом, ингибирование пути РНКаза L-каспаза для способствования IL-36 усиливает ответ на повреждение при множественных несопоставимых контекстах повреждения органов или тканей.

Обсуждение

Таким образом, авторы настоящего изобретения обнаружили новый репрессор регенерации - РНКазу L - и описали путь, посредством которого каспазы ингибируют регенерацию многих тканей млекопитающих (ФИГ. 27Н). Существование геноврепрессоров регенерации может частично объяснить ограниченную способность взрослого органогенеза у млекопитающих по сравнению с животными, такими как аксолотль. Соединения, подобные Q-VD-OPh, могут быть применимы для людей после острых травм, таких как ожоги кожи или перфорация кишечника, которые в настоящее время не получают медицинского вмешательства, кроме общей поддерживающей терапии. Полученные результаты также согласуются с гипотезой о том, что ограниченная регенерация у людей и других млекопитающих является эволюционной адаптацией, возможно, для ограничения канцерогенеза³². Хотя авторы в данном документе показали, что потеря РНКазы L увеличивает регенерацию, мутации потери функции РНКазы L

также считаются факторами риска развития рака³³.

Полученные данные поднимают несколько интересных вопросов для дальнейшего изучения. Один из них представляет собой определение точного механизма того, как каспазы в целом ограничивают экспрессию IL36 α . Авторы настоящего изобретения демонстрируют, что это происходит частично за счет снижения транскрипции IL36 α , хотя и без изменений антагониста рецептора IL36, что позволяет предположить, что активация IL36RN каспазами менее актуальна, поскольку это будет более нисходящим. Вместо этого каспазы могут базально расщеплять транскрипционные факторы, которые в противном случае способствовали бы транскрипции IL36 α . Одним из таких кандидатов является SP-1, известный субстрат для каспазы-1, а также предсказано, что он связывает промотор/энхансер для IL-36 α (GH02J112875)³⁴. Полученные данные также раскрывают важный парадокс, когда поли I:C способствует WIHN, но фермент RNaseL, активирующий dsRNA, ингибирует WIHN. Таким образом, независимые от RNaseL пути активации dsRNA являются критическими для способствования WIHN и могут включать ретиноевую кислоту, представителей семейства IL-6 и, вероятно, другие важные пути, которые будут определены в будущем^{2,8}.

Наконец, эти результаты позволяют предположить, что ингибирование каспаз, связанных с вирусной инфекцией и активацией RNaseL, может иметь терапевтический эффект при повреждении эпителия, например, легких пациентов с COVID-19. Поэтому фармакологическое воздействие на репрессоры регенерации имеет множество потенциальных терапевтических возможностей.

Таблица 1

			Размер продукта
Линия		(пар оснований:	
		п. о.)	
	Прямой (HindII)	GGAGGAGAAGCTTTACAAGGTG (SEQ ID	
РНКаза I ^{-/-}		NO:2)	WT: 900 п. о.
	Обратный	GCATTGAGGACCATGGAGAC (SEQ ID	КО: 2,1 т. п. о.
	(РНКаза L)	NO:3)	
Il36r ^{-/-}	Прямой	GCCGCTACACACCACACCAG (SEQ ID	
		NO:4)	WT: 390 п. о.
	Обратный	AGTTCAGTAGTCCACTGCCACTC (SEQ ID	КО: 520 п. о.
		NO:5)	

Таблица 2

Название	Хозяин	Флуорофор	Производитель/№ продукта
CD103	lgG крысы	BUV805	BD/741948
CD45	lgG крысы	BUV563	BD/565710

CD4	lgG крысы	BUV496	BD/564667
GR1+	lgG крысы	BUV395	BD/566218
CD11b	lgG крысы	BV786	BD/740861
MHC-II	lgG крысы	BV711	BD/563414
F4/80	lgG крысы	BV650	BD/743282
gdTCR	IgG хомяка	BV605	BD/744116
Живые/Мертвые		Zombie-Aqua	BioLegend/423101
Ly6G	lgG крысы	BV421	BD/562727
CD11c	lgG крысы	PerCP-Vio700	Miltenyi/130-103-806
Ly6G	lgG крысы	PE-Cy7	BD/560601
CD3	IgG хомяка	PE-CF594	BD/562332
CD163	lgG крысы	PE	Thermo Fisher/12-1631-82
CD115	lgG крысы	APC-Cy7	BioLegend/135532
CD8	lgG крысы	AF700	BD/557959
CD207	lgG крысы	eFluor660	eBioscience/50-2073-82

Таблица 3

	ı		бавление	
Название	Хозяин	Вестерн-	Иммуно-	Компания/ № продукта
		блот	окрашивание	
WNT7B	Кролик		1:200	Thermo Fisher/PA5-30207
KRT5	Мышь			Abcam/ab17130
KRT15	Кролик		1:300	Sigma/HPA023910
IL-36α	Кролик		1:100	Abcam/ab180909
ΙL-36α	Коза	1:1000		R&D Systems/AF1078
ΙL-36γ	Коза	1:1000		R&D Systems/AF2320
β-актин	Кролик	1:1000		Технология Cell Signaling
p akimi	Пролик	1.1000		Technology/4967L
Гистон Н4	Кролик		1:500	Millipore Sigma/07-596
(цитруллин 3)	Пролик		1.500	Willipore Signa, 07 330
Alexa Fluor® 488				
антитело к lgG козы	Кролик		1:1000	Invitrogen/A27012
(H+L)				

Alexa Fluor® 488 антитело к IgG кролика (H+L)	Коза		1:1000	Invitrogen/A-11008
Alexa Fluor® 594 антитело к IgG кролика (H+L)	Коза		1:1000	Invitrogen/A-11037
антитело к IgG мыши-HRP	Лошадь	1:1000		Технология Cell Signaling Technology/7076S
антитело к lgG кролика-HRP	Коза	1:1000		Технология Cell Signaling Technology/7074S

Таблица 4

Название гена	Целевой хозяин	Тип	Производитель/№ продукта
РНКаза L	Человек	SMARTpool siGENOME	Dharmacon/ M-005032- 01-0005
IL36A	Человек	SMARTpool siGENOME	Dharmacon/ M-007956- 03-0005
Каспаза 1	Мышь	SMARTpool siGENOME	Dharmacon/ M-048913- 01-0005
Каспаза 2	Мышь	SMARTpool siGENOME	Dharmacon/ M-044184- 00-0005
Каспаза 3	Мышь	SMARTpool siGENOME	Dharmacon/ M-043042- 01-0005
Каспаза 4	Мышь	SMARTpool siGENOME	Dharmacon/M-042432- 01-0005
Каспаза 6	Мышь	SMARTpool siGENOME	Dharmacon/M-063186- 01-0005
Каспаза 7	Мышь	SMARTpool siGENOME	Dharmacon/M-057362- 01-0005
Каспаза 8	Мышь	SMARTpool siGENOME	Dharmacon/M-043044- 01-0005
Каспаза 9	Мышь	SMARTpool siGENOME	Dharmacon/ M-040674-

			01-0005
Каспаза 12	Мышь	SNAADT and aiCENIONAE	Dharmacon/ M-062480-
Naciiasa 12	ІМІВІШЬ	SMARTpool siGENOME	01-0005
Каспаза 14	Мышь	SMARTpool siGENOME	Dharmacon/ M-062483-
Naciiasa 14			01-0005
Ненацеливающ	Человек/	SMARTpool siGENOME	Dharmacon/ D-001206-
ийся контроль	Мышь	SWANT POOL SIGENOWIE	13-05

Ссылки на литературные источники

- 1. Ito, M. et al., Wnt-dependent de novo hair follicle regeneration in adult mouse skin after wounding. Nature 447, 316-320 (2007).
- 2. Nelson, A.M. et al., dsRNA Released by Tissue Damage Activates TLR3 to Drive Skin Regeneration. Cell stem cell 17, 139-151 (2015).
- 3. Brockes, J.P. Amphibian limb regeneration: rebuilding a complex structure. Science 276, 81-87 (1997).
- 4. Tanaka, H.V. et al., A developmentally regulated switch from stem cells to dedifferentiation for limb muscle regeneration in newts. Nature communications 7, 11069 (2016).
- 5. Breedis, C. Regeneration of hair follicles and sebaceous glands from the epithelium of scars in the rabbit. Cancer research 14, 575-579 (1954).
- 6. Lim, C.H. et al., Hedgehog stimulates hair follicle neogenesis by creating inductive dermis during murine skin wound healing. Nature communications 9, 4903 (2018).
- 7. Gay, D. et al., Fgf9 from dermal gammadelta T cells induces hair follicle neogenesis after wounding. Nature medicine 19, 916-923 (2013).
- 8. Kim, D. et al., Noncoding dsRNA induces retinoic acid synthesis to stimulate hair follicle regeneration via TLR3. Nature communications 10, 2811 (2019).
- 9. Bernard, J.J. et al., Ultraviolet radiation damages self noncoding RNA and is detected by TLR3. Nature medicine 18, 1286-1290 (2012).
- 10. Silverman, R.H. Viral encounters with 2',5'-oligoadenylate synthetase and RNase L during the interferon antiviral response. J Virol 81, 12720-12729 (2007).
- 11. Banerjee, S., Chakrabarti, A., Jha, B.K., Weiss, S.R. & Silverman, R.H. Cell-type-specific effects of RNase L on viral induction of beta interferon. mBio 5, e00856-00814 (2014).
- 12. Zhou, A., Hassel, B.A. & Silverman, R.H. Expression cloning of 2-5A-dependent RNAase: a uniquely regulated mediator of interferon action. Cell 72, 753-765 (1993).
- 13. Liu, C.X. et al., Structure and Degradation of Circular RNAs Regulate PKR Activation in Innate Immunity. Cell 177, 865-880 e821 (2019).
- 14. Malathi, K., Dong, B., Gale, M., Jr. & Silverman, R.H. Small self-RNA generated by RNase L amplifies antiviral innate immunity. Nature 448, 816-819 (2007).
- 15. Yang, Z.G. et al., The Circular RNA Interacts with STAT3, Increasing Its Nuclear Translocation and Wound Repair by Modulating Dnmt3a and miR-17 Function. Molecular therapy:

- the journal of the American Society of Gene Therapy 25, 2062-2074 (2017).
- 16. Sledz, C.A., Holko, M., de Veer, M.J., Silverman, R.H. & Williams, B.R. Activation of the interferon system by short-interfering RNAs. Nat Cell Biol 5, 834-839 (2003).
- 17. Zhu, A.S., Li, A., Ratliff, T.S., Melsom, M. & Garza, L.A. After Skin Wounding, Noncoding dsRNA Coordinates Prostaglandins and Wnts to Promote Regeneration. The Journal of investigative dermatology 137, 1562-1568 (2017).
- 18. Banerjee, S. et al., RNase L is a negative regulator of cell migration. Oncotarget 6, 44360-44372 (2015).
- 19. Wang, Y.T. et al., A link between adipogenesis and innate immunity: RNase-L promotes 3T3-L1 adipogenesis by destabilizing Pref-1 mRNA. Cell death & disease 7, e2458 (2016).
- 20. Borkowski, A.W. et al., Toll-like receptor 3 activation is required for normal skin barrier repair following UV damage. The Journal of investigative dermatology 135, 569-578 (2015).
- 21. Brinkmann, V. et al., Neutrophil extracellular traps kill bacteria. Science 303, 1532-1535 (2004).
- 22. Bassoy, E.Y., Towne, J.E. & Gabay, C. Regulation and function of interleukin-36 cytokines. Immunological reviews 281, 169-178 (2018).
- 23. Henry, C.M. et al., Neutrophil-Derived Proteases Escalate Inflammation through Activation of IL-36 Family Cytokines. Cell reports 14, 708-722 (2016).
- 24. Mahil, S.K. et al., An analysis of IL-36 signature genes and individuals with IL1RL2 knockout mutations validates IL-36 as a psoriasis therapeutic target. Science translational medicine 9(2017).
- 25. Mantovani, A., Dinarello, C.A., Molgora, M. & Garlanda, C. Interleukin-1 and Related Cytokines in the Regulation of Inflammation and Immunity. Immunity 50, 778-795 (2019).
- 26. Macleod, T. et al., Neutrophil Elastase-mediated proteolysis activates the anti-inflammatory cytokine IL-36 Receptor antagonist. Sci Rep 6, 24880 (2016).
- 27. Towne, J.E. et al., Interleukin-36 (IL-36) ligands require processing for full agonist (IL-36alpha, IL-36beta, and IL-36gamma) or antagonist (IL-36Ra) activity. J Biol Chem 286, 42594-42602 (2011).
- 28. Chakrabarti, A. et al., RNase L activates the NLRP3 inflammasome during viral infections. Cell host & microbe 17, 466-477 (2015).
- 29. Rusch, L., Zhou, A. & Silverman, R.H. Caspase-dependent apoptosis by 2',5'-oligoadenylate activation of RNase L is enhanced by IFN-beta. J Interferon Cytokine Res 20, 1091-1100 (2000).
- 30. Afonina, I.S., Muller, C., Martin, S.J. & Beyaert, R. Proteolytic Processing of Interleukin-1 Family Cytokines: Variations on a Common Theme. Immunity 42, 991-1004 (2015).
- 31. Garcia-Calvo, M. et al., Inhibition of human caspases by peptide-based and macromolecular inhibitors. J Biol Chem 273, 32608-32613 (1998).
- 32. Liu, W., Liang, S.L., Liu, H., Silverman, R. & Zhou, A. Tumour suppressor function of RNase L in a mouse model. European journal of cancer 43, 202-209 (2007).
 - 33. Carpten, J. et al., Germline mutations in the ribonuclease L gene in families showing

- linkage with HPC1. Nature genetics 30, 181-184 (2002).
- 34. Torabi, B. et al., Caspase cleavage of transcription factor Sp1 enhances apoptosis. Apoptosis 23, 65-78 (2018).
- 35. Zhou, A. et al., Interferon action and apoptosis are defective in mice devoid of 2',5'-oligoadenylate-dependent RNase L. The EMBO journal 16, 6355-6363 (1997).
- 36. Kim, S. et al., Simple cell culture media expansion of primary mouse keratinocytes. Journal of dermatological science 93, 135-138 (2019).
- 37. Wirtz, S. et al., Chemically induced mouse models of acute and chronic intestinal inflammation. Nature protocols 12, 1295-1309 (2017).
- 38. Fong, J.H., Murphy, T.D. & Pruitt, K.D. Comparison of RefSeq protein-coding regions in human and vertebrate genomes. BMC Genomics 14, 654 (2013).
- 39. Ritchie, M.E. et al., limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. Nucleic Acids Res 43, e47 (2015).
- 40. Yu, G., Wang, L.G., Han, Y. & He, Q.Y. clusterProfiler: an R package for comparing biological themes among gene clusters. OMICS 16, 284-287 (2012).

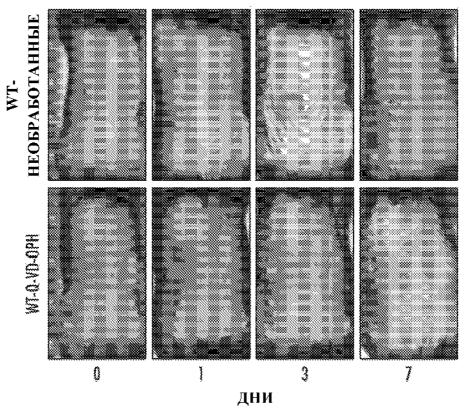
ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

- 1. Способ лечения бактериальной инфекции у пациента, включающий стадию введения пациенту эффективного количества ингибитора каспазы.
- 2. Способ лечения бактериального поражения кожи у пациента, включающий стадию введения пациенту эффективного количества ингибитора каспазы.
- 3. Способ усиления регенерации и восстановления после повреждения кожи или кишечника у пациента, включающий стадию введения эффективного количества ингибитора каспазы.
- 4. Способ лечения вирусной инфекции у пациента, включающий стадию введения пациенту эффективного количества ингибитора каспазы.
 - 5. Способ по п. 4, где вирусная инфекция представляет собой COVID19.
- 6. Способ по любому из пп. 1-5, где ингибитор каспазы представляет собой панкаспазный ингибитор.
- 7. Способ по любому из пп. 1-6, где ингибитор каспазы представляет собой Q-VD-OPh.
- 8. Способ по п. 3, где повреждение кожи или кишечника представляет собой рубец или ожог.
 - 9. Способ по п. 3, дополнительно включающий стадию введения агониста TLR3.
- 10. Применение ингибитора каспазы для получения лекарственного препарата для лечения бактериальной инфекции.
- 11. Применение ингибитора каспазы для получения лекарственного препарата для лечения бактериального поражения кожи.
- 12. Применение ингибитора каспазы для получения лекарственного препарата для лечения повреждения кожи или кишечника.
- 13. Применение ингибитора каспазы для получения лекарственного препарата для лечения рубца или ожога.
- 14. Применение ингибитора каспазы для получения лекарственного препарата для лечения вирусной инфекции.
- 15. Применение ингибитора каспазы для получения лекарственного препарата для лечения COVID-19.

По доверенности

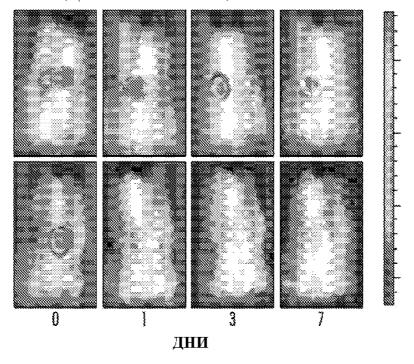
1/92

РЕПРЕЗЕНТАТИВНЫЕ ФОТОГРАФИИ

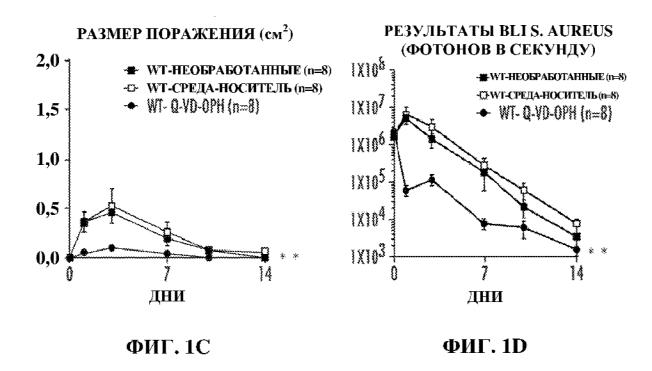


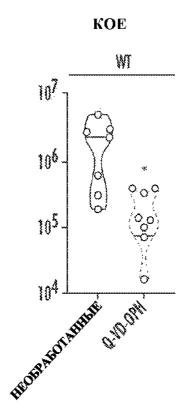
ФИГ. 1А

РЕПРЕЗЕНТАТИВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ BLI IN VIVO (ЦВЕТОВАЯ ШКАЛА)

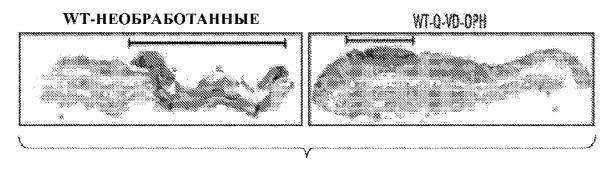


ФИГ. 1В

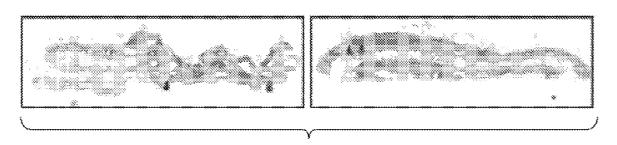




ФИГ. 1Е

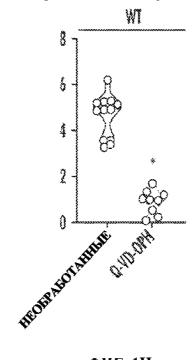


ФИГ. 1F

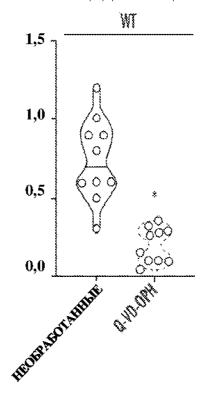


ФИГ. 1G

НЕКРОТИЧЕСКОЕ ПОРАЖЕНИЕ КОЖИ (мм)

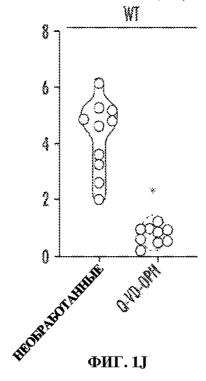


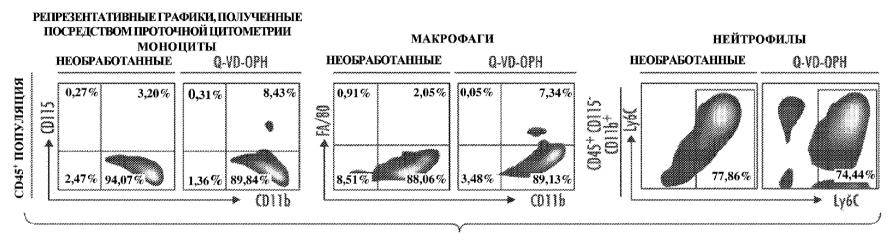
ПЛОЩАДЬ АБСЦЕССА (cm^2)



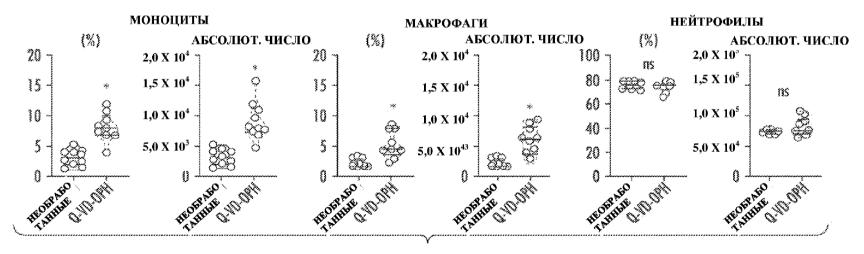
ФИГ, 1І

ДЛИНА БАКТЕРИАЛЬНОЙ ПОЛОСЫ (мм)



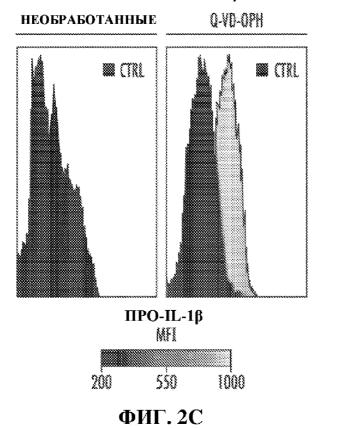


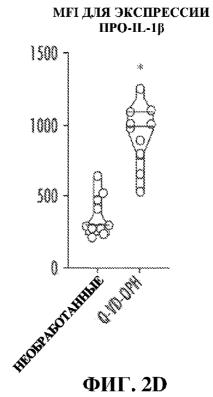
ФИГ. 2А



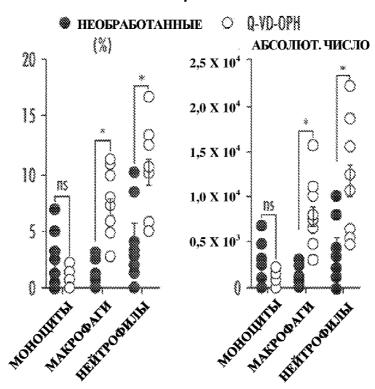
ФИГ. 2В

РЕПРЕПРЕЗЕНТАТИВНЫЕ УРОВНИ ЭКСПРЕССИИ ПРО-IL-1β





ПРО-ІІ-1β⁺ КЛЕТКИ



ФИГ. 2Е

2,0

ІІ-1В В СЫВОРОТКЕ КРОВИ $(\Pi\Gamma/M\Pi)$

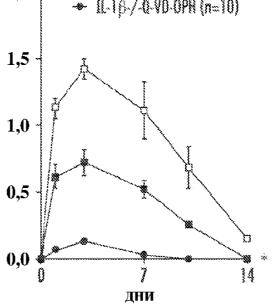
НЕОБРАБОТАННЫЕ 40 Q-YO-0PH 30 20 10 8 ДЕНЬ 1 день з

ФИГ. 2F

S. AUREUS

РАЗМЕР ПОРАЖЕНИЯ (cm²)

- **₩** WT-НЕОБРАБОТАННЫЕ (n=6)
- Ф: П.-1β-/- НЕОБРАБОТАННЫЕ (n=10)
- IL-16-/-Q-VD-0PH (n=10)



ФИГ. 2G

РЕЗУЛЬТАТЫ BLI S. AUREUS (ФОТОНОВ В СЕКУНДУ)

- WT-НЕОБРАБОТАННЫЕ (n=6)
- IL-1 β -/- НЕОБРАБОТАННЫЕ (n=10)
- 1X10⁸ IL-13-/-Q-VD-0PH (n=10) IXIO) 1X106 1X105 1X104 11102 Ż 14 дни

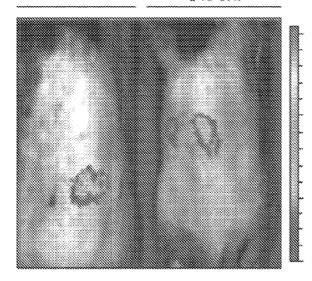
ФИГ. 2Н

РЕПРЕЗЕНТАТИВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ BLI IN VIVO (ЦВЕТОВАЯ ШКАЛА)

6 ЧАСОВ

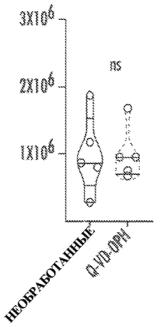
НЕОБРАБОТАННЫЕ

Q-VD-0PH



ФИГ. ЗА

PE3УЛЬТАТЫ BLI S. AUREUS (ФОТОНОВ В СЕКУНДУ)



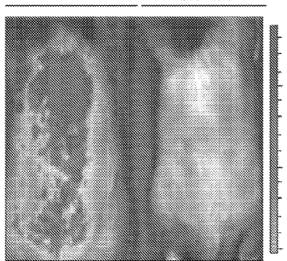
ФИГ. ЗВ

РЕПРЕЗЕНТАТИВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ BLI IN VIVO (ЦВЕТОВАЯ ШКАЛА)

6 ЧАСОВ

НЕОБРАБОТАННЫЕ

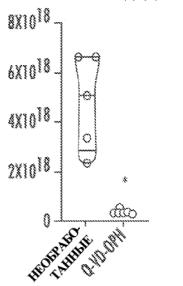
Q-VO-0PH



ФИГ. 3С

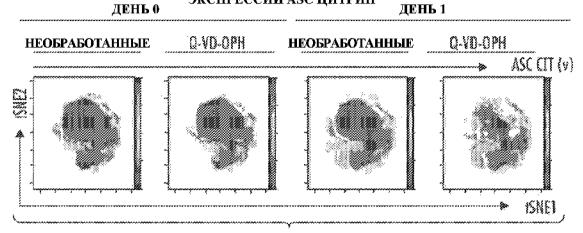
ОБЩАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИЗЛУЧЕНИЯ

 $(\Phi O T O H O B B C E K Y H Д Y) / (M K B T / c M^2)$



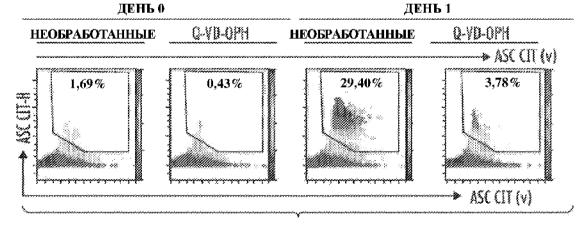
ФИГ. 3D

РЕПРЕЗЕНТАТИВНЫЕ ГРАФИКИ, ПОЛУЧЕННЫЕ ПОСРЕДСТВОМ vSNE, ЭКСПРЕССИИ ASC ЦИТРИН



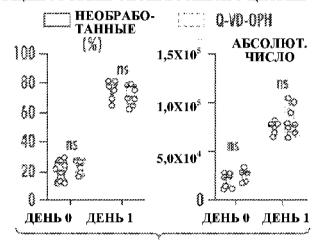
ФИГ. ЗЕ

РЕПРЕЗЕНТАТИВНЫЕ ГРАФИКИ, ПОЛУЧЕННЫЕ ПОСРЕДСТВОМ vSNE, ОБРАЗОВАНИЯ «КРАПИНОК» ASC



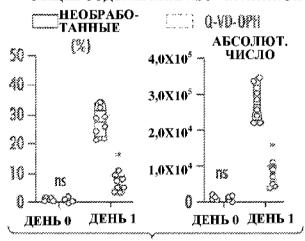
ФИГ. 3G

ОБЩИЙ УРОВЕНЬ ЭКСПРЕССИИ ASC-ЦИТРИН



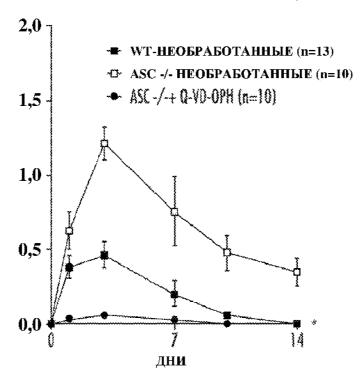
ФИГ. 3F

ОБЩЕЕ СОДЕРЖАНИЕ ASC-«КРАПИНОК»



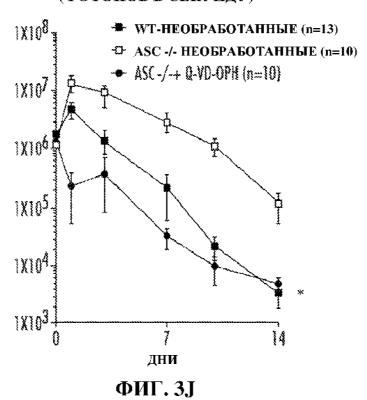
ФИГ. ЗН

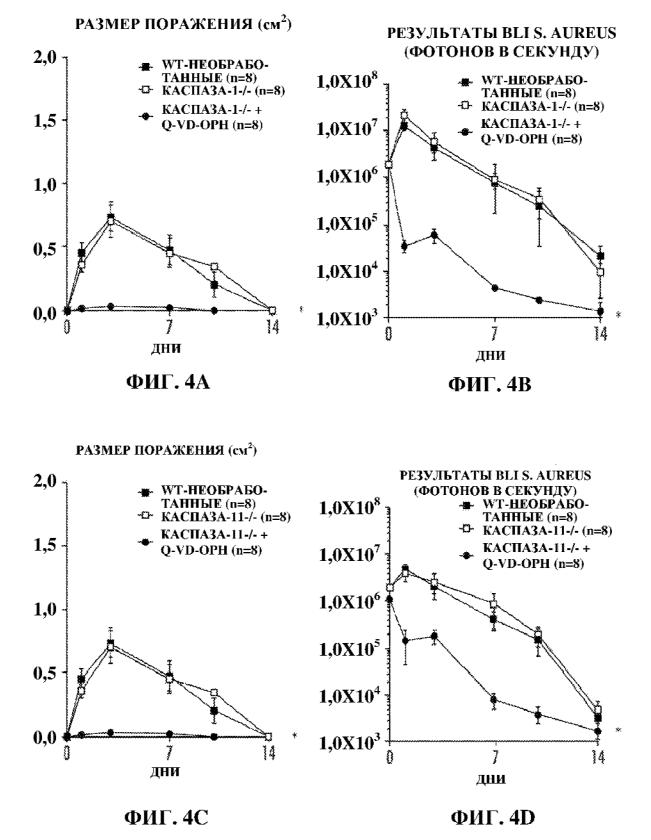
РАЗМЕР ПОРАЖЕНИЯ (cм²)

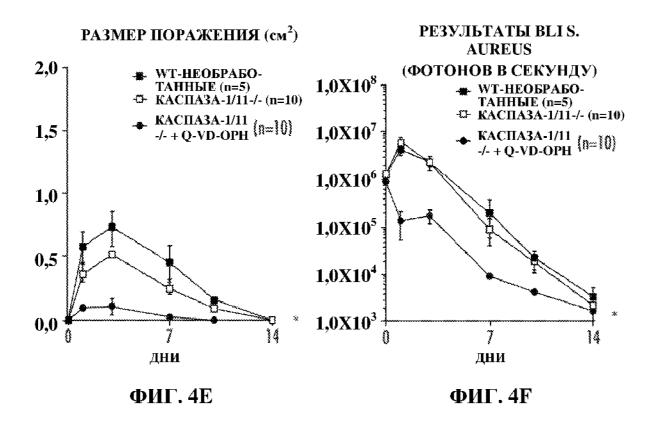


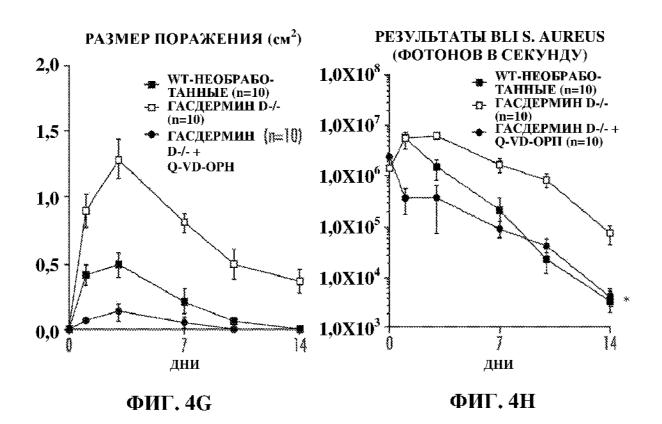
ФИГ. 3І

PEЗУЛЬТАТЫ BLI S. AUREUS (ФОТОНОВ В СЕКУНДУ)

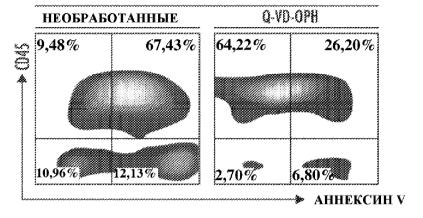








РЕПРЕЗЕНТАТИВНЫЕ ГРАФИКИ, ПОЛУЧЕННЫЕ ПОСРЕДСТВОМ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ, SSC - СИНГЛЕТЫ

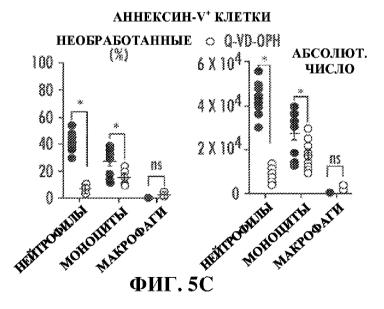


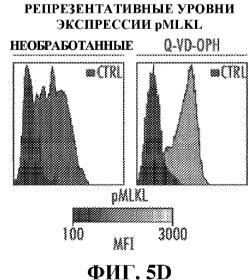
100 - (%)
80 - 8 x 10⁴ - (ЧИСЛО)
8 x 10⁴ - 6 x 10

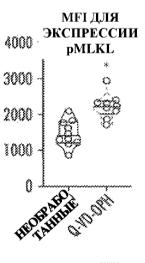
ОБЩЕЕ СОДЕРЖАНИЕ АННЕКСИН-V* КЛЕТОК

ФИГ. 5А

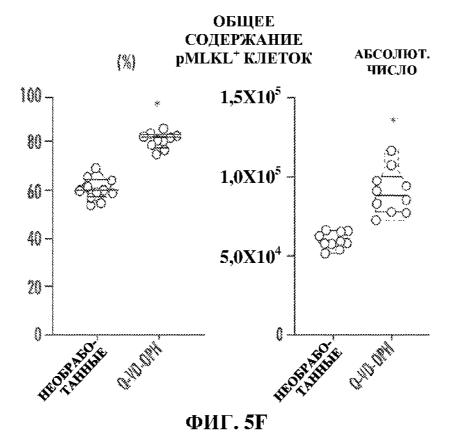
ФИГ. 5В

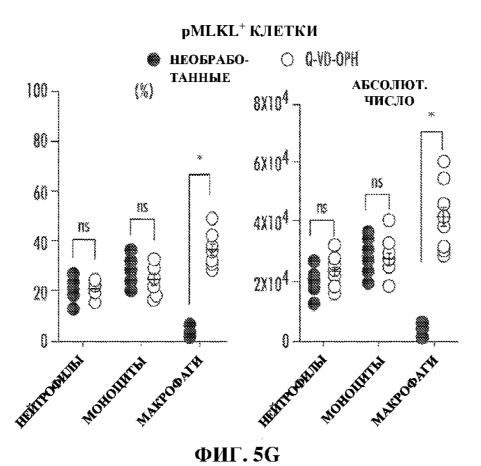




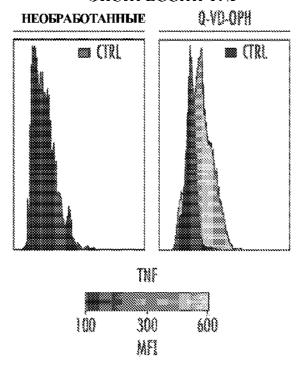


5D ФИГ. 5E





РЕПРЕЗЕНТАТИВНЫЕ УРОВНИ ЭКСПРЕССИИ TNF

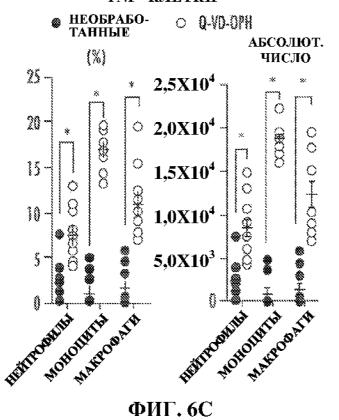


ФИГ. 6А

ФИГ. 6В

TNF B CЫВОРОТКЕ

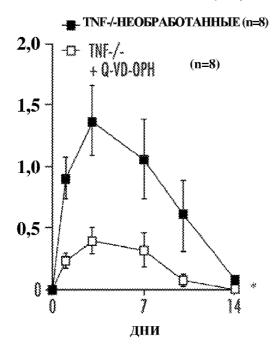
TNF⁺ КЛЕТКИ



КРОВИ (пг/мл) • НЕОБРАБОТАННЫЕ • Q-VD-ОРН 400 ДЕНЬ 1 ДЕНЬ 3 S. AUREUS

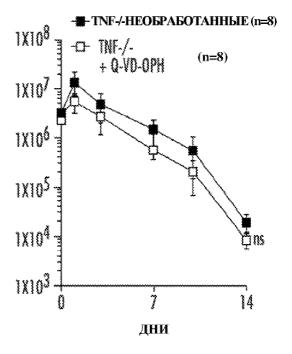
ФИГ. 6D

РАЗМЕР ПОРАЖЕНИЯ (cм²)



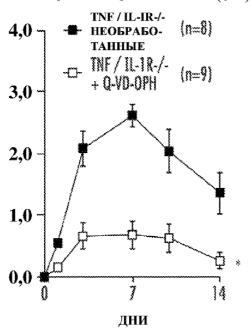
ФИГ. 6Е

РЕЗУЛЬТАТЫ BLI S. AUREUS (ФОТОНОВ В СЕКУНДУ)



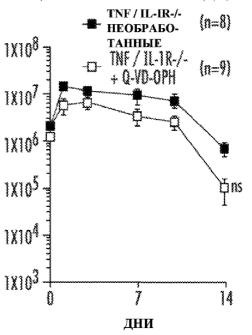
ФИГ. 6F

РАЗМЕР ПОРАЖЕНИЯ (cm²)

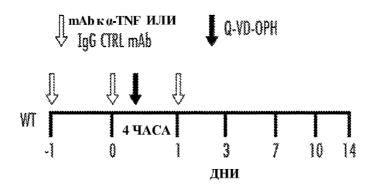


ФИГ. 6G

РЕЗУЛЬТАТЫ BLI S. AUREUS (ФОТОНОВ В СЕКУНДУ)

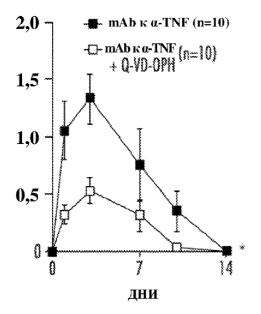


ФИГ. 6Н



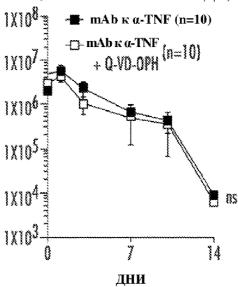
ФИГ. 6І

РАЗМЕР ПОРАЖЕНИЯ (cм²)



ФИГ. 6Ј

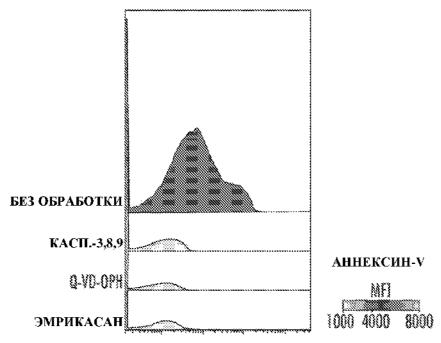
РЕЗУЛЬТАТЫ BLI S. AUREUS (ФОТОНОВ В СЕКУНДУ)



ФИГ. 6К

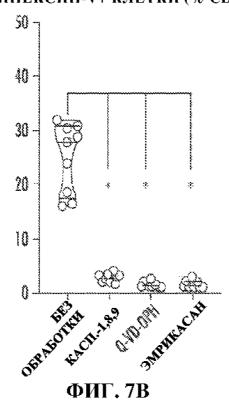
РЕПРЕЗЕНТАТИВНЫЕ УРОВНИ ЭКСПРЕССИИ АННЕКСИНА-V

CD11b⁺ AHHEКСИН-V⁺

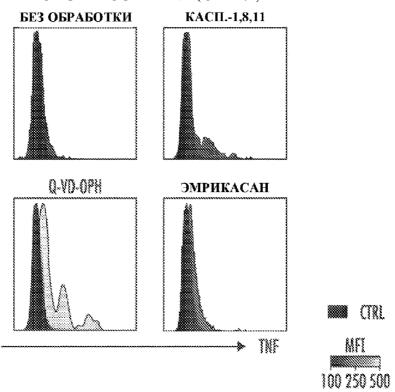


ФИГ. 7А

АННЕКСИН-V+ КЛЕТКИ (% CD11b+)

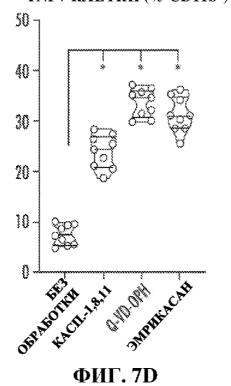


РЕПРЕЗЕНТАТИВНЫЕ УРОВНИ ЭКСПРЕССИИ TNF (CD11b⁺)

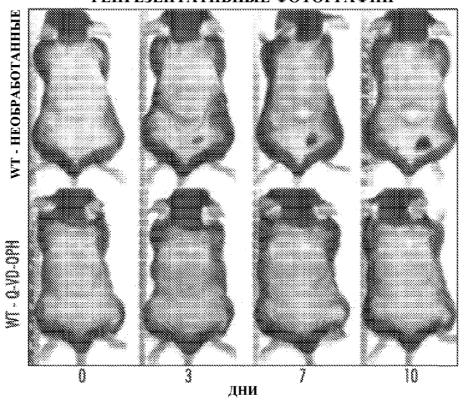


ФИГ. 7С

TNF+ КЛЕТКИ (% CD11b⁺)

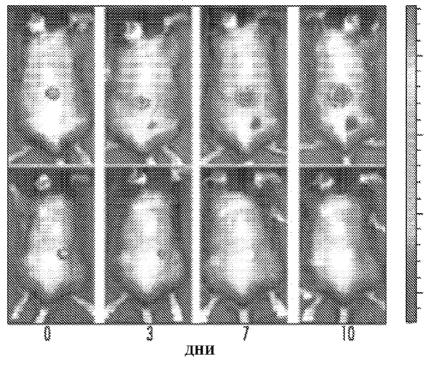


РЕПРЕЗЕНТАТИВНЫЕ ФОТОГРАФИИ

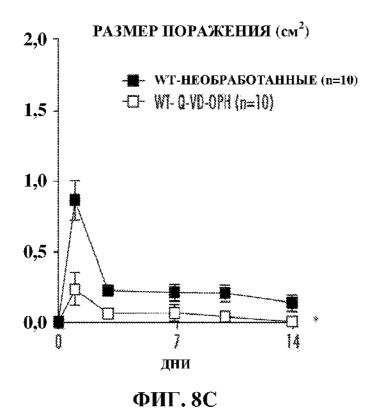


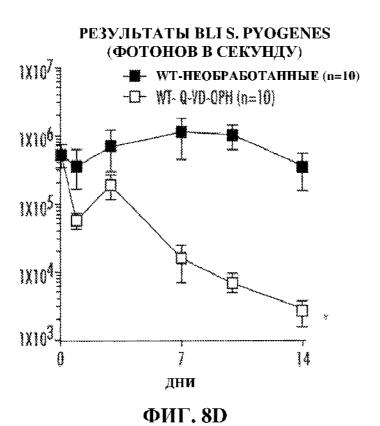
ФИГ. 8А

РЕПРЕЗЕНТАТИВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ BLI IN VIVO (ЦВЕТОВАЯ ШКАЛА)

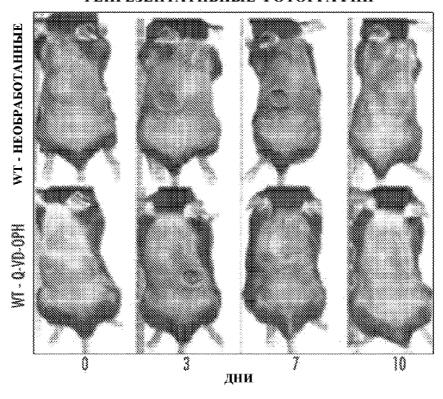


ФИГ. 8В



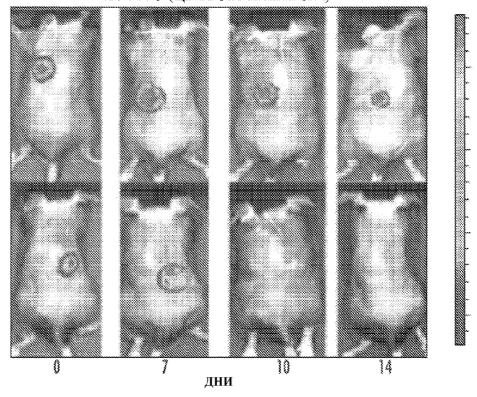


РЕПРЕЗЕНТАТИВНЫЕ ФОТОГРАФИИ



ФИГ. 8Е

РЕПРЕЗЕНТАТИВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ BLI IN VIVO (ЦВЕТОВАЯ ШКАЛА)



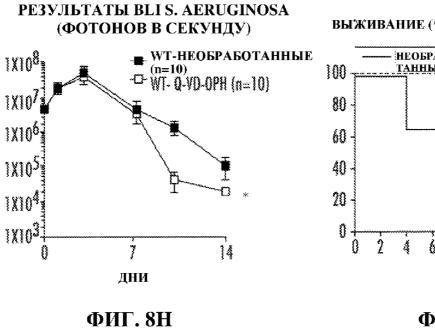
ФИГ. 8F

ФИГ. 8G

7

дни

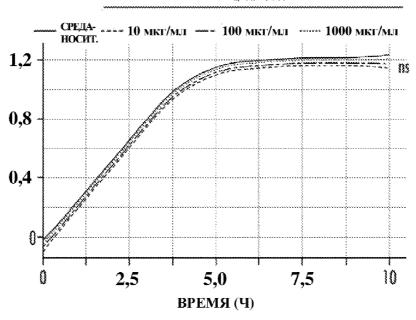
14



ФИГ. 8І

S. AUREUS (OD_{600})

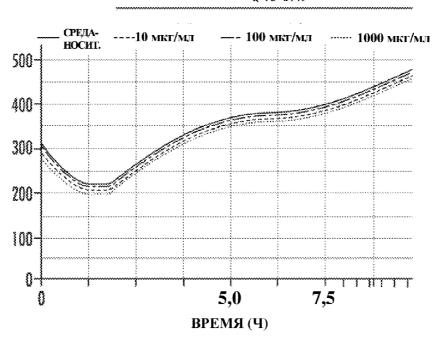
Q-VD-OPH



ФИГ. 9А

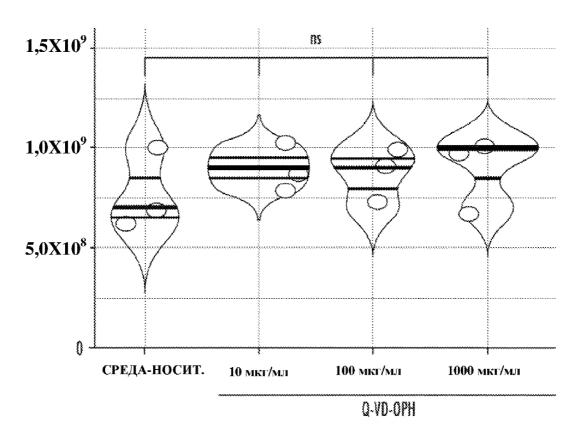
S. AUREUS (JIM)

Q-VD-OPH

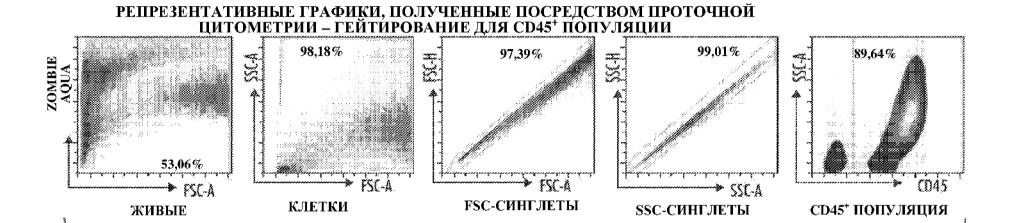


ФИГ. 9В

S. AUREUS (KOE)

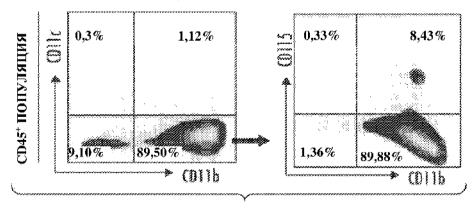


ФИГ. 9С



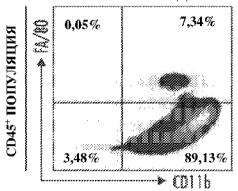
РЕПРЕЗЕНТАТИВНЫЕ ГРАФИКИ, ПОЛУЧЕННЫЕ ПОСРЕДСТВОМ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ – ГЕЙТИРОВАНИЕ ДЛЯ МОНОЦИТОВ

ФИГ. 10А



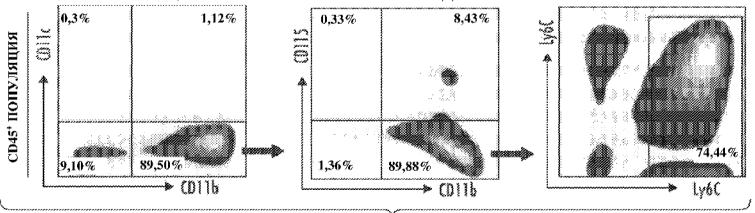
ФИГ. 10В

РЕПРЕЗЕНТАТИВНЫЕ ГРАФИКИ, ПОЛУЧЕННЫЕ ПОСРЕДСТВОМ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ – ГЕЙТИРОВАНИЕ ДЛЯ МАКРОФАГОВ



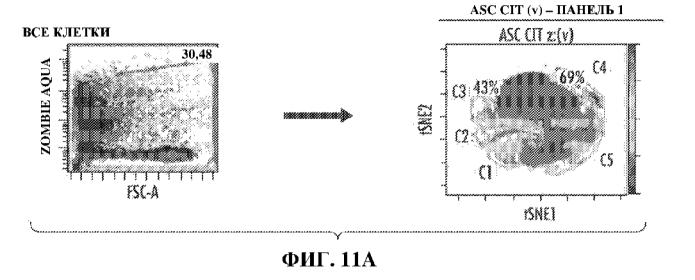
ФИГ. 10С

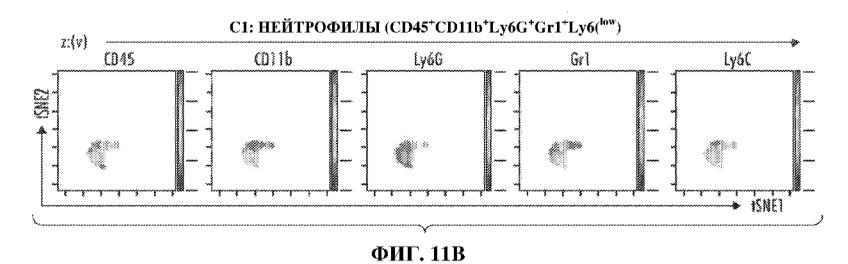
РЕПРЕЗЕНТАТИВНЫЕ ГРАФИКИ, ПОЛУЧЕННЫЕ ПОСРЕДСТВОМ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ – ГЕЙТИРОВАНИЕ ДЛЯ НЕЙТРОФИЛОВ

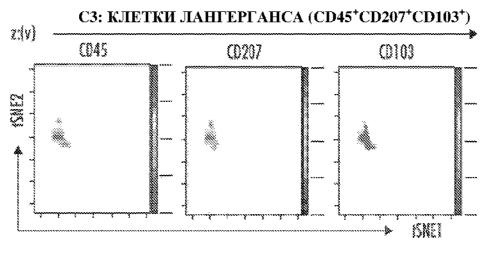


ФИГ. 10D

РЕПРЕЗЕНТАТЫВНЫЙ ГРАФИК, ПОЛУЧЕННЫЙ ПОСРЕДСТВОМ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ, И КАРТА, ПОЛУЧЕННАЯ ПОСРЕДСТВОМ vSNE, ПОКАЗЫВАБЩИЕ КЛАСТЕРЫ КЛЕТОК, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ ASC CIT:

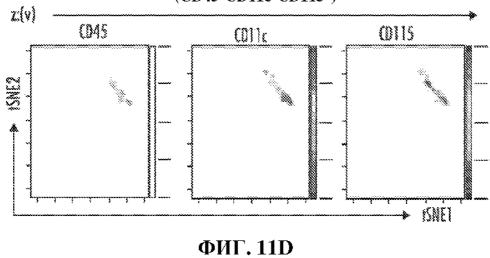






ФИГ. 11С





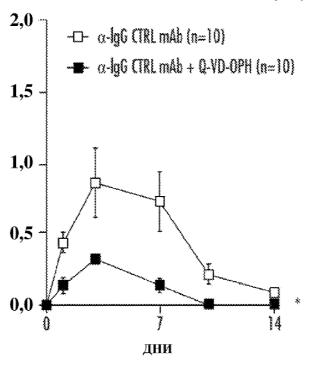
С5: МОНОЦИТЫ (CD45⁺CD11b⁺CD115⁺)

(Q45

(Q115

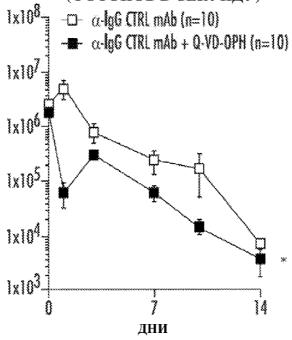
ФИГ. 11E

РАЗМЕР ПОРАЖЕНИЯ (cm²)



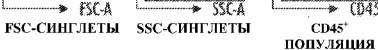
ФИГ. 12А

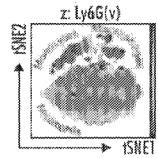
РЕЗУЛЬТАТЫ BLI S. AUREUS (ФОТОНОВ В СЕКУНДУ)



ФИГ. 12В

РЕПРЕЗЕНТАТИВНЫЕ ГРАФИКИ, ПОЛУЧЕННЫЕ ПОСРЕДСТВОМ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ – ГЕЙТИРОВАНИЕ ДЛЯ СО45⁺ ПОПУЛЯЦИИ 2. Ly 38,29% 98,91% 99,89% 79,74%





МОНОЦИТЫ – CD45⁺CD11b⁺CD115⁺
МАКРОФАГИ - CD45⁺CD11b⁺F4/80⁺
НЕЙТРОФИЛЫ - CD45⁺CD11b⁺CD115⁺
Ly6G⁺Ly6G^{10wmood}

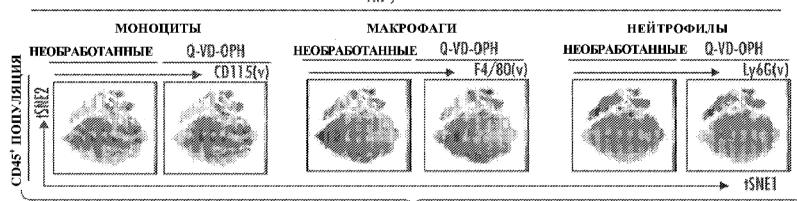
ФИГ. 13А

РЕПРЕЗЕНТАТИВНЫЕ ГРАФИКИ, ПОЛУЧЕННЫЕ ПОСРЕДСТВОМ vSNE

FSC-A

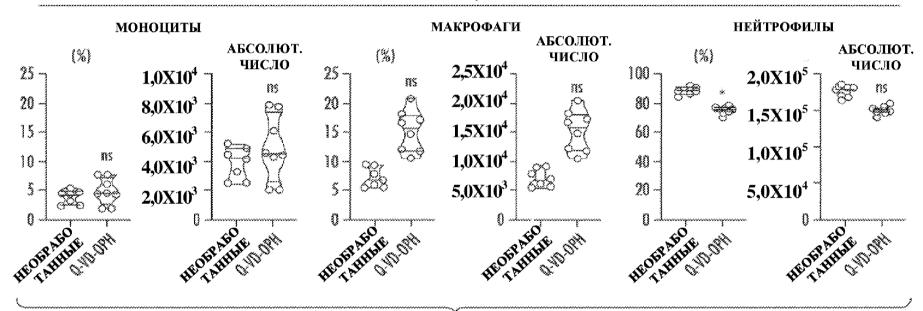
живые

TNF-/-



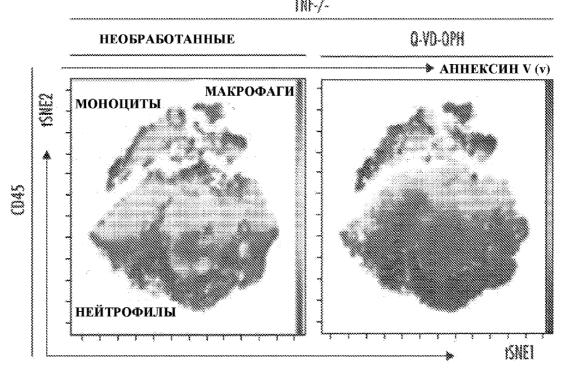
ФИГ. 13В





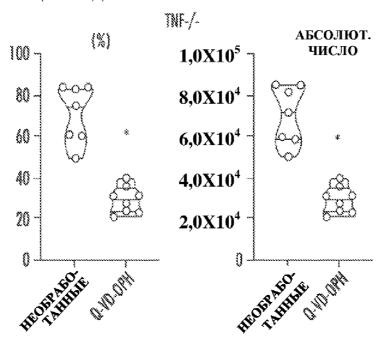
ФИГ. 13С

РЕПРЕЗЕНТАТИВНЫЕ ГРАФИКИ, ПОЛУЧЕННЫЕ ПОСРЕДСТВОМ vSNE, ПОКАЗЫВАЮЩИЕ УРОВНИ ЭКСПРЕССИИ АННЕКСИНА V



ФИГ. 14А

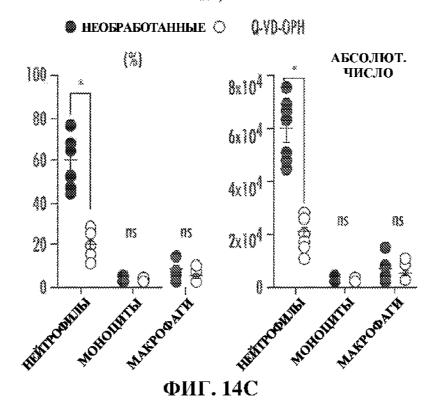
ОБЩЕЕ СОДЕРЖАНИЕ АННЕКСИН-V⁺ КЛЕТОК



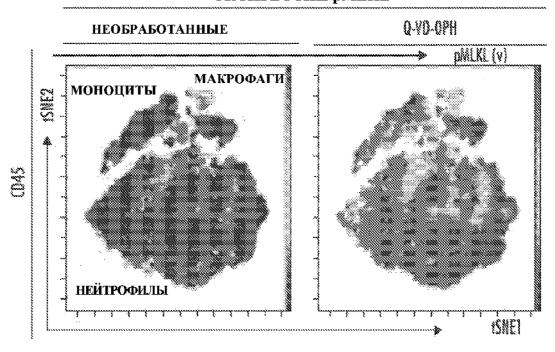
ФИГ. 14В

34/92

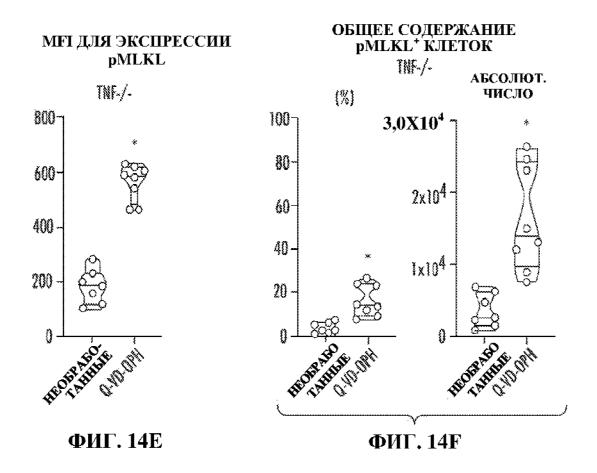
АННЕКСИН-V⁺ КЛЕТКИ ™-/-

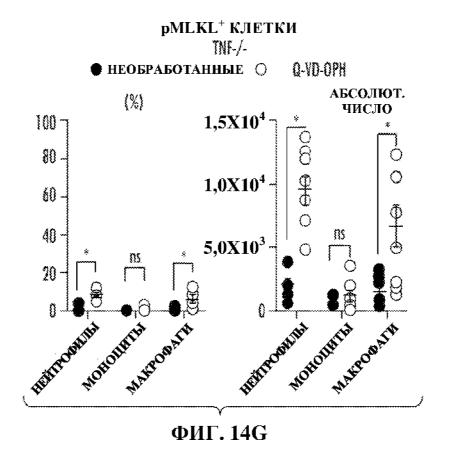


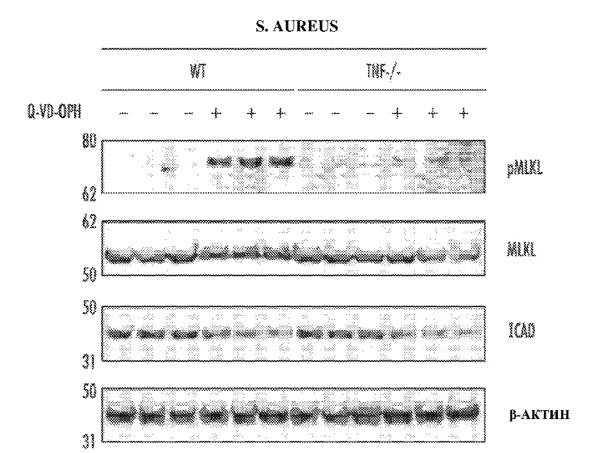
РЕПРЕЗЕНТАТИВНЫЕ ГРАФИКИ, ПОЛУЧЕННЫЕ ПОСРЕДСТВОМ vSNE, ПОКАЗЫВАЮЩИЕ УРОВНИ ЭКСПРЕССИИ pMLKL



ФИГ. 14D

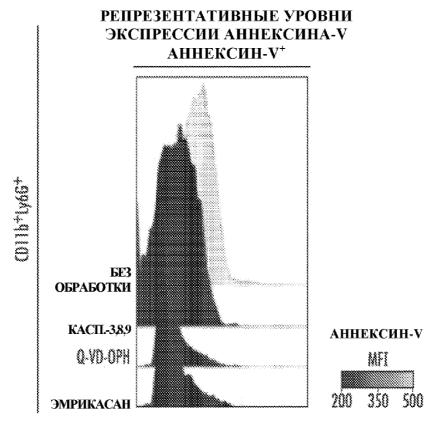






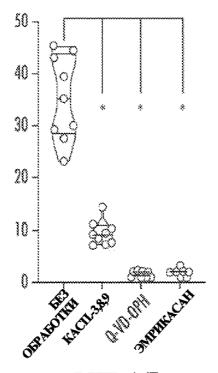
ФИГ. 15

37/92



ФИГ. 16А

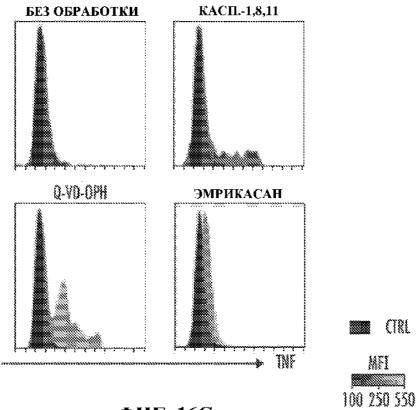
АННЕКСИН-V+ (CD11 b^+ Ly6 G^+)



ФИГ. 16В

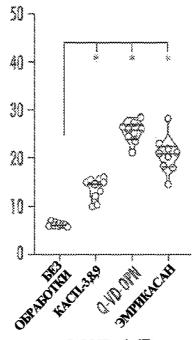
38/92

РЕПРЕЗЕНТАТИВНЫЕ УРОВНИ ЭКСПРЕССИИ TNF (CD11b $^+$ Ly6G $^+$)



ФИГ. 16С

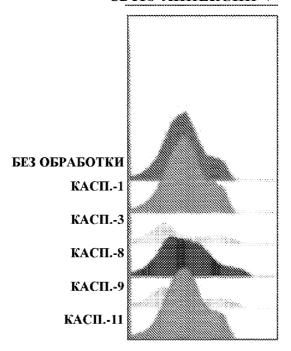
 $TNF + KЛЕТКИ (CD11b^{\dagger}Ly6G^{\dagger})$



ФИГ. 16D

39/92

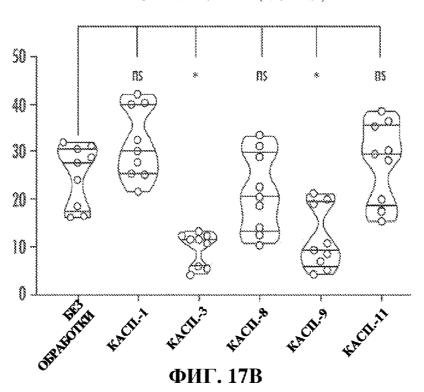
РЕПРЕЗЕНТАТИВНЫЕ УРОВНИ ЭКСПРЕССИИ АННЕКСИНА-V CD11b⁺AHHEKCИH-V⁺



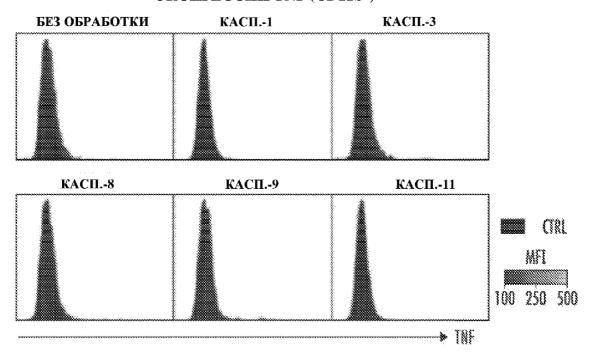


ФИГ. 17А

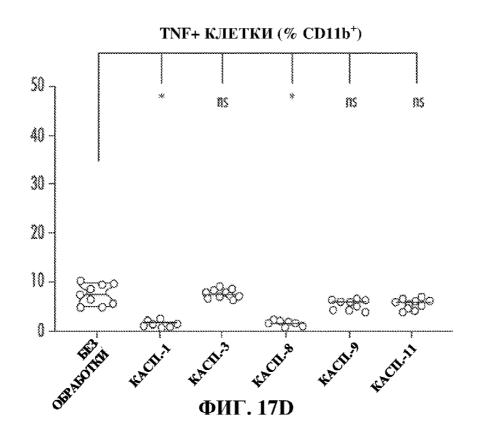
АННЕКСИН- $V + KЛЕТКИ (%CD11b^+)$



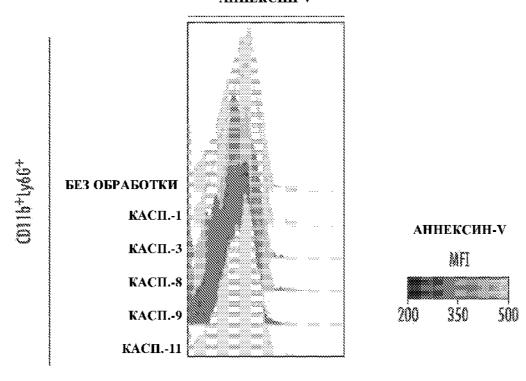
РЕПРЕЗЕНТАТИВНЫЕ УРОВНИ ЭКСПРЕССИИ TNF (CD11b⁺)



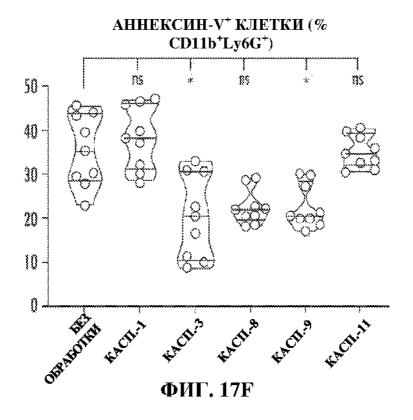
ФИГ. 17С



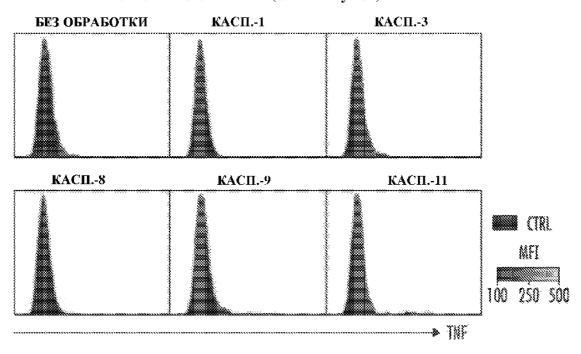
РЕПРЕЗЕНТАТИВНЫЕ УРОВНИ ЭКСПРЕССИИ АННЕКСИНА-V АННЕКСИН-V⁺



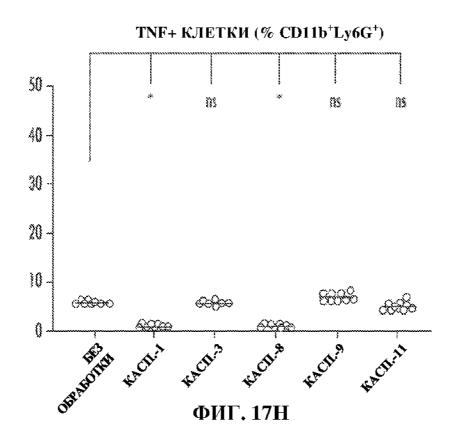
ФИГ. 17Е



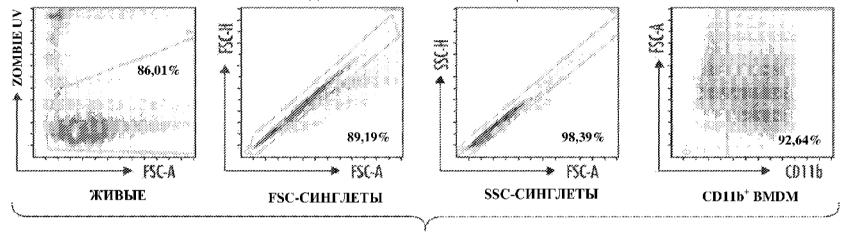
РЕПРЕЗЕНТАТИВНЫЕ УРОВНИ ЭКСПРЕССИИ TNF (CD11b⁺Ly6G⁺)



ФИГ. 17G

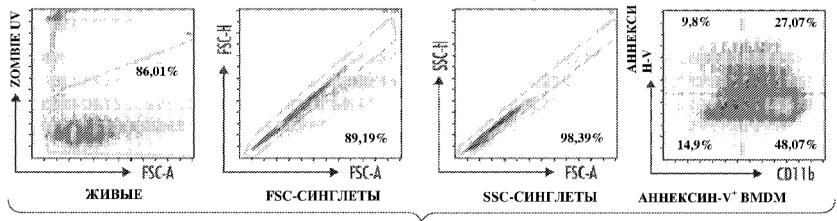


РЕПРЕЗЕНТАТИВНЫЕ ГРАФИКИ, ПОЛУЧЕННЫЕ ПОСРЕДСТВОМ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ – ГЕЙТИРОВАНИЕ ДЛЯ СD11b $^{+}$ ВМDM ПОПУЛЯЦИИ



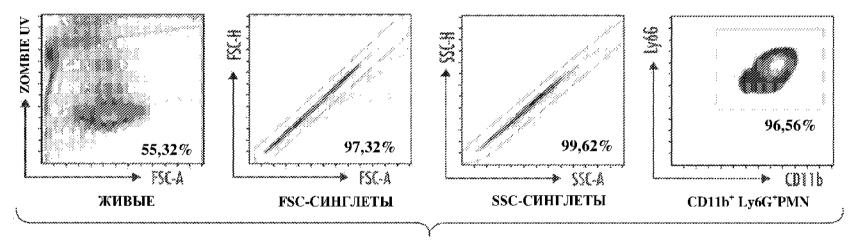
ФИГ. 18А

РЕПРЕЗЕНТАТИВНЫЕ ГРАФИКИ, ПОЛУЧЕННЫЕ ПОСРЕДСТВОМ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ - ГЕЙТИРОВАНИЕ ДЛЯ СО116 $^+$ ВМОМ АННЕКСИН-V $^+$ ПОПУЛЯЦИИ



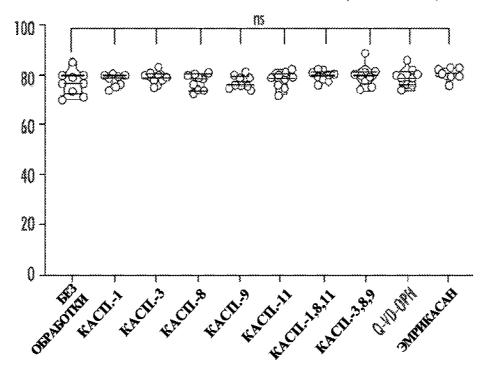
ФИГ. 18В

РЕПРЕЗЕНТАТИВНЫЕ ГРАФИКИ, ПОЛУЧЕННЫЕ ПОСРЕДСТВОМ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ - ГЕЙТИРОВАНИЕ ДЛЯ СD11Ь* ПОПУЛЯЦИИ PMN В КОСТНОМ МОЗГЕ МЫШИ

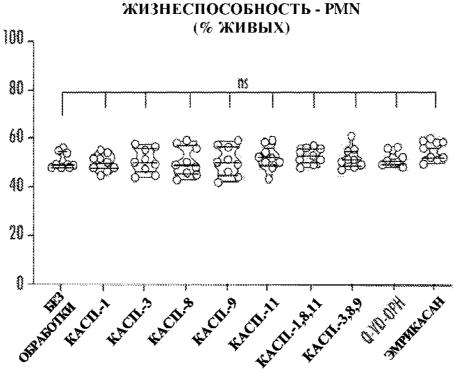


ФИГ. 18С



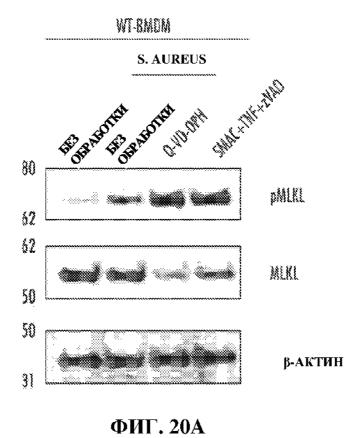


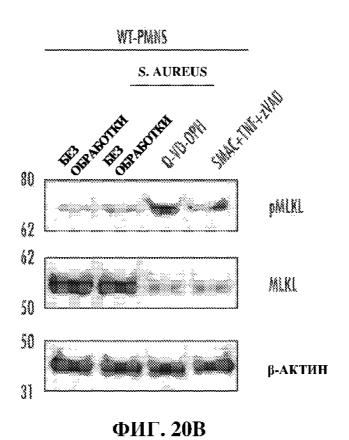
ФИГ. 19А



ФИГ. 19В

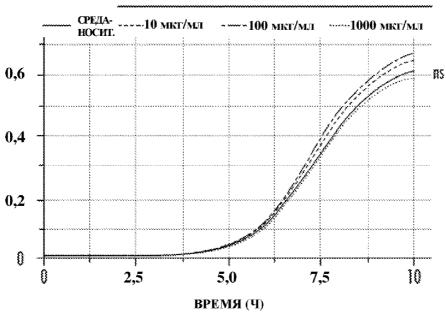
46/92





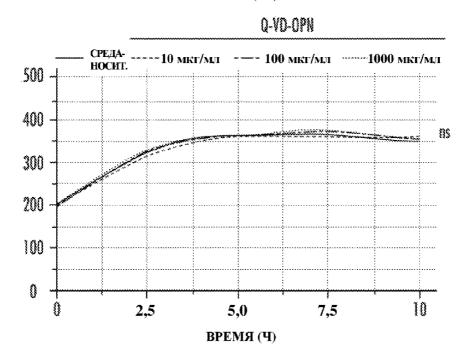
S. PYOGENES (OD_{600})





ФИГ. 21А

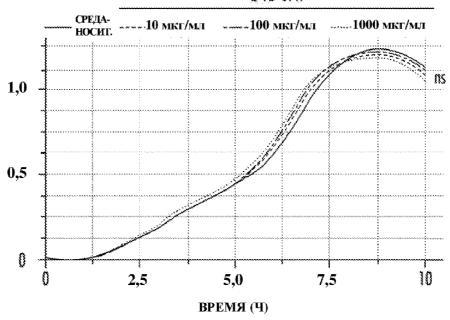
S. PYOGENES (JIM)



ФИГ. 21В

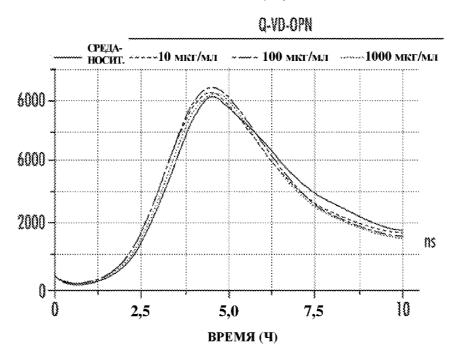
P. AERUGINOSA (OD₆₀₀)

Q-VD-OPN

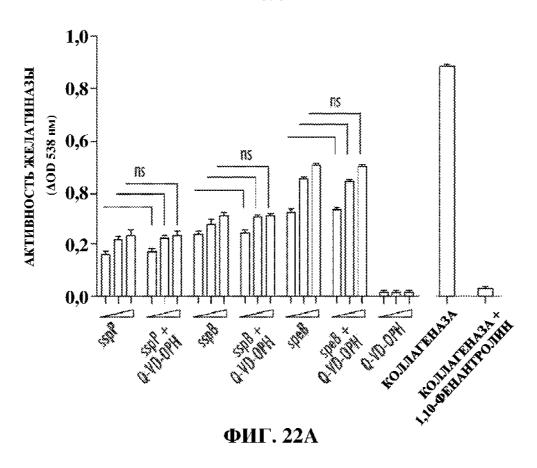


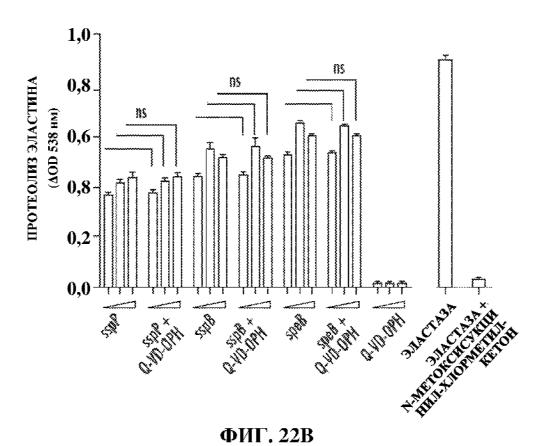
ФИГ. 21С

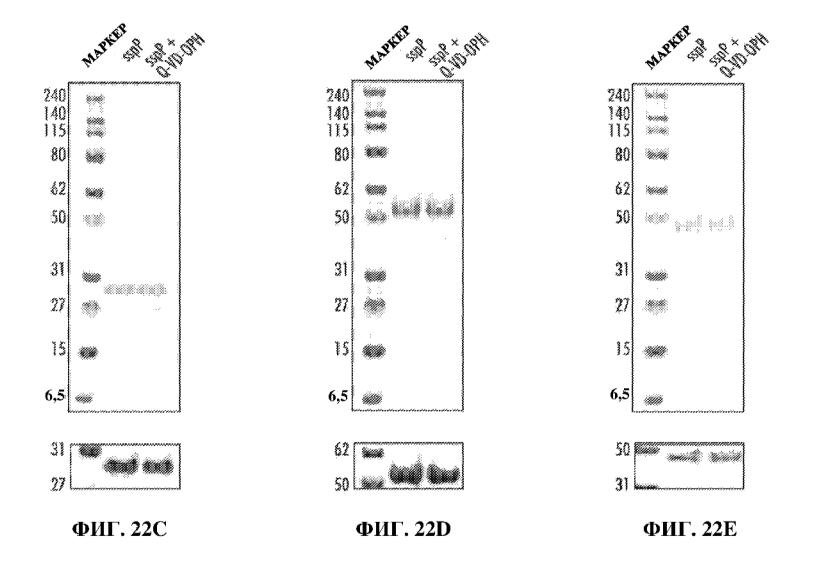
P. AERUGINOSA (лм)



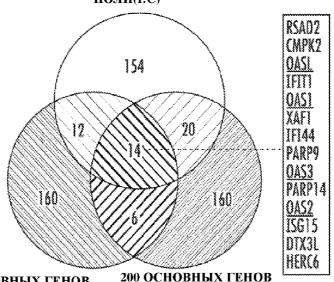
ФИГ. 21D







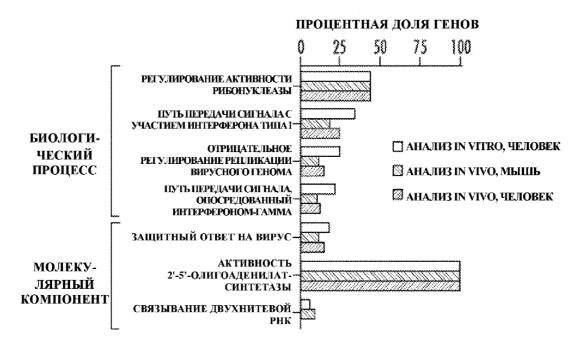
200 ОСНОВНЫХ ГЕНОВ МАТРИЧНЫЙ АНАЛИЗ IN VITRO С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МАТЕРИАЛОВ, ПОЛУЧЕННЫХ ОТ ЛЮДЕЙ, С ОБРАБОТКОЙ С ПОМОЩЬЮ ПОЛИ(I:C)



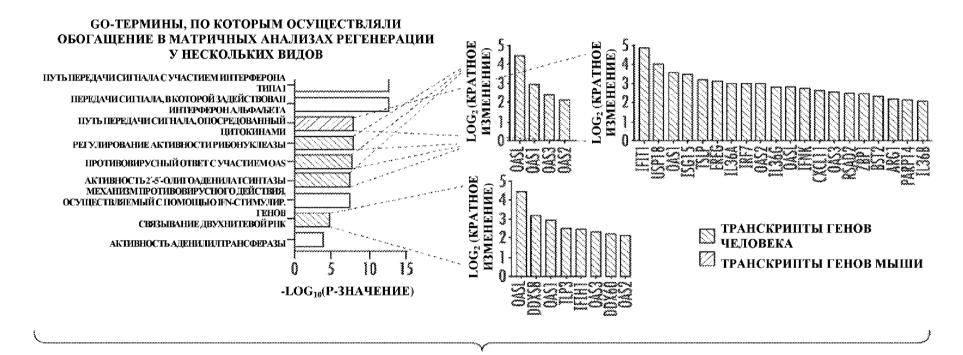
200 ОСНОВНЫХ ГЕНОВ 20 МАТРИЧНЫЙ АНАЛИЗ IN VIVO С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МАТЕРИАЛОВ, ПОЛУЧЕННЫХ ОТ МЫШЕЙ С ВЫСОКИМ УРОВНЕМ РЕГЕНЕРАЦИИ

МАТРИЧНЫЙ АНАЛИЗ IN VIVO С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МАТЕРИАЛОВ, ПОЛУЧЕННЫХ ОТ ЛЮДЕЙ, ПОДВЕРГНУТЫХ ВОЗДЕЙСТВИЮ ОМОЛАЖИВАЮЩЕГО ЛАЗЕРА

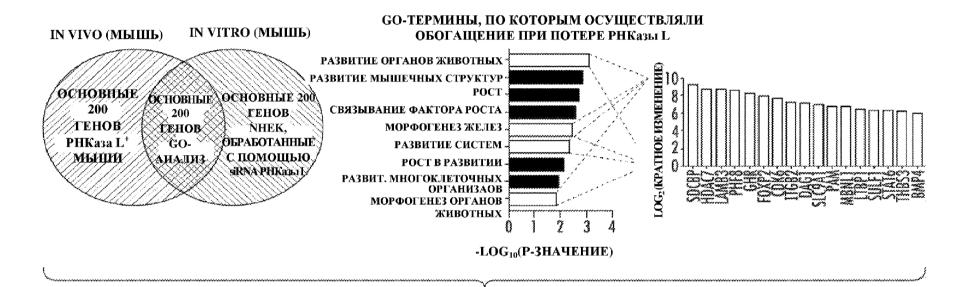
ФИГ. 23А



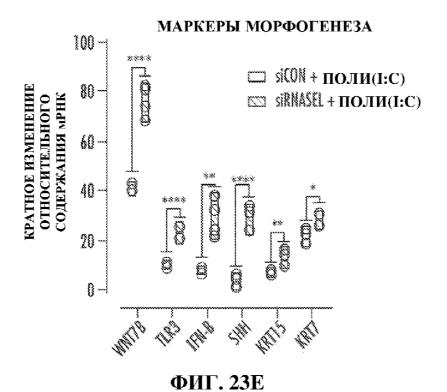
ФИГ. 23В

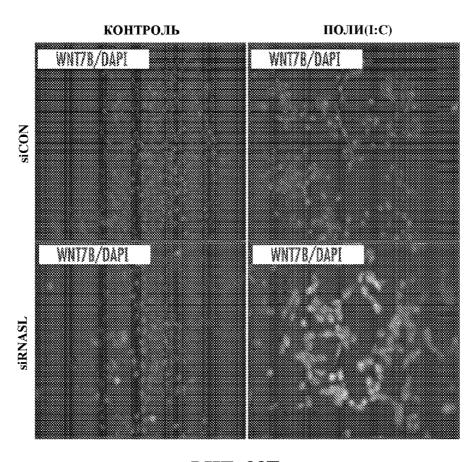


ФИГ. 23С



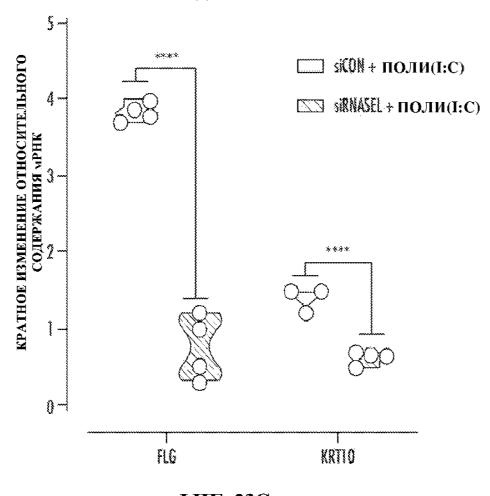
ФИГ. 23D



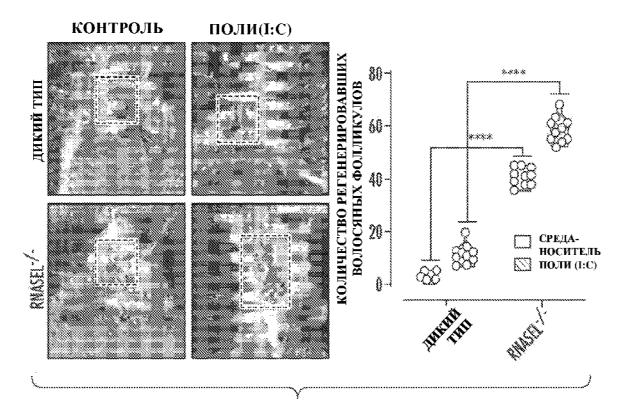


ФИГ. 23F

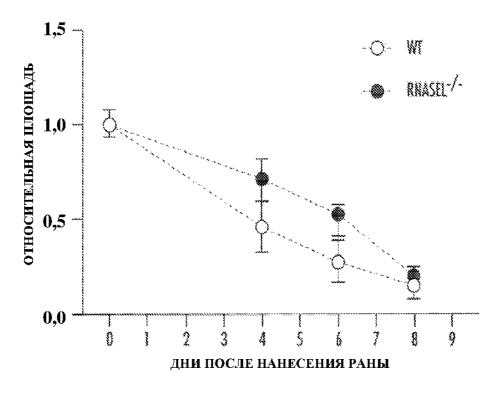
маркеры дифференцировки



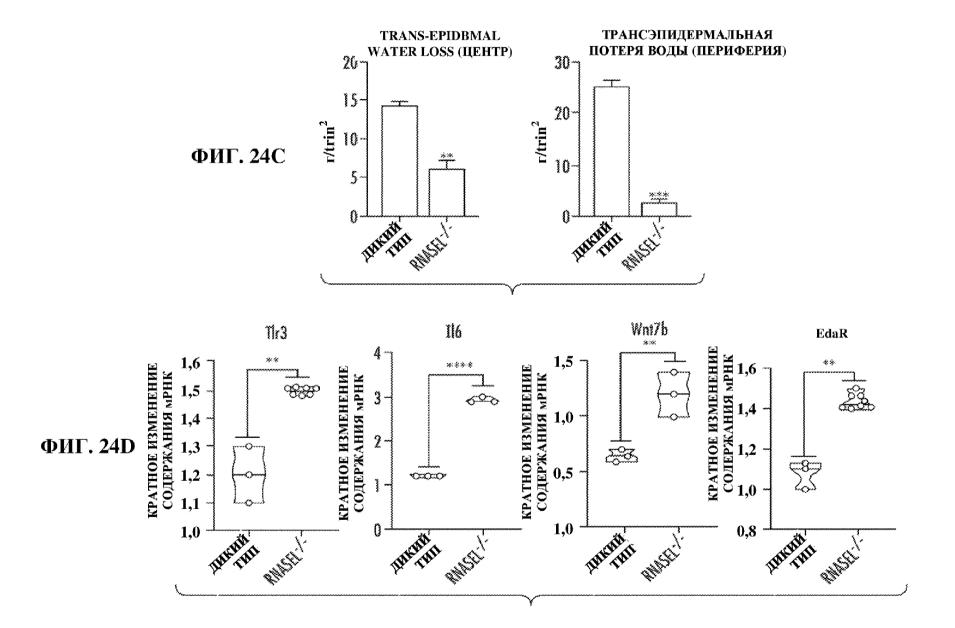
ФИГ. 23G

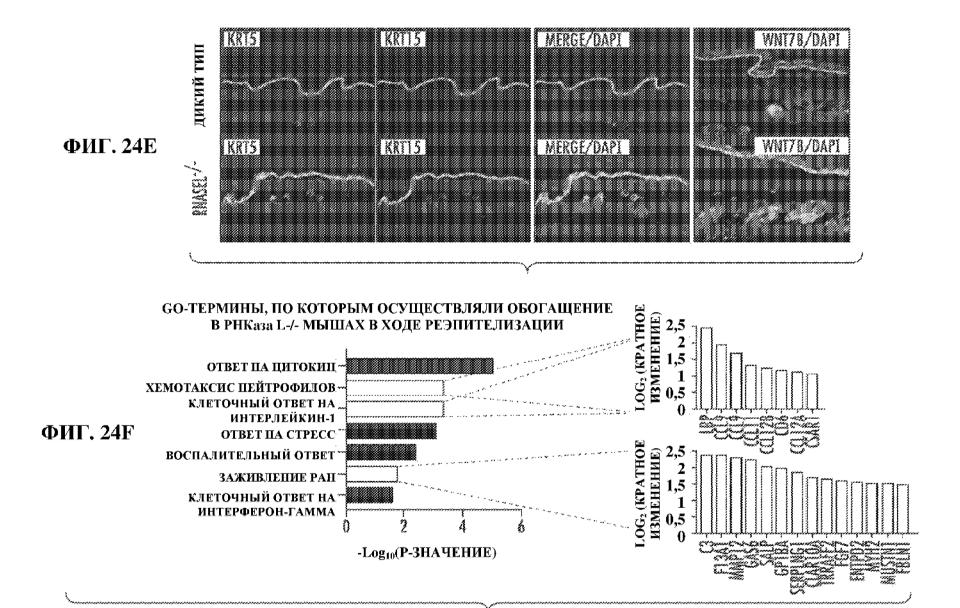


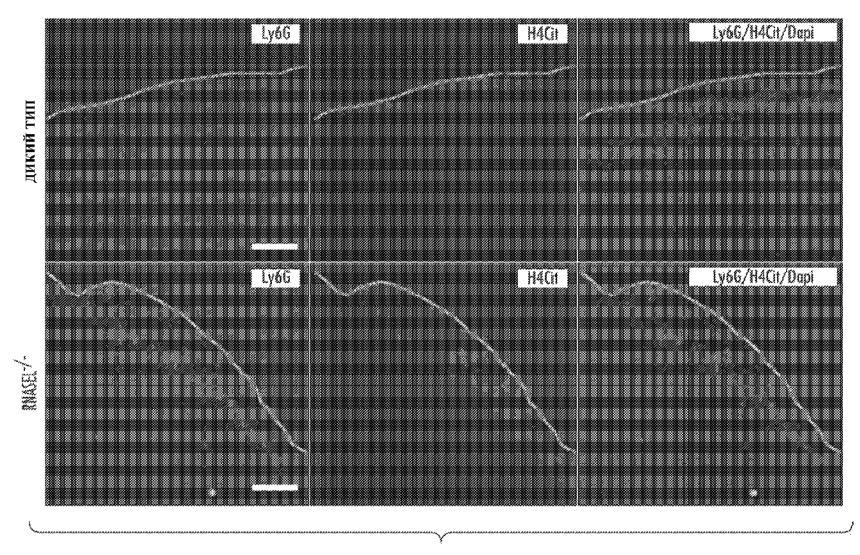
ФИГ. 24А



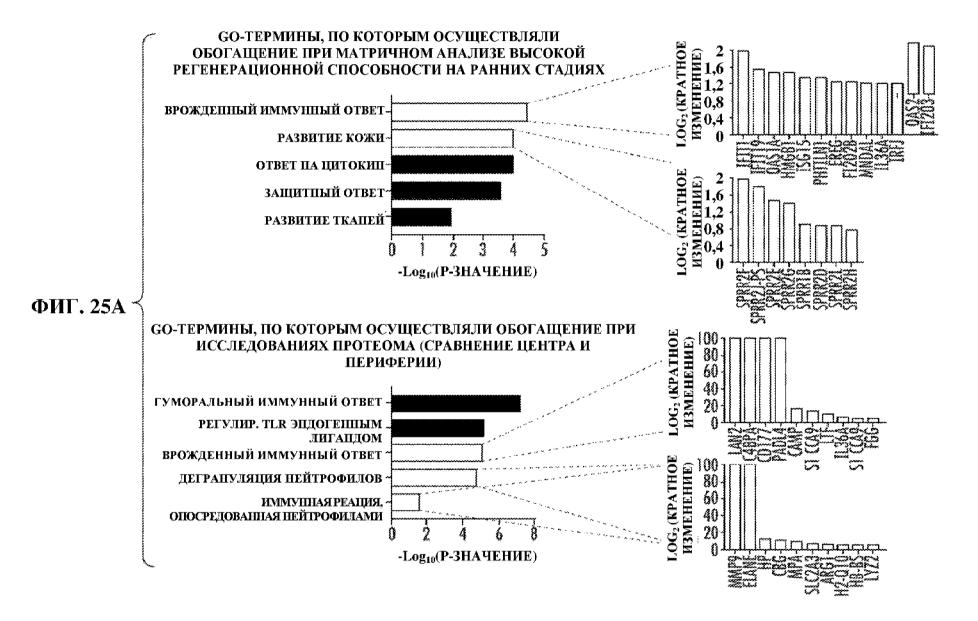
ФИГ. 24В

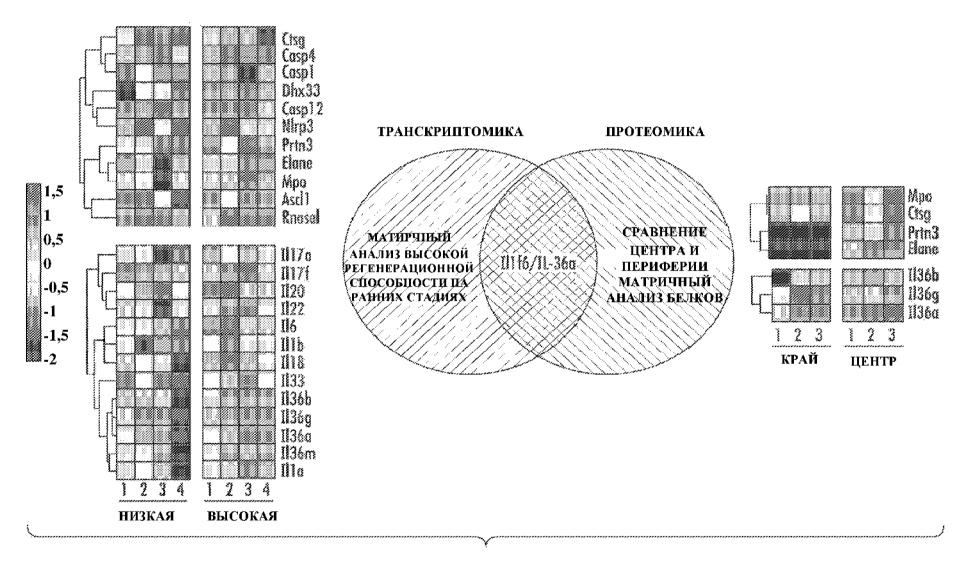




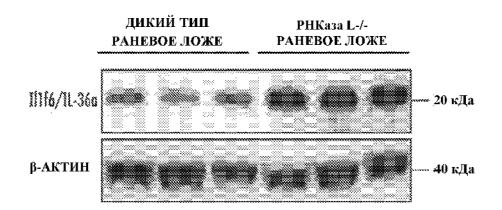


ФИГ. 24G

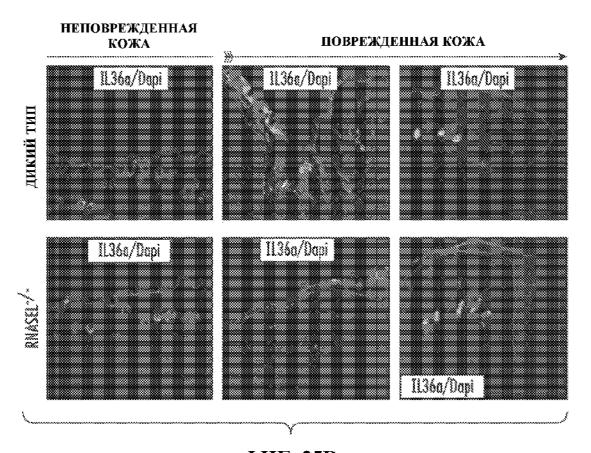




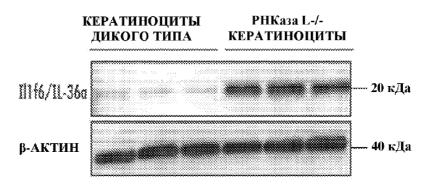
ФИГ. 25В



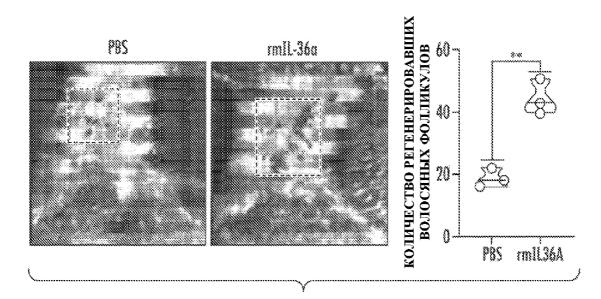
ФИГ. 25С



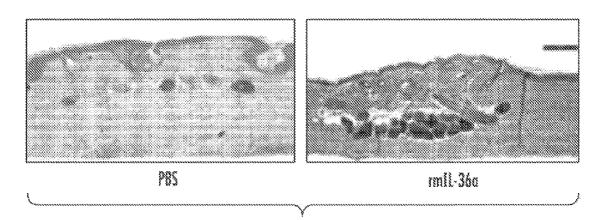
ФИГ. 25D



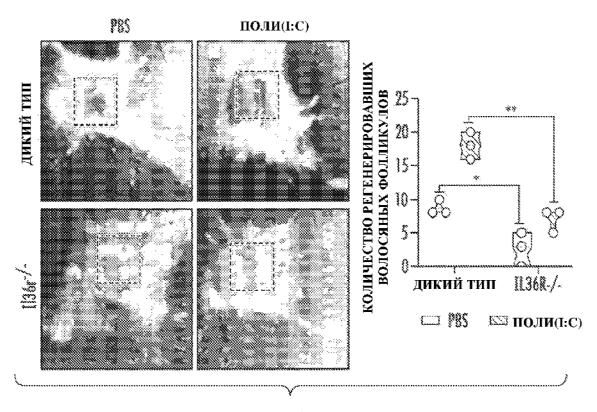
ФИГ. 25Е



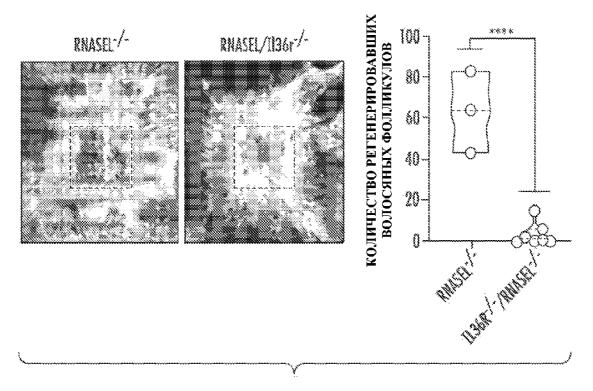
ФИГ. 25F



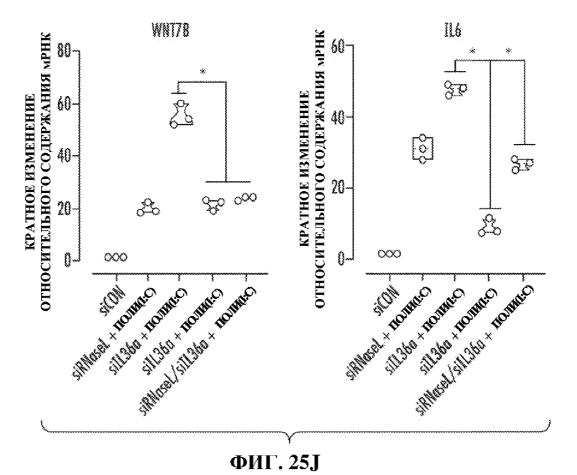
ФИГ. 25G

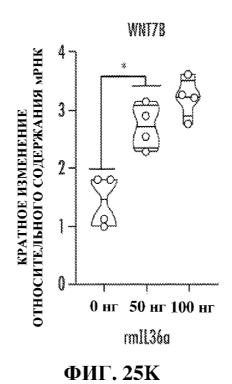


ФИГ. 25Н

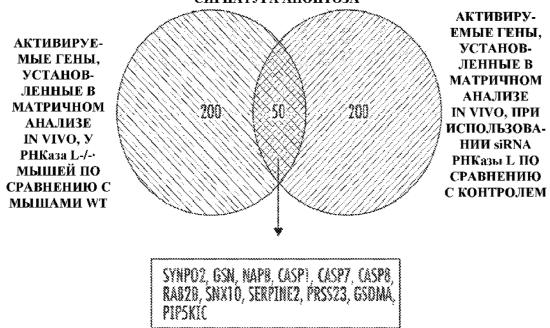


ФИГ. 25І

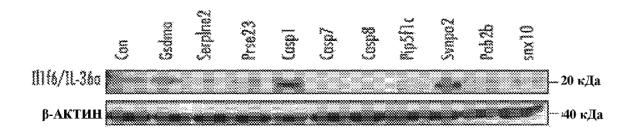




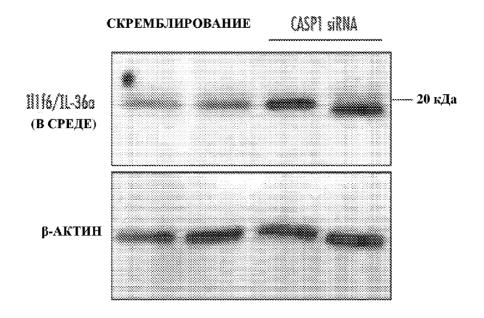
ЗНАЧИТЕЛЬНОЕ ПЕРЕМЕЩЕНИЕ ВЕЗИКУЛ, ПРОТЕАЗА, СИГНАТУРА АПОПТОЗА



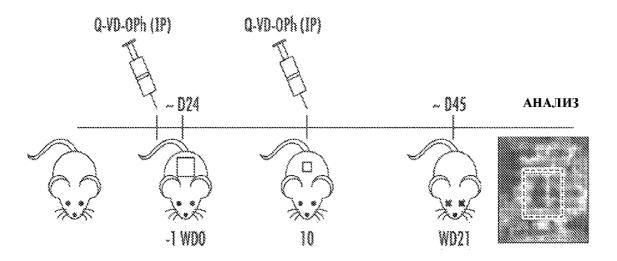
ФИГ. 26А



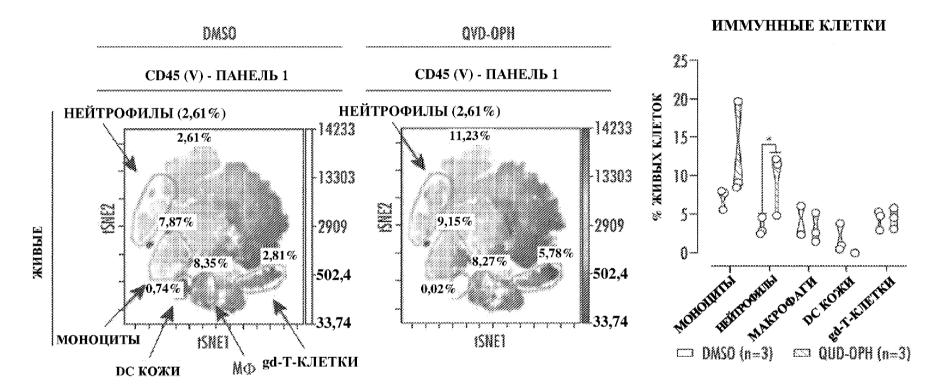
ФИГ. 26В

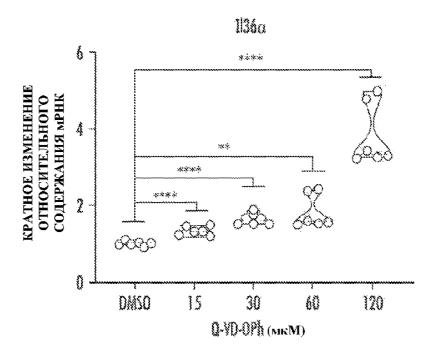


ФИГ. 26С

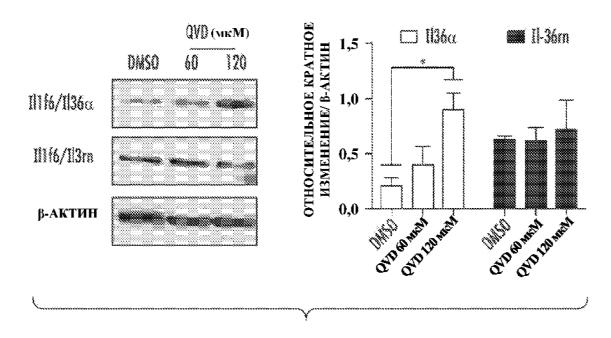


ФИГ. 26D

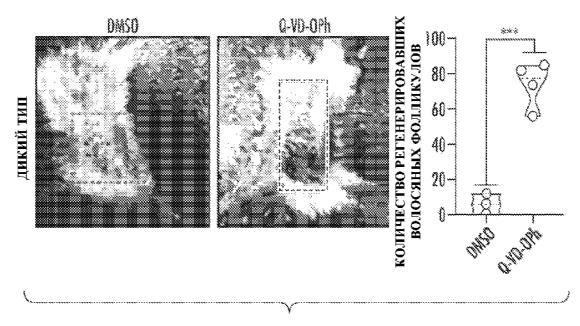




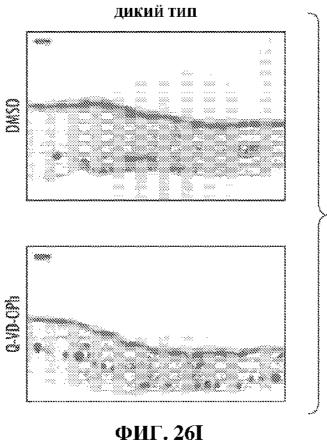
ФИГ. 26F

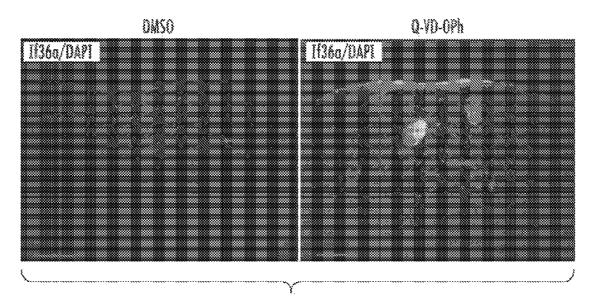


ФИГ. 26G

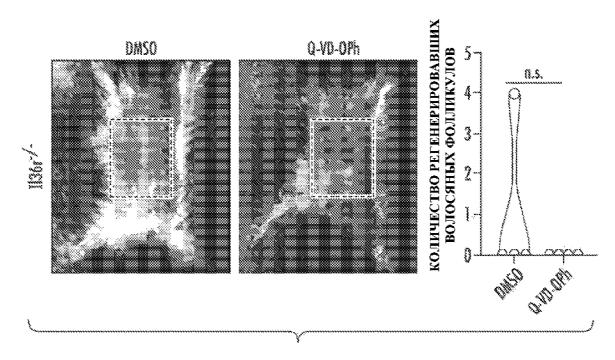


ФИГ. 26Н

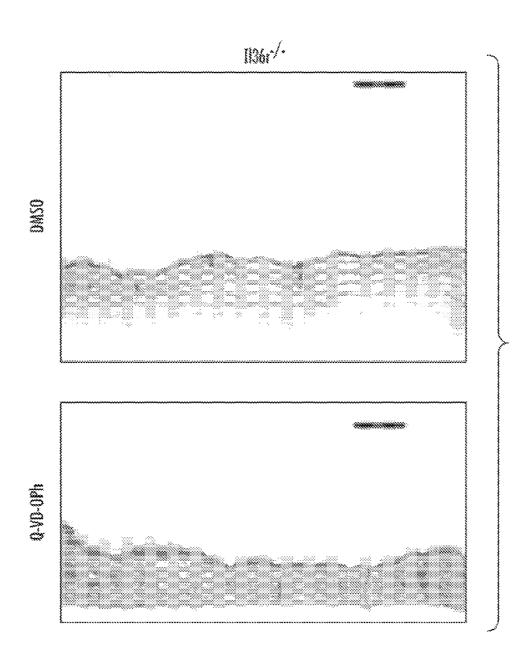




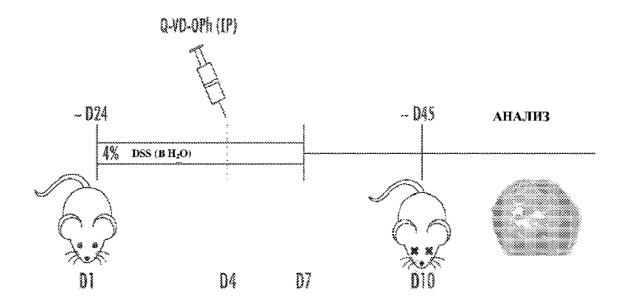
ФИГ. 26Ј



ФИГ. 26К



ФИГ. 26L

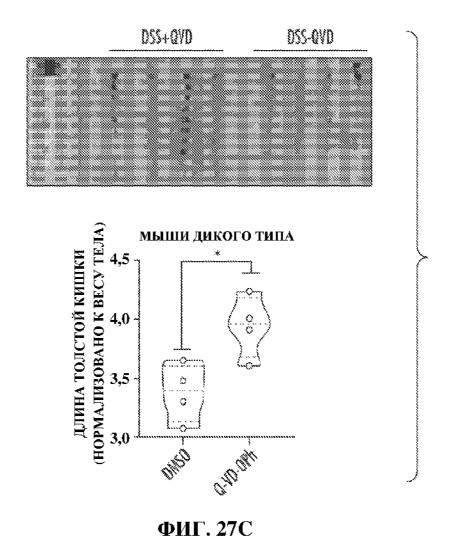


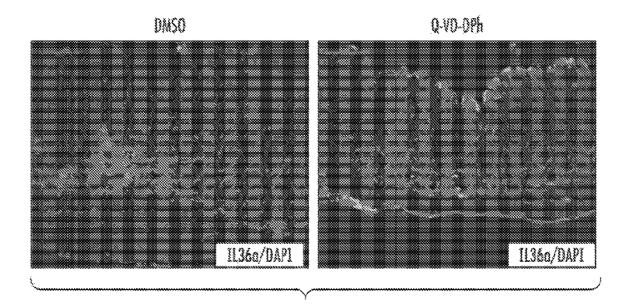
ФИГ. 27А



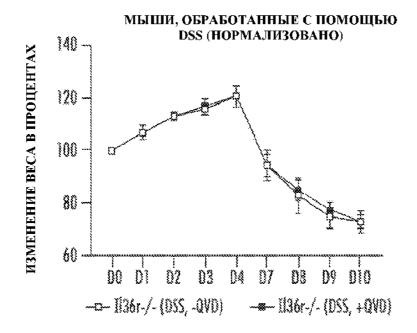
ФИГ. 27В

74/92

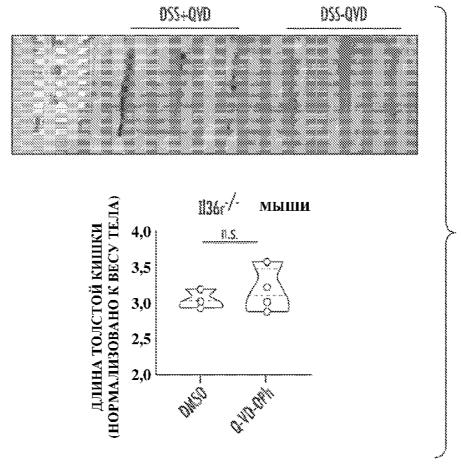




ФИГ. 27D

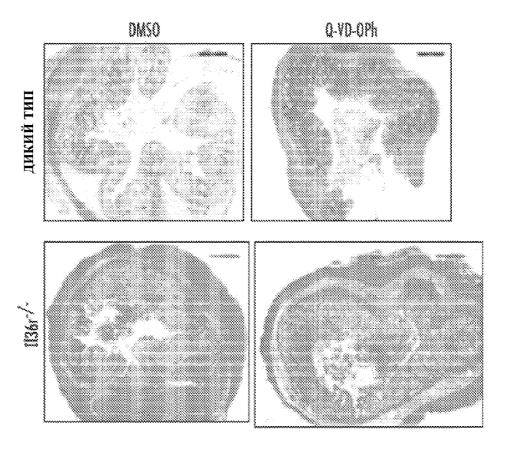


ФИГ. 27Е

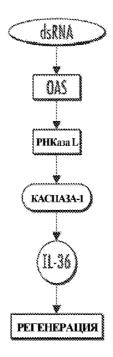


ФИГ. 27Е

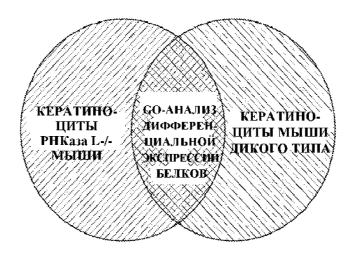
76/92

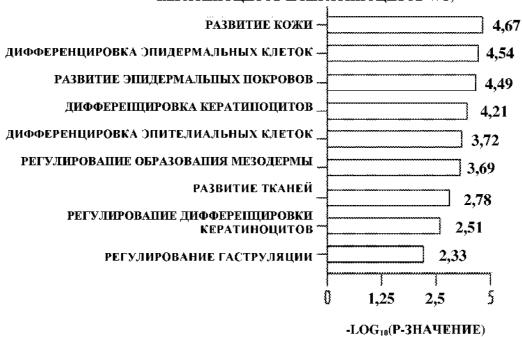


ФИГ. 27G

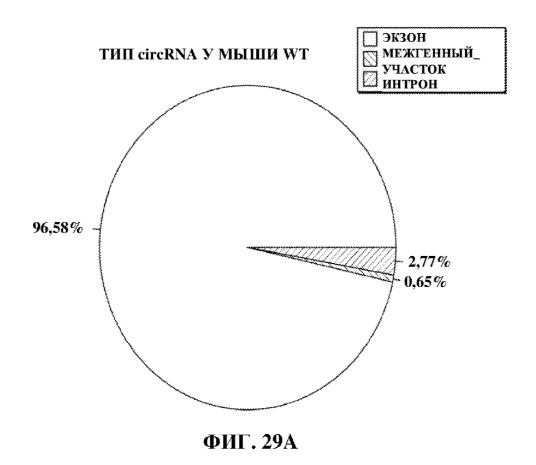


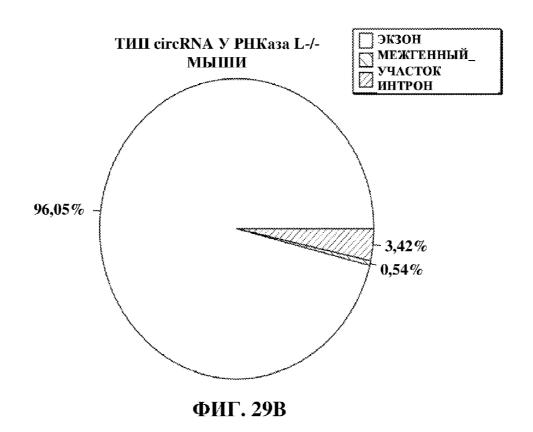
ФИГ. 27Н



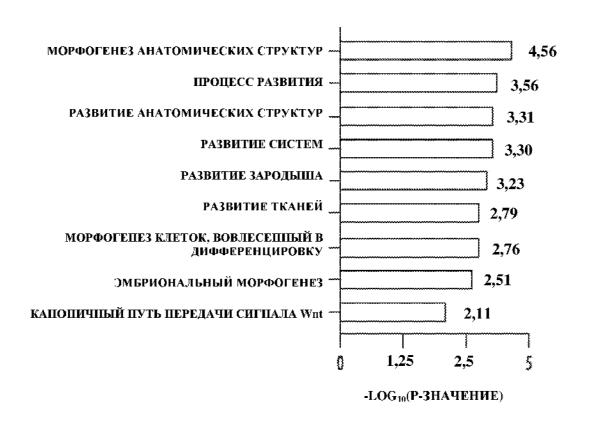


ФИГ. 28





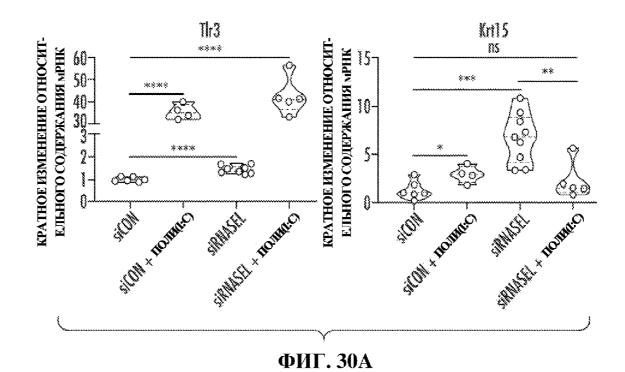
GO-ТЕРМИНЫ, ПО КОТОРЫМ ОСУЩЕСТВЛЯЛИ ОБОГАЩЕНИЕ ПРИ circRNA-СЕКВЕН. (ОСНОВНЫЕ 100 circRNA У РНКаза L-/- МЫШЕЙ)

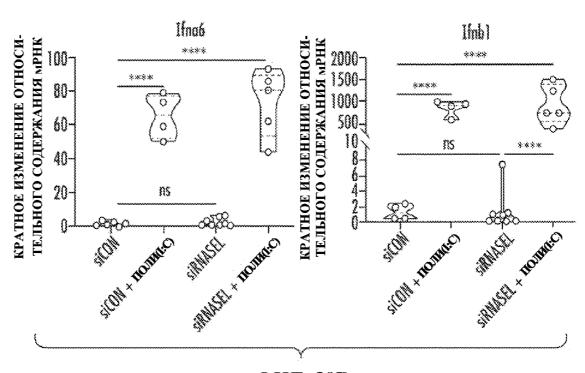


ФИГ. 29С

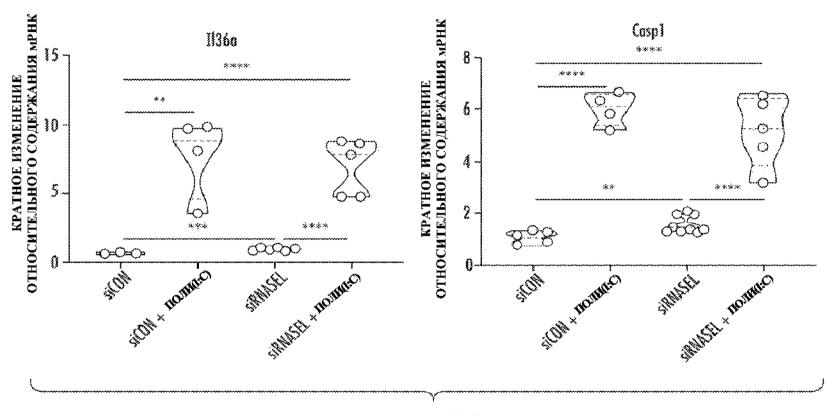


ФИГ. 29D

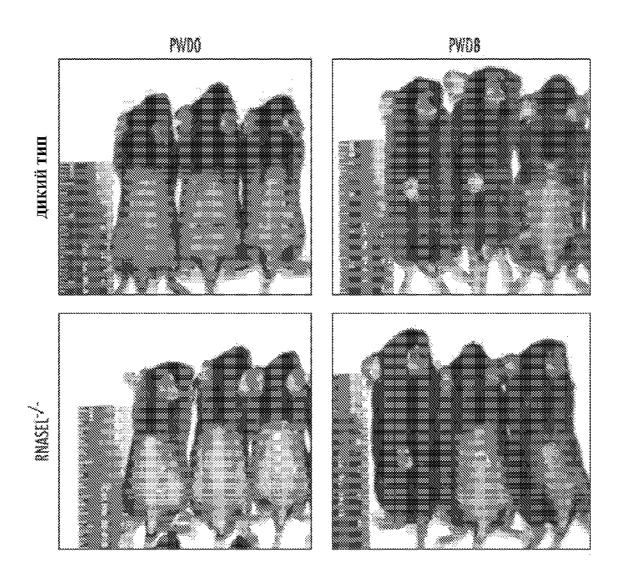




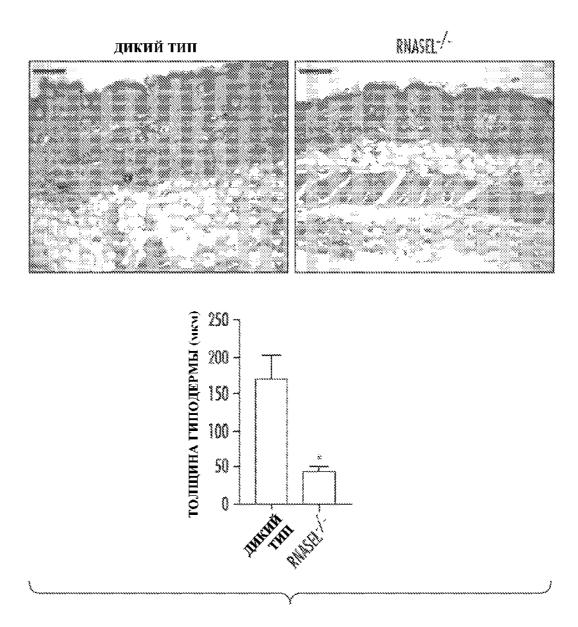
ФИГ. 30В



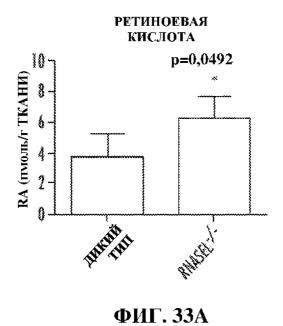
ФИГ. 30С

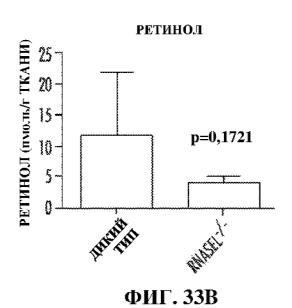


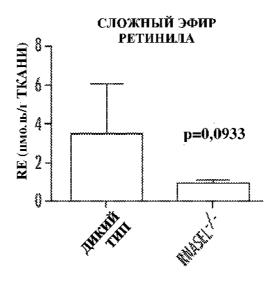
ФИГ. 31



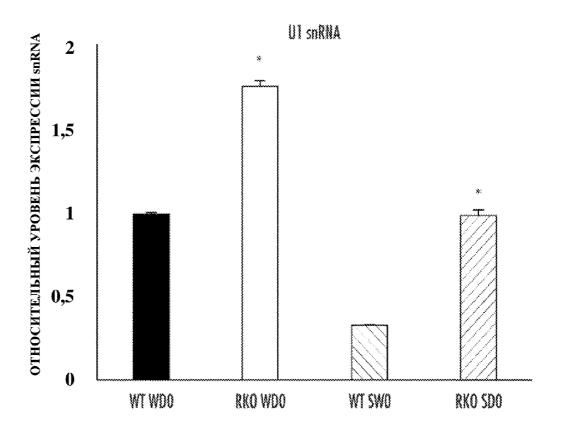
ФИГ. 32



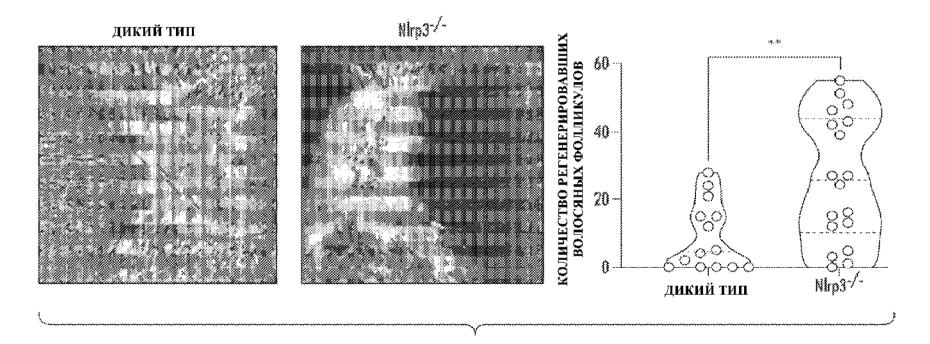




ФИГ. 33С

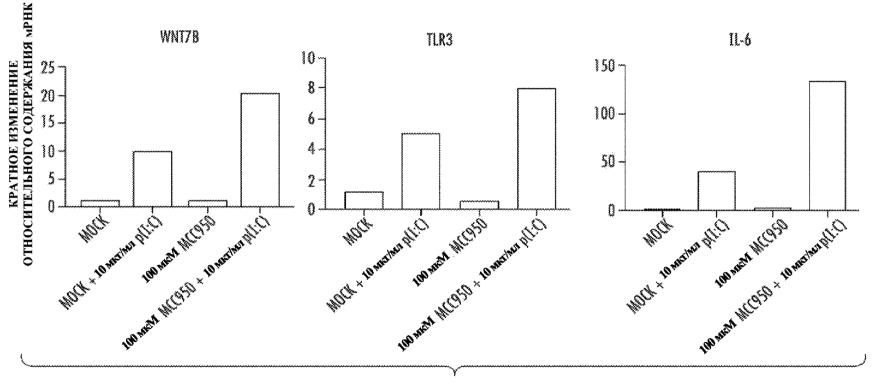


ФИГ. 34

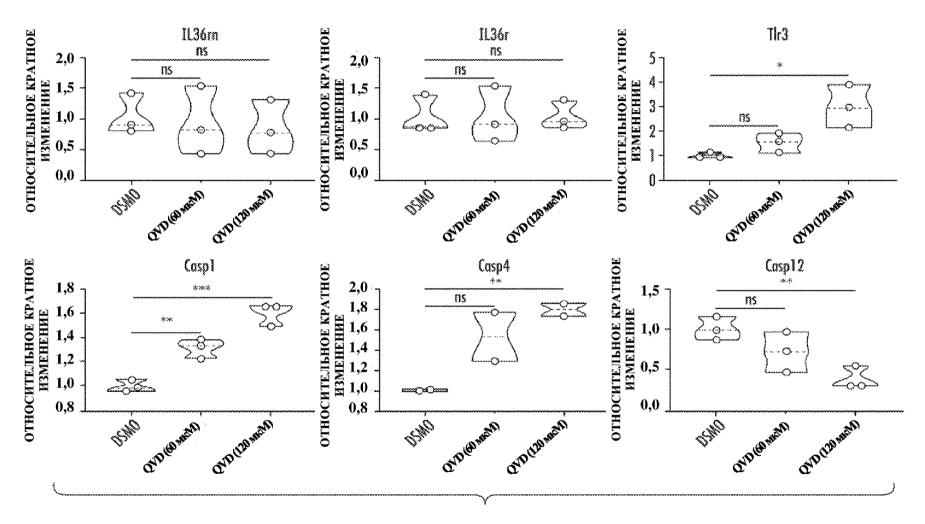


ФИГ. 35А

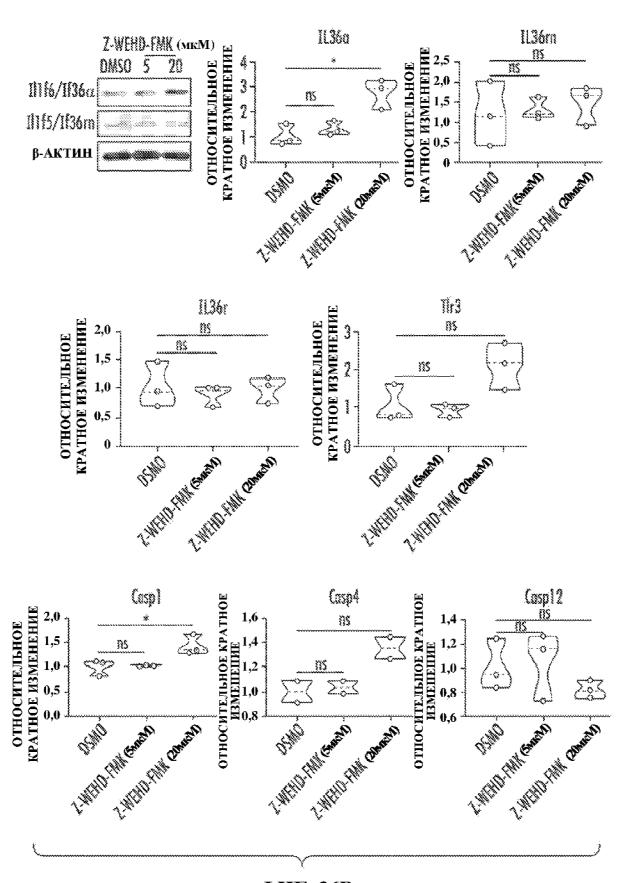




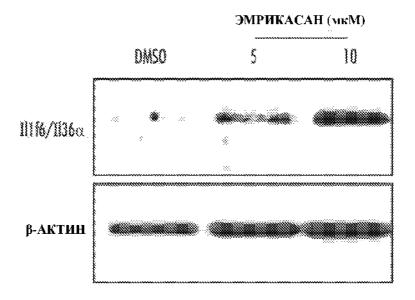
ФИГ. 35В



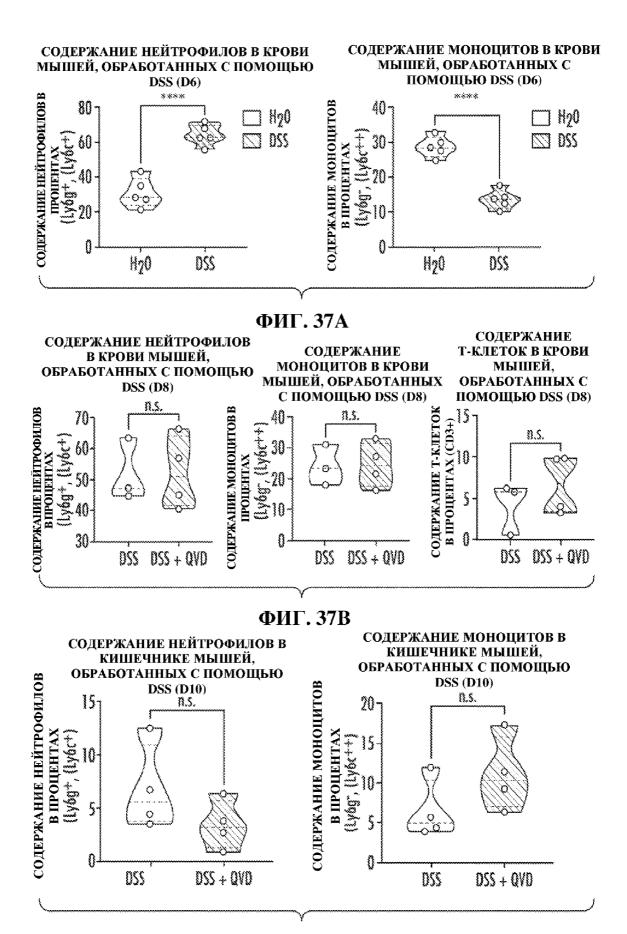
ФИГ. 36А



ФИГ. 36В



ФИГ. 36С



ФИГ. 37С