



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **128041** (13) **C2**
(51) МПК (2024.01)
C07H 19/06 (2006.01)
C07H 19/16 (2006.01)
A61K 31/52 (2006.01)
A61P 35/00

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ
ДЕРЖАВНА ОРГАНІЗАЦІЯ
"УКРАЇНСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ
ОФІС ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ ТА ІННОВАЦІЙ"

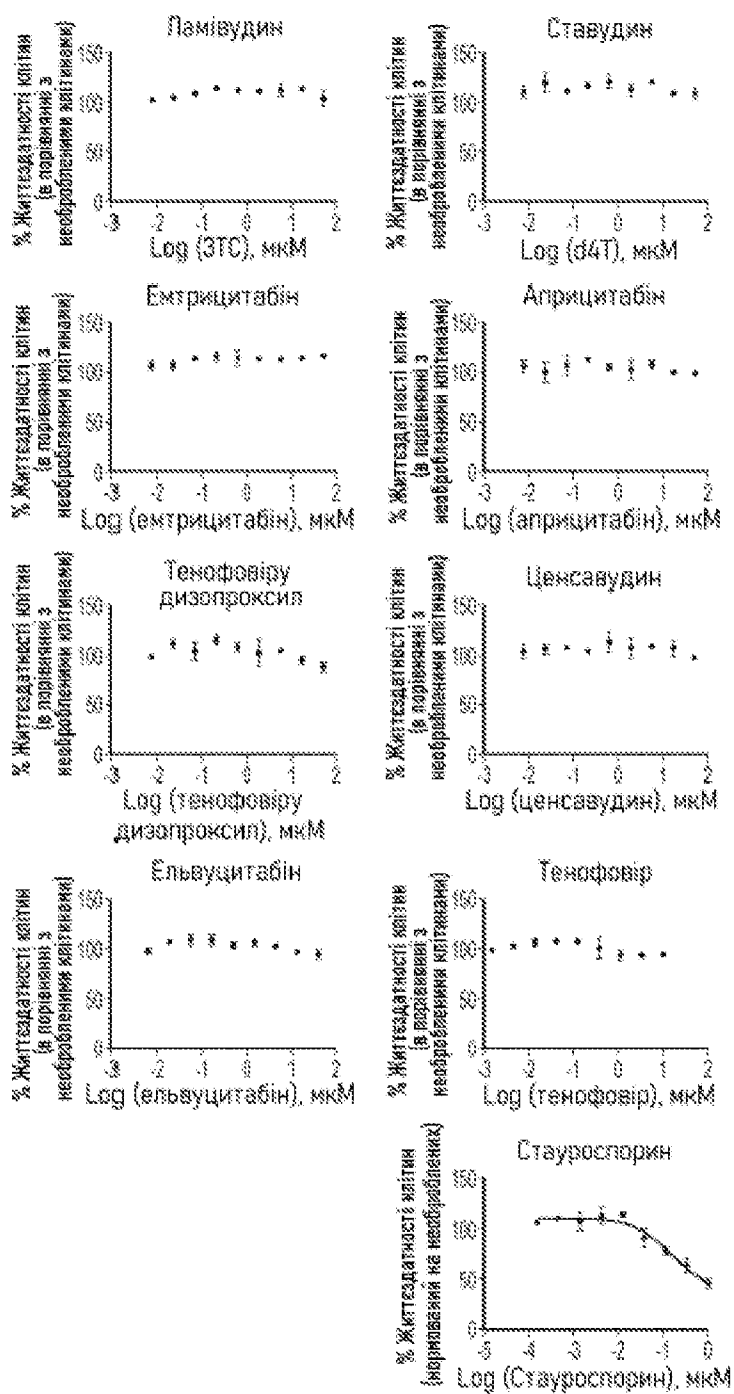
(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки: а 2021 04068 (22) Дата подання заявки: 24.01.2020 (24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності: 21.03.2024 (31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 62/797,109, 62/907,251 (32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 25.01.2019, 27.09.2019 (33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: US, US (41) Публікація відомостей про заявку: 22.12.2021, Бюл.№ 51 (46) Публікація відомостей про державну реєстрацію: 20.03.2024, Бюл.№ 12 (86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: PCT/US2020/015043, 24.01.2020	(72) Винахідник(и): Седіви Джон М. (US), де Чекко Марко (US) (73) Володілець (володільці): БРАУН ЮНІВЕРСІТІ, Box 1949, Providence, RI 02912, United States of America (US) (74) Представник: Шпакович Тетяна Іванівна, реєстр. №240 (56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: FOWLER et al. Nucleoside reverse transcriptase inhibitors possess intrinsic anti-inflammatory activity. Science. 21.11.2014. Vol. 346. No. 6212. P. 1000 – 1003 WO 2008/054808 A2, 08.05.2018 US 10100307 B2, 16.10.2018 US 9221832 B2, 29.12.2015 US 2003/003468 A1, 02.01.2003 US 2005/113324 A1, 26.05.2005 WO 2017/050803 A1, 30.03.2017 US 2006/020042 A1, 26.01.2006 HAMPEL et al. Advances in the development of biomarkers for Alzheimer's disease: from CSF total tau and AB1-42 proteins to phosphorylated tau protein. Brain Research Bulletin. 15.08.2003. Vol. 61. No. 3. P. 243 - 253 WO 2012/068636 A1, 31.05.2012 US 2017/224680 A2, 10.08.2017 WO 2021/041317 A1, 04.03.2021 WO 2020/185676 A1, 17.09.2020
--	--

(54) СПОСІБ ЛІКУВАННЯ ПОВ'ЯЗАНОГО З ВІКОМ ЗАПАЛЕННЯ У ПАЦІЄНТА**(57) Реферат:**

Винахід стосується способу лікування пов'язаного з віком запалення шляхом введення пацієнту, який цього потребує, терапевтично ефективної кількості щонайменше одного інгібітору зворотної транскриптази (ІЗТ).

UA 128041 C2



Фіг. 20

ГАЛУЗЬ ТЕХНІКИ

Даний винахід стосується галузі медичної хімії. Зокрема, відповідно до даного винаходу запропонований спосіб лікування, запобігання та обертання пов'язаного з віком запалення шляхом введення інгібітору зворотної транскриптази (ІЗТ) пацієнту, який цього потребує.

Пов'язане з віком запалення може бути у пацієнта, у якого є хвороба Альцгеймера, бічний аміотрофічний склероз (БАС), хвороба Паркінсона, хвороба Гентінгтона, втрата зору, втрата слуху, дегенеративні захворювання периферичної нервової системи, або дисфункція серцево-судинної системи, лобно-скронева деменція (ЛСД), розсіяний склероз (РС), синдром Айкарді-Гут'єрес, прогресуючий над'ядерний параліч (ПНП), остеоартрит, старіння шкіри, атеросклероз, викликані хіміотерапією небажані явища, порушення функціонування гематопоетичних стовбурових клітин, остеопороз, порушення фізичного функціонування та/або фіброз легенів, або у пацієнта, що має потребу в загоєнні ран або регенерації тканин.

ПОЛОЖЕННЯ ВІДНОСНО ДОСЛІДЖЕНЬ АБО РОЗРОБОК, ЯКІ ФІНАНСУЮТЬСЯ З ФЕДЕРАЛЬНОГО БЮДЖЕТУ

Даний винахід було розроблено за підтримки наступним фінансуванням: стипендія постдокторанта Glenn/AFAR, [пілотний грант NIH P20 GM119943 COBRE; NIH F31 AG043189; NIH T32 AG041688; NIH F31 AG050365; стипендії у галузі біотехнології та спортивної медицини, Фармацевтична школа, Болонський університет, Болонья, Італія; NIH R37 AG016667, R01 AG024353, P01 AG051449, премія за прориви у геронтології Glenn-AFAR; NIH R01 AG050582, P20 GM109035; NIH R37 AG016694, P01 AG051449].

РІВЕНЬ ТЕХНІКИ

Кількість людей, які будуть доживати до 60 або більше років, росте по всьому світу. Очікують, що між 2012 та 2050 роками відсоток кількості людей у віці 60 років і старше зросте з 809 мільйонів до 2 мільярдів (або з 11 % до 22 % популяції).[1] Серед основних причин смерті у літньому віці є декілька хронічних станів, включаючи хвороби серця, рак, діабет, хворобу Альцгеймера та інфекцію. Важливо, що багато даних щодо пов'язаних з віком захворювань і саме старіння сильно пов'язані з хронічним запаленням на низькому рівні. [2,3,4] Системне хронічне запалення може прискорювати старіння. [5] Дійсно, багато маркерів запалення є важливими прогностичними факторами смертності літніх людей. [6]

Незважаючи на цей загальний зв'язок між старінням, запаленням та хронічними захворюваннями, був досягнутий лише обмежений прогрес у розумінні механізмів, які контролюють пов'язане з віком запалення, та причинно-наслідкові зв'язки даних регуляторних факторів з хронічними дегенеративними захворюваннями не повністю зрозумілі. Краще розуміння ролі даних регуляторних факторів у пов'язаному з віком запаленні має привести до нових стратегій продовження здоров'я популяції похилого віку.

З цієї причини, у даній галузі існує потреба у кращому лікуванні та запобіганні пов'язаного з віком запалення та пов'язаних з віком розладів.

КОРОТКИЙ ОПИС ВІНАХОДУ

Даний винахід дає краще розуміння механізмів, що лежать у основі пов'язаного з віком запалення, та ролі останнього у старінні, а також відповідно до даного винаходу запропоновані композиції та способи запобігання та зменшення пов'язаного з віком запалення та розладів.

Ретротранспозовані елементи (RTE) мають шкідливий вплив на багатьох рівнях, та недостатність систем нагляду хазяїна, отже, може призводити до негативних наслідків. Проте, внесок активності RTE у старіння та пов'язані з віком захворювання був невідомий. У основі винаходу лежить декілька емпіричних спостережень, включаючи спостереження, що у процесі клітинного старіння підвищується рівень транскрипції елементів LINE-1 (L1), та вони активують відповідь інтерферону I типу (IFN-I). Відповідь IFN-I являє собою новий фенотип пізнього клітинного старіння та сприяє підтримці асоційованого зі старінням секреторного фенотипу (SASP). Відповідь IFN-I запускається цитоплазматичною кДНК L1, та його антагоністами є інгібітори зворотної транскриптази (ІЗТ), які інгібують зворотну транскриптазу (ЗТ) L1. Лікування літніх мишей ІЗТ ламівудином негативно регулювало активацію IFN-I та пов'язане з віком запалення у деяких тканинах. Відповідно, активація RTE - це важливий компонент стерильного запалення, яке є відмітною ознакою старіння, та ЗТ L1 є підходящою мішенню для лікування пов'язаних з віком розладів.

У відповідності з даним винаходом запропонований спосіб лікування, запобігання та/або обертання пов'язаного з віком запалення у пацієнта, який цього потребує, шляхом введення пацієнту терапевтично ефективної кількості щонайменше одного інгібітору зворотної транскриптази (ІЗТ).

При порівняльній оцінці декількох лікарських засобів ІЗТ у аналізі доза-відповідь інгібування активності L1, два лікарські засоби ІЗТ - ценсавудин та ельвудитабін - проявили несподівано

чудову здатність пригнічувати активність L1 миші та людини. Згідно з даним винаходом додатково запропонований спосіб лікування, запобігання та/або обернення пов'язаного з віком запалення у пацієнта, який цього потребує, шляхом введення пацієнту терапевтично ефективної кількості ценсабудину та/або ельвудитабіну.

5 Пов'язане з віком запалення пов'язане з підвищеною експресією L1, накопиченням цитоплазматичної кДНК L1, активацією відповіді IFN-I та/або посиленням прозапального стану SASP. Лікарський засіб ІЗТ вводять у кількості, достатній для запобігання або обернення щонайменше однієї з перерахованих подій: підвищення експресії L1, накопичення цитоплазматичної кДНК L1, активації відповіді IFN-I та/або прозапального стану SASP.

10 Пов'язане з віком запалення, яке можна попередити, лікувати або обернути за допомогою способів відповідно до даного винаходу, присутнє у пацієнта, що має захворювання або розлад, включаючи, але не обмежуючись перерахованими: хворобу Альцгеймера, бічний аміотрофічний склероз (БАС), хворобу Паркінсона, хворобу Гентінгтона, втрату зору, втрату слуху, дегенеративні захворювання периферичної нервової системи, або дисфункцію серцево-судинної системи, лобно-скроневої деменції (ЛСД), розсіяний склероз (РС), синдром Айкарді-Гут'єрес, прогресуючий над'ядерний параліч (ПНП), остеоартрит, старіння шкіри, атеросклероз, викликані хіміотерапією небажані явища, порушення функціонування гематопоетичних стовбурових клітин, остеопороз, порушення фізичного функціонування та/або фіброз легень, -

15 або у пацієнта, що потребує загоєння ран або регенерації тканин. У одному варіанті реалізації пов'язане з віком запалення присутнє у пацієнта, у якого є хвороба Альцгеймера. У альтернативному варіанті реалізації пов'язане з віком запалення присутнє у пацієнта, у якого є БАС.

Також запропонований спосіб відтермінування (затримки прояву) або обернення прогресування патології, що лежить у основі захворювання або розладу, викликаного пов'язаним з віком запаленням (першопричина патології), що включає введення пацієнту, який цього потребує, терапевтично ефективної кількості щонайменше одного ІЗТ. У деяких варіантах реалізації пацієнт страждає на хворобу Альцгеймера або БАС та відчуває ослаблення одного або більше симптомів хвороби Альцгеймера або БАС у порівнянні з такими перед першим введенням ІЗТ пацієнтові. У деяких варіантах реалізації один або більше симптомів хвороби

25 Альцгеймера включають втрату пам'яті, розміщення предметів не на тих місцях, забування назв місць чи об'єктів, повторення питань, меншу пристосованість до нових обставин, замішання, дезорієнтацію, obsesивну поведінку, компульсивну поведінку, марення, афазію, порушення сну, перепади настрою, депресію, тривогу, фрустрацію, збуджений стан, труднощі при виконанні просторових задач, агнозію, труднощі при пересуванні, втрату маси, втрату здатності говорити, втрату короточасної пам'яті або втрату довготривалої пам'яті.

У деяких варіантах реалізації зменшення одного або більше симптомів хвороби Альцгеймера оцінюють відповідно до настанови з діагностики та статистики психічних розладів (DSM-5) [7]. У деяких варіантах реалізації зменшення симптомів визначають, використовуючи когнітивну субшкалу оцінки тяжкості хвороби Альцгеймера (ADAS-cog). У деяких

30 варіантах реалізації зменшення симптомів визначають, використовуючи шкалу оцінки змін клініцистом на підставі опитування (CIBIC-plus). У деяких варіантах реалізації зменшення симптомів визначають, використовуючи шкалу оцінки повсякденної діяльності (ADL). У деяких варіантах реалізації зменшення симптомів триває 1-36 місяців.

У деяких варіантах реалізації будь-яку зміну у першопричинній патології виявляють шляхом детектування біомаркеру до та після введення ІЗТ. У деяких варіантах реалізації біомаркер являє собою β-амілоїд або білок Тау. У деяких варіантах реалізації біомаркер детектують за допомогою ПЕТ-візуалізації. У деяких варіантах реалізації першопричинну патологію ідентифікують шляхом вимірювання β-амілоїду або білку Тау у спинномозковій рідині. У деяких

45 варіантах реалізації першопричинну патологію ідентифікують шляхом вимірювання об'єму головного мозку до та після введення ІЗТ. У деяких варіантах реалізації першопричинну патологію обертають або відтермінують на 1-36 місяців.

У деяких варіантах реалізації щонайменше один ІТ являє собою нуклеозидний інгібітор зворотної транскриптази (НІЗТ). У деяких варіантах реалізації щонайменше один НІЗТ вибраний з перерахованих далі: абакавір (3ІАГЕНTM), абакавір/ламівудин (Епзіком), абакавір/ламівудин/зидовудин (ТРИЗИВІРTM), адефовір, аловудин, амдоксовір, априцитабін, АТРИПЛА[®], БАРАКЛЮД[®], БІКТАРВІ[®], ценсабудин, КОВІРАЦИЛTM, DAPD/DXG, D-D4FC, дексельвудитабін, диданозин (ВІДЕКСTM), диданозин з пролонгованим вивільненням (Відекс ЕС), dOTC, EFdA, емтрицитабін (ЕМТРИВАTM), емтрицитабін/тенофовіру алафенамід (ДЕСКОВІ[®]), емтрицитабін/тенофовіру дизопроксилфумарат (ТРУВАДА[®]), ельвудитабін,

50 фосалвудин, ламівудин/зидовудин (КОМБІВІРTM), ЕВІПЛЕРАTM, ГЕНВОЯ[®], ХІВІДTM, КІВЕКСАTM,

ламівудин (ЕПІВІР™), ЛОДЕНОЗИН™, ОДЕФСЕЙ®, ПРЕВЕОН®, рацивір, стампідин, ставудин (ЗЕРИТ™), СТРИБІЛД®, ТЕНОФОВІР™, тенофовіру дизопроксилфумарат (ВІРЕАД™), ТРИУМЕК®, Тризівір, ВЕМЛІДІ® та/або зидовудин (РЕТРОВІР™). У деяких варіантах реалізації щонайменше один НІЗТ являє собою ценсавудин. У деяких варіантах реалізації щонайменше

5 один НІЗТ являє собою ельвудитабін.

У деяких варіантах реалізації щонайменше один ІЗТ являє собою ненуклеозидний інгібітор зворотної транскриптази (ННІЗТ). У деяких варіантах реалізації щонайменше один ННІЗТ вибраний з перерахованих далі: делавірдин (DLV), ефавіренц (EFV), етравірдин, невірапін (NVP) та/або рилпівірін.

10 У деяких варіантах реалізації пацієнт страждає на хворобу Альцгеймера, та спосіб додатково включає введення щонайменше одного другого терапевтичного агента, корисного для лікування симптомів хвороби Альцгеймера. У деяких варіантах реалізації щонайменше один другий терапевтичний агент вибраний з перерахованих далі: донепезил, галантамін, мемантин та/або ривастигмін. У деяких варіантах реалізації щонайменше один другий

15 терапевтичний агент являє собою антитіло, яке зв'язується з β-амілоїдом або білком Тау. У деяких варіантах реалізації зазначене антитіло зв'язується з β-амілоїдом та являє собою бапінейзумаб. У деяких варіантах реалізації зазначене антитіло зв'язується з білком Тау та являє собою ABBV-8E12. У деяких варіантах реалізації щонайменше один другий

20 терапевтичний агент являє собою вакцину проти β-амілоїду або білку Тау. У деяких варіантах реалізації щонайменше один другий терапевтичний агент являє собою агент, який знижує або змінює вміст у головному мозку β-амілоїду або Тау. У деяких варіантах реалізації другий

25 терапевтичний агент знижує або змінює вміст у головному мозку β-амілоїду та являє собою інгібітор β-секретази 1 (BACE). У деяких варіантах реалізації інгібітор BACE вибраний з перерахованих далі: CTS-21166, ланабестат (AZD3293), LY2886721 та верубестат (MK-8931). У деяких варіантах реалізації другий агент знижує або змінює вміст у головному мозку Тау та являє собою нікотинамід, або MPT0G211.

У деяких варіантах реалізації пацієнт страждає на БАС, та спосіб додатково включає введення щонайменше одного другого терапевтичного агента, корисного для лікування симптомів БАС. У деяких варіантах реалізації щонайменше один другий агент, корисний для

30 лікування БАС, являє собою едаравон та/або рилузол. У інших варіантах реалізації щонайменше один другий агент являє собою інгібітор інтегрази. У деяких варіантах реалізації інгібітор інтегрази вибраний з перерахованого далі: ауринтрикарбонова кислота, похідні ауринтрикарбонової кислоти, BMS 538158, складний ефір кавової кислоти та феноїлового спирту, похідні складного ефіру кавової кислоти та феноїлового спирту, куркумін, похідні

35 куркуміну, цикорієва кислота, похідні цикорієвої кислоти, 3,5-дикофеїлхінова кислота, похідні 3,5-дикофеїлхінової кислоти, GSK364735C, L 870 812 та L-25 870810, MK 0518, кверцетин, похідні кверцетину, ралтегравір, S-1360, тирфостин, похідні тирфостину та/або зинтевір (AR-177).

У деяких варіантах реалізації оцінюють наявність у пацієнта одного або більше симптомів або патології захворювання впродовж 1-36 місяців після першого введення ІЗТ пацієнту.

У деяких варіантах реалізації ІЗТ інгібує активність зворотної транскриптази L1 у клітині пацієнта.

Також запропонований спосіб запобігання початку хвороби Альцгеймера у пацієнта, у якого підозрюють наявність легкого когнітивного розладу або передклінічної хвороби Альцгеймера, що включає введення терапевтично ефективної кількості щонайменше одного ІЗТ пацієнту, який цього потребує.

Інші варіанти реалізації також описані та перераховані у даній заявці.

КОРОТКИЙ ОПИС КРЕСЛЕНЬ

З метою ілюстрування деякі варіанти реалізації даного винаходу показані на фігурах, описаних нижче. Одні і ті ж символи на фігурах позначають одні й ті ж елементи всюди у даному описі. Проте, повинно бути зрозуміло, що даний винахід не обмежується конкретними показаними конфігураціями, розмірами та пристроями. Фігури описані далі.

На фіг. 1 показана активація L1, IFN-I та SASP у старих клітинах. Експресію генів оцінювали за допомогою ЗТ-кПЛР. Очищену полі(А)-РНК використовували у всіх дослідженнях L1. Фіг. 1a. Динаміка активації L1. Р-значення розраховували відносно РП - контрольних клітин раннього пасажу. Фіг. 1b. Схематичне представлення стратегії ЗТ-ПЛР L1. Синя - смислова; червона - антисмислова (АС). Специфічність праймерів див. на фіг. 6f-h; розробку праймерів див. у розділі "Методи". Праймери для амплікону F використовували у (a) та (e). Фіг. 1c. Ланцюг-специфічну транскрипцію L1 оцінювали, застосовуючи амплікони A-F. Також детектували транскрипцію з

60 антисмислового промотору 5'-нетрансльованої області (НТО). Стар (П) - пізні старіння клітин

(16 тижнів). Фіг. 1d. Індукція рівнів мРНК IFN- α та IFN- β 1. Фіг. 1e. Темпоральна індукція генів, зв'язаних з пошкодженням ДНК (p21, також відомий як CDKN1A), SASP (IL-1 β , CCL2, IL-6, MMP3) та відповіддю IFN-I (IRF7, IFN- α , IFN- β 1, OAS1). Кластеризацію рядів розраховували як кореляцію Пірсона-1. РеС - реплікативне старіння; ВОС - викликане онкогеном старіння клітин (викликане інфікуванням Ha-RAS); ВСПС - викликане стресом передчасне старіння клітин (опромінення гамма-променями). Контролі: РП - ранній пасаж; ПВ - інфікування пустим вектором; КОНТР. - без опромінення. (а, с-е), n=3 незалежні біологічні зразки, повторювали у двох незалежних експериментах. (а, с, d) Результати являють собою середнє $\pm$ С.О. *P $\leq$ 0,05, **P $\leq$ 0,01, непарні двосторонні t-критерії.

На фіг. 2 показана регуляція активації L1 та індукції IFN-I. Фіг. 2a - експресія та імунопреципітація хроматину (ChIP) RB1 та фіг. 2b-FOXA1. Експресію вимірювали за допомогою ЗТ-кПЛР та імуноблоттингу (ліві панелі). Зв'язування з елементами L1 оцінювали за допомогою ChIP-кПЛР (праві панелі). Специфічність праймерів див. на фіг. 6b. RB1: 5'-НТО, відкрита рамка зчитування (BP3) 1 та BP32, праймери для ампліконів А, Е та F, відповідно. FOXA1: праймери для ампліконів А-Е. Кількісну ПЛР нормували на введений хроматин. Стар (Р) - раннє старіння клітин (8 тижнів). Результати на гелях див. на фіг. 16. Фіг. 2c-е. RB1, FOXA1 або TREX1 надекспресували (HE) або пригнічували за допомогою кшРНК та визначали вплив на експресію L1, IFN- α та IFN- β 1 за допомогою ЗТ-кПЛР очищеної полі(А)-РНК. У всіх випадках лентивірусні вектори використовували для доставки втручань безпосередньо у старі клітини у 12 тижнів (точка D, фіг. 6a), та клітини збирали для аналізу через чотири тижні (точка E, 16 тижнів). Контролями слугували неінфіковані старі клітини, зібрані у той же час (точка E, 16 тижнів). Для кожного гену використовували дві різні кшРНК (а, b). Праймери для амплікону F використовували для L1. Фіг. 2f. RB1 надекспресували (HE), як описано вище, та його зв'язування з 5'-НТО оцінювали за допомогою ChIP-кПЛР (амплікон А). Фіг. 2g. Активація експресії L1, IFN- α та IFN- β 1 після потрібного (3X) втручання із застосуванням shRB1 (а), shTREX1 (а) та FOXA1-HE у клітинах раннього пасажу. Лентивірусні інфекції здійснювали послідовно з селекціями по чутливості до лікарського препарату на кожному етапі (shRB1, пуроміцин $\rightarrow$ shTREX1, гіроміцин $\rightarrow$ FOXA1-HE, бластицидин). Фіг. 2h. Експресію генів шляху IFN-I визначали за допомогою панелей RT2 Profiler PCR array (Qiagen). Нормована середня експресія показана для всіх 84 генів панелі. Червоні символи: гени зі значно підвищеною експресією. Пунктирні лінії показують границі ± 2 -разової зміни. (а, b, h), n=3 незалежні біологічні зразки, повторювали у 2 незалежних експериментах. (с-g), n=3 незалежні експерименти. (а-g) Результати являють собою середнє $\pm$ С.О. *P $\leq$ 0,05, **P $\leq$ 0,01, непарні двосторонні t-критерії.

На фіг. 3 показано, що видалення L1 ослаблює активацію IFN-I та зменшує відповідь SASP. Фіг. 3a. Клітини досліджували за допомогою імуофлуоресцентної (ІФ) мікроскопії, застосовуючи антитіла до одноланцюгової ДНК (олДНК) або до білку BP31 L1. Видна ярка точка олДНК у старих клітинах, яка колокалізована із помітною точкою BP31. Даний експеримент незалежно повторювали тричі з подібними результатами. Масштабна лінійка = 10 мкм. Фіг. 3b. Старі клітини обробляли кшРНК L1 (застосовуючи лентивірусні вектори, як описано на фіг. 2с, е, f) або ЗТС (7,5 мкМ) між 12 та 16 тижнями старіння. Вплив на відповідь IFN-I визначали за допомогою ЗТ-кПЛР, ELISA або імуоблоттингу. Результати на гелях див. на фіг. 16. Фіг. 3с. Клітини мітили BrdU впродовж 2 тижнів (з додаванням або без 7,5 мкМ ЗТС), мічену ДНК імуопреципітували та проводили кількісний аналіз вмісту у ній послідовності L1 шляхом аналізу методом мультиплексної кількісної ПЛР TaqMan16 (фіг. 1b, амплікон F). РП (спок.) – форми спокою клітини раннього пасажу. Фіг. 3d, ліва панель, РеС-клітини: гени IFNAR1 та IFNAR2 піддавали мутагенезу, застосовуючи систему CRISPR/Cas9, доставлену за допомогою лентивірусних векторів безпосередньо у старі клітини. Як і при втручаннях з використанням кшРНК, клітини інфікували у 12 тижнів та збирали у 16 тижнів старіння (див. фіг. 1d-f, див. розділ "Методи"). Права панель, клітини з ВСПС: втручання CRISPR/Cas9 здійснювали на клітинах раннього пасажу та підтверджений клон опромінювали, щоб викликати ВСПС. Фіг. 3е. ВОС та ВСПС викликали, як на фіг. 1d, та клітини збирали через 20 днів (ВОС) або 30 днів (ВСПС). ЗТС (7,5 мкМ) був присутній повсюди. Експресію генів IFN-I (IFN- α , IRF7, OAS1) вимірювали за допомогою ЗТ-кПЛР. Фіг. 3f. Здійснювали серійний пасаж клітин до досягнення реплікативного старіння (РеС) з присутнім повсюди ЗТС (10 мкМ) та оцінювали темпоральну індукцію генів відповіді SASP (IL-1 β , CCL2, IL-6, MMP3). (b-d, f), n=3 незалежні експерименти. (е) n=3 незалежні біологічні зразки, повторювали у 2 незалежних експериментах. (b-f) Результати являють собою середнє $\pm$ С.О. *P $\leq$ 0,05, **P $\leq$ 0,01. (b, d-f) непарні двосторонні t-критерії, (с) однофакторний дисперсійний аналіз з критерієм множинних порівнянь Т'юкі.

На фіг. 4 показано, що L1 активуються з віком у тканинах м'язів, та прозапальна відповідь IFN-I ослабляється завдяки лікуванню ІЗТ. Фіг. 4a. Присутність білку BP31 L1 у тканинах

досліджували за допомогою ІФ мікроскопії. Кількісний аналіз експресуючих ВР31 клітин показаний на правій панелі; оцінювали по три тварини та щонайменше по 200 клітин на тварину для кожної умови. Масштабна лінійка = 4 мкм. Фіг. 4b. Активацію L1 у старих клітинах досліджували шляхом одночасного зафарбовування на активність SA- β -Gal та білок ВР31 за допомогою ІФ (печінка самців, 5 та 26 місяців). Масштабна лінійка = 4 мкм. Експеримент незалежно повторювали три рази з одержанням подібних результатів. Фіг. 4c. мишам вводили ЗТС (2 мг/мл) у питній воді у зазначеному віці впродовж двох тижнів та умертвляли їх після лікування. Експресію p16, гену відповіді IFN-I (IFN- α) та маркеру прозапального стану (Il-6) оцінювали за допомогою ЗТ-кПЛР. Див. на фіг. 14 додаткові тканини та гени. На діаграмах розмаху показаний діапазон даних (вуса), 25-й та 75-й процентилі (ящик), середні значення (пунктирна лінія) та медіани (суцільна лінія). Кожна точка являє собою одну тварину. 5 місяців, n=8; 26 місяців, n=12; 29 місяців, n=6. Фіг. 4d. Мишей у віці шести місяців опромінювали нелетальною дозою та експресію L1, p16 та типових генів відповіді IFN-I (Ifn- α , Oas1) оцінювали за допомогою ЗТ-кПЛР у зазначені моменти часу після опромінення. Графічне представлення як у (c); без опромінення, n=3 тварин у віці 3 місяців, n=5 тварин у віці 6 місяців; опромінені, n=4 тварин у віці 3 місяці, n=5 тварин у віці 6 місяців. Фіг. 4e. Інфільтрацію макрофагами білої жирової тканини та нирки оцінювали за позитивними по F4/80 клітинами (% від всіх ядер). n=5 тварин у групі (жирова тканина); n=8 (нирка). Діаметр волокна скелетного м'язу вимірювали (подробіці див. у розділі "Методи") та наносили на графік у вигляді сукупної діаграми розмаху. n=5 тварин на групу, всього 500 волокон. Гломерулосклероз оцінювали на зафарбованих Шифф-йодною кислотою (ШЙК) зрізах (подробіці див. у розділі "Методи") як суму всіх клубочків з балом 3 або 4, поділену на загальну кількість. n=7 тварин на групу, 40 клубочків на тварину. Графічне представлення аналогічне (c). Обробка ЗТС тривала 2 тижні для білої жирової тканини та 6 місяців (20-26 місяців) для інших тканин. Пунктирне коло показує границі одного клубочку. Масштабна лінійка = 50 мкм. Фіг. 4f. Порушення механізмів нагляду за L1 приводить до хронічної активації відповіді IFN-I. СІД: стимульований інтерфероном шлях ДНК. *P $\leq$ 0,05, **P $\leq$ 0,01, непарні двосторонні t-критерії (a, d, e) або однофакторний дисперсійний аналіз з критерієм множинних порівнянь Т'юкі (c, e біла жирова тканина).

На фіг. 5 представлена схема послідовності молекулярного шляху клітинного старіння, що приводить до пов'язаного з віком "стерильного" запалення.

На фіг. 6 показане встановлення культур старих клітин та аналіз активації L1 та IFN-I. Фіг. 6a. Схема пасажів для одержання тривало культивованих реплікативно старих клітин (подробіці у розділі "Методи"). Точка А була прийнята за нуль часу у стані старіння. Фіг. 6b-d. Підтвердження старого статусу культур. Показаний типовий експеримент; інші експерименти контролювали таким же чином та отримували результати, які відповідали цим вихідним даним. РП - контрольні клітини раннього пасажу; Стар (Р) - раннє старіння клітин (8 тижнів); Стар (П) - пізнє старіння клітин (16 тижнів). Фіг. 6b, Клітини мітили BrdU впродовж 6 годин. Включення BrdU [8] та асоційовану зі старінням клітин активність β -галактозидази (SA- β -Gal) [9] визначали, як зазначено. Фокуси пошкодження ДНК візуалізували, застосовуючи антитіла γ -H2AX та імунофлуоресцентну мікроскопію (ІФ). [10] Фіг. 6c, Експресію білків p21 (CDKN1A) та p16 (CDKN2A) визначали за допомогою імуноблоттингу. GAPDH слугувала контролем завантаження. Результати на гелях див. на фіг. 16. Фіг. 6d. Експресію генів, характерних для SASP, визначали за допомогою ЗТ-кПЛР. Фіг. 6e. Активацію L1 у процесі старіння штамів фібробластів IMR-90 та WI-38 оцінювали за допомогою ЗТ-кПЛР, застосовуючи очищену полі(А)-РНК та праймери для амплікону F (фіг. 1b). Фіг. 6f. ЗТ-ПЛР довгих фрагментів проводили з праймерами А-прямий та С-зворотний (амплікон G) та праймерами А-прямий та D-зворотний (амплікон H) (фіг. 1b, таблиця 1) та кДНК клонували та секвенували. Декілька спроб використання того ж протоколу на проліферуючих клітинах з раннього пасажу не привели до одержання яких-небудь клонів L1. Послідовності картували на демаскованому еталонному геномі, вимагаючи 100 %-ої ідентичності. Таким чином змогли картувати 658 клонів, 51 додатковий клон містив щонайменше 1 неспівпадіння та, отже, можливо являв собою елементи, які поліморфні у лінії клітин, та 58 являли собою артефакти клонування. Серед 658 картованих клонів було представлено 224 унікальні елементи (таблиця 3). Інтактні елементи являють собою підгрупу повнорозмірних елементів, аннотованих без інактивуючих ВР3 мутацій. Розмір елементів відповідає кількості раз, яку елемент був представлений серед 658 клонів. Фіг. 6g. Короткий опис результатів ПЛР довгих фрагментів, представлених на фіг. 6f та у таблиці 3. Фіг. 6h. Виявлене у геномі число копій елементів, детектованих за допомогою наших ампліконів (розташування ампліконів див. на фіг. 1b та стратегію розробки праймерів див. у розділі "Методи"). Передбачено: ПЛР in silico (подробіці див. у розділі "Методи"). Спостерігається: кількісну ПЛР проводили на 1 нг геномної ДНК та нормували на відомий однокопійний локус.

Фіг. 6i. Активацію генів IFN- α та IFN- β 1 у процесі старіння клітин WI-38 та IMR-90 визначали за допомогою ЗТ-кПЛР. Фіг. 6j. Підтвердження старіючого статусу клітин при ВОС (20 днів, фіг. 6е) та ВСПС (30 днів, фіг. 6е) за активністю SA- β -Gal. ПВ - контрольний пустий вектор; КОНТР. - клітини без опромінення. Фіг. 6k. Підтвердження експресії мРНК повнорозмірного L1 у всіх формах старіння клітин із застосуванням ЗТ-кПЛР з праймерами для ампліконів А та F на очищеній полі(А)-РНК. Пізніше початок активації показано шляхом порівняння днів 9 та 20 для ВОС та днів 12 та 30 для ВСПС. (b-e, i-k), n=3 незалежні біологічні зразки, повторювали у 2 незалежних експериментах. Результати являють собою середнє $\pm$ С.О. * P $\leq$ 0,05, ** P $\leq$ 0,01, непарні двосторонні t-критерії.

На фіг. 7 показано картування сайтів ініціації транскрипції у елементах L1, активованих під час старіння клітин. ПЛР зі швидкою ампліфікацією кінців кДНК (5' RACE) проводили з праймерами С та D (фіг. 1a, таблиця 1) на клітинах у стані пізнього старіння (16 тижнів, точка D на фіг. 6a), продукти клонували та окремі клони секвенували за Сенгером (подробіці див. у розділі "Методи"). Фіг. 7a. Отримували множинне вирівнювання послідовностей 50 картованих клонів з консенсусною послідовністю L1HS за допомогою програмного забезпечення MAFFT. Консенсусна послідовність L1HS показана зверху. Штрихування синім кольором вирівняних клонів показує ступінь їх ідентичності з консенсусною послідовністю. Вертикальна зелена лінія позначає початок (положення 1) консенсусної послідовності L1HS. Вертикальні червоні лінії позначають короткі гепи (1-4 нуклеотиди), відкриті у консенсусній послідовності L1HS окремими клонами. Консенсусна послідовність для 50 клонів показана знизу та була отримана за допомогою Jalview. Відомо, що ініціація транскрипції L1 неточна, причому більшість сайтів ініціації зустрічається на відстані $\pm$ 50 п.о. від консенсусного сайту ініціації, та одна підгрупа знаходиться настільки далеко як +180 п.о. [11] Фіг. 7b. Короткий опис результатів картування та класифікації клонів за сімействами елементів L1. Відносні сайти ініціації розраховували по відношенню до консенсусного сайту ініціації L1HS. Програмне забезпечення RepEnrich[12] використовували, щоб зарахувати клони до сімейств L1.

На фіг. 8 показана еволюція транскриптомних змін під час прогресування старіння клітин. Секвенування РНК (RNA-seq) проводили на ранніх проліферуючих клітинах LF1 (РП) та культурах 8-ми тижнів (Стар-Р) та 16-ти тижнів (Стар-П) старіння клітин (точки С та D, відповідно, у Додаткових даних на фіг. 6a). Результати аналізували, застосовуючи трифакторне порівняння: РП у порівнянні зі Стар-Р, РП у порівнянні зі Стар-П та Стар-Р у порівнянні зі Стар-П (подробіці див. у розділі "Методи"). Фіг. 8a. Пропорційні за площею узагальнені діаграми Венна, що зображують перетини трьох порівнянь для наступних наборів даних. i-ii - гени зі значно підвищеною експресією та зниженою експресією (ряд 2x на панелі b). iii-iv - важливі шляхи KEGG, ідентифіковані за допомогою аналізу представленості груп генів (GSEA). Помітна значна еволюція транскриптома у пізній період старіння клітин, прикладом якої є великі зміни (особливо підвищення експресії) у диференційно експресованих генах, а також шляхах. v-vi - значно змінювані гени у групах генів IFN-I та SASP (див. у таблиці 4 анотування груп генів). Помітно, що велика частина змін у генах SASP відбувається рано, тоді як велика складова змін у IFN-I специфічна для пізнього старіння клітин. Фіг. 8b. Коротке уявлення значно змінюваних генів з використанням фіксованого порогу очікуваної частки помилкових відхилень (FDR) ($<0,05$) та порогів з варіабельною кратністю зміни (2x, 1,75x та 1,5x). Фіг. 8c. Аналіз GSEA шляхів KEGG. Подання у вигляді теплової карти показує шляхи зі значно підвищеною експресією червоним кольором (також див. панель e) та шляхи зі зниженою експресією синім кольором. Незначні порівняння показані чорним кольором; вертикальні анотації відносяться до діаграм Венна у (a, iii-iv). Примітно, що у групи генів SASP експресія підвищується рано, тоді як у групи генів IFN-I експресія підвищується пізно. Фіг. 8d. Теплові карти значно змінюваних генів у групах генів IFN-I та SASP. Вертикальні анотації відносяться до діаграм Венна у (a, v-vi). Фіг. 8e. Перелік шляхів KEGG зі значно підвищеною експресією, ідентифікований за допомогою GSEA (див. у таблиці 5 перелік усіх шляхів). HB3 - нормовані показники збагачення. Групи генів IFN-I та SASP виділені жовтим кольором. Помітно значне підвищення експресії IFN-I між раннім та пізнім старінням клітин. Червоним шрифтом позначені шляхи KEGG, що вказують на визначення цитозольної ДНК та відповідь інтерферону I типу у пізньому періоді. Фіг. 8f-g. Профілі GSEA груп генів IFN-I та SASP для всіх порівнянь; FDR виділено жовтим кольором. Примітно, що експресія IFN-I значно підвищується для РП_Стар-П та Стар-Р_Стар-П, але не для РП_Стар-Р, та що підвищення експресії SASP значиме для РП_Стар-Р та РП_Стар-П, але не для Стар-Р_Стар-П. n=3 незалежні біологічні зразки. Аналізували значимість результатів диференційної експресії, застосовуючи інтерфейс GSEA GenePattern, та робили поправку результатів на множинні порівняння шляхом коригування номінальних р-значень із застосуванням методу Беняміні-Хохберга (подробіці див. у розділі "Методи").

На фіг. 9 показана характеристика ефекторів L1 та відповіді IFN-I. Фіг. 9a. Експресію TREX1 визначали за допомогою ЗТ-кПЛР та імуноблоттингу. Результати на гелях див. на фіг. 16. Фіг. 9b. Експресію генів сімейства RB порівнювали за допомогою ЗТ-кПЛР. Підтверджували, що у пар праймерів для всіх генів була еквівалентна ефективність. Фіг. 9c. Збагачення H3K9me3 та H3K27me3 елементів L1 досліджували за допомогою ChIP-кПЛР (використовували праймери ПЛР, показані на фіг. 1b: 5'-НТО, амплікон А; BP31, амплікон Е; BP32, амплікон F). Фіг. 9d. Дані ChIP-seq з проекту ENCODE досліджували для виявлення факторів транскрипції, які зв'язуються з консенсусною послідовністю L1. Кратність зміни $\log_2$ збагачення у порівнянні з контролем вхідної ДНК показана для зазначених ліній клітин. Було задокументоване зв'язування YY1 з промотором L1[13], та його використовували у якості позитивного контролю. SEBRV використовували у якості негативного контролю. Схематичне зображення, яке ілюструє координати L1 та важливі особливості, приведено вище. Амплікони А-Е такі ж, як показано на фіг. 1b. Фіг. 9e. Транскрипційну активність інтактної 5'-НТО L1 або НТО, у якій відсутній сайт зв'язування FOXA1 (НТО-Δ), визначали, використовуючи смисловий та антисмисловий репортери, якими котрансфікували клітини раннього пасажу LF1, або з плазмідною експресією FOXA1, або з пустим вектором (ПВ). Фіг. 9f. Здійснювали нокдаун FOXA1 у старих клітинах за допомогою shFOXA1 (а) (див. також фіг. 2e та фіг. 10a), та зв'язування з 5'-НТО L1 (ампліконом В) визначали за допомогою ChIP-кПЛР. Фіг. 9g. Здійснювали нокдаун RB1, TREX1 та ектопічну експресію FOXA1 у клітинах раннього пасажу у всіх одинарних (1X), подвійних (2X) та потрійних (3X) комбінаціях та оцінювали за допомогою ЗТ-кПЛР, застосовуючи очищену полі(А)-РНК, активацію експресії L1, IFN-α та IFN-β1 (праймери для амплікону F). Показано три контролю: клітини, інфіковані сторонньою кшРНК (shGFP) або експресійною конструкцією (LacZ), або неінфіковані клітини раннього пасажу (РП). Фіг. 9h. Зайнятість 5'-НТО L1 RB1 та FOXA1 у клітинах з 3X визначали за допомогою ChIP-кПЛР, яку проводили, як на фіг. 2a, b. Праймери для ампліконів А та В використовували для RB1 та FOXA1, відповідно. Для порівняння також показані окремі втручання у клітини раннього пасажу за допомогою shRB1 (а) або експресії кДНК FOXA1 (РП FOXA1-HE). Фіг. 9i. Підтвердження експресії мРНК повнорозмірного L1 у клітинах з 3X із застосуванням ЗТ-кПЛР з праймерами для ампліконів А та F на очищеній полі(А)-РНК. КОНТР. - клітини, інфіковані сторонньою кшРНК (shGFP). Фіг. 9j. Представлення у вигляді теплової карти, що показує усі біологічні повтори для 67 генів, що значно змінюють експресію у клітинах Стар та/або 3X (фіг. 2h, таблиця 6). Кластеризацію стовбців розраховували як кореляцію Пірсона-1. Ряди були згруповані у функціональні підгрупи відповіді IFN-I. Фіг. 9k. На діаграмі Венна показано перекривання між 67 генами, які значно змінюються. (a-f, h) n=3 незалежні біологічні зразки, повторювали у двох незалежних експериментах. (g, i), n=3 незалежні експерименти. (a-i). Результати являють собою середнє ± С.О. *P≤0,05, **P≤0,01, непарні двосторонні t-критерії.

На фіг. 10 показана ефективність генетичного та фармакологічного втручань. Фіг. 10a. Нокдаун за допомогою двох різних кшРНК (а, b) або ектопічну експресію кДНК (фіг. 10b) здійснювали у старих клітинах, як описано на фіг. 2d, e, g (також див. розділ "Методи"). Ефективність даних маніпуляцій оцінювали на відповідних мішенях за допомогою ЗТ-кПЛР та імуноблоттингу. Результати на гелях див. на фіг. 16. Фіг. 10c. Експресія мРНК та білку RB1, TREX1 та FOXA1 після потрійного (3X) втручання (фіг. 2f). Фіг. 10d. Вплив обробки ЗТС на відносну поширеність послідовностей L1HS у старих клітинах визначали за допомогою мультиплексної кількісної ПЛР TaqMan на загальній ДНК (набір праймерів 6, таблиця 1). Початок стар. - 0 тижнів старіння (фіг. 1a; точка А на фіг. 6a). ЗТС вводили безперервно з початку старіння до моменту збору через 16 тижнів. Фіг. 10e. Застосовували репортерну систему L1 з подвійною люциферазою [14], щоб визначити вплив введення дози ЗТС на ретротранспозицію. Репортери L1 вводили у клітини раннього пасажу, застосовуючи лентівірусні вектори (подробіці див. у розділі "Методи"), та клітини обробляли ЗТС впродовж 4 днів перед збором та аналізом. JM111 - дефектний репортер, який несе мутації у BP31 (відсутність ЗТС); L1RP - здатний до ретротранспозиції репортер. Фіг. 10f. Вплив введення дози ЗТС на відповідь IFN-I. Після експерименту вище (d) проводили подальшу обробку за допомогою ЗТ-кПЛР, щоб визначити експресію IFN-α та IFN-β1. Фіг. 10g. Нокдаун L1 проводили за допомогою двох різних кшРНК (а, b) у старих клітинах (як на фіг. 2d, e, g) або клітинах 3X (як на фіг. 2g). Ефективність впливу на експресію L1 оцінювали за допомогою ЗТ-кПЛР, застосовуючи очищену полі(А)-РНК та праймери F. Фіг. 10h. У клітинах у експерименті у (g) досліджували рівні білку BP31 за допомогою імунофлуоресценції (ІФ). Аналіз зображень проводили за допомогою програмного забезпечення CellProfiler (подробіці див. у розділі "Методи"). >200 клітин досліджували для кожної умови (УОФ, умовні одиниці флуоресценції). Фіг. 10i. Обробку кшРНК L1 у експерименті у (g) замінили на обробку ЗТС (10 мкМ) впродовж

такого ж періоду часу. Фіг. 10j. Досліджували вплив п'яти різних ІЗТ (або комбінацій) на відповідь IFN-I. AZT (зидовудин, 15 мкМ), ABC (абакавір, 15 мкМ), FTC (емтрицитабін, 10 мкМ), 3ТС (що також називається ламівудином або епівіром, 10 мкМ), TZV (тризівір, комбінація 15 мкМ AZT, 15 мкМ ABC та 7,5 мкМ 3ТС). Клітини обробляли впродовж 4 тижнів між 12 та 16 тижнями старіння клітин (фіг. 1a; точки D та E на фіг. 1a). Клітини 3X (фіг. 2f) обробляли 3ТС впродовж 48 годин після завершення останньої селекції лікарським засобом. Експресію IFN- α визначали за допомогою 3Т-кПЛР. Фіг. 10k. Клітини HeLa котрансфікували нативним репортером L1 (pLD143) [15] разом з плазмідними векторами кшРНК (подробіці див. у розділі "Методи"). Ретротранспозицію оцінювали як GFP-позитивні клітини, та нокдауни shL1 нормували на негативний контроль shLuc. Абсолютна середня частота ретротранспозиції (відсоток GFP-позитивних клітин) складала 4,1, що відповідало опублікованим значенням для використовуваного репортеру (pLD143)53. Фіг. 10l. Нокдауни cGAS та STING проводили у старих клітинах або клітинах 3X, як і з іншими кшРНК (фіг. 2d, e, g та a, g вище). Фіг. 10m. Зниження передачі сигналу інтерферону після опосередкованої CRISPR інактивації генів IFNAR1 та IFNAR2 перевіряли за відсутністю транслокації IRF9 у ядро та фосфорилуванням STAT2 у відповідь на стимуляцію інтерфероном. Клітини інфікували лентивірусними векторами, що експресують Cas9 та направляють РНК (нРНК) для обох IFNAR1 та IFNAR2 (Δ IFNAR, див. розділ "Методи"). Після інфекції клітини повторно висівали на покривні стекла, обробляли інтерфероном впродовж 2 годин та досліджували за допомогою ІФ мікроскопії. Експеримент повторювали тричі з подібними результатами. (a-i, l) n=3 незалежні експерименти. (k) n=3 незалежні біологічні зразки, повторювали у 2 незалежних експериментах. (a-l) Результати являють собою середнє $\pm$ С.О. *P $\leq$ 0,05, **P $\leq$ 0,01, непарні двосторонні t-критерії.

На фіг. 11 показана характеристика цитоплазматичної ДНК у старих клітинах. Фіг. 11a. Клітини у спокої та старі клітини обробляли BrdU, як на фіг. 3a, та локалізацію у клітині включення BrdU візуалізували за допомогою ІФ мікроскопії. Проліферуючі клітини - РП (прол.) - показані у якості позитивного контролю включення BrdU у ядро. Кількісний аналіз сигналів проводили, застосовуючи програмне забезпечення CellProfiler (права панель, див. розділ "Методи"). Досліджували >200 клітин для кожної умови (УОФ, умовні одиниці флуоресценції). Фіг. 11b. Старіючі (та контрольні РП) клітини (ні ті, ні інші не мічені BrdU) фракціонували на ядерні та цитоплазматичні фракції, та представленість послідовностей L1 у даних компартментах (а також цілих клітинах) оцінювали за допомогою кількісної ПЛР, як на фіг. 3a (аналіз методом мультиплексної кількісної ПЛР TaqMan16, амплікон F, фіг. 1b). Варто відмітити, що одиниці осі Y відрізняються у 10 разів між лівою та правою панелями. Фіг. 11c. За допомогою ІФ мікроскопії досліджували присутність у клітинах білку BP31, гібридів РНК-ДНК та одноланцюгової ДНК (олДНК). Антитіла див. у розділі "Методи" та у таблиці 2. Сигнал РНК-ДНК у старих клітинах головним чином колокалізувався з сигналом BP31 та втрачався після обробки РНКазою А. Сигнал олДНК також колокалізувався з сигналом BP31 та виявлявся після обробки РНКазою. Експеримент повторювали три рази з одержанням подібних результатів. Фіг. 11d. Осаджену ДНК, що містить BrdU (фіг. 3c, панель (a) вище, див. розділ "Методи") клонували та секвенували за Сенгером. З усього 96 досліджених клонів 37 картували на L1. Червоні прямокутники представляють відносні положення даних клонів на консенсусній послідовності L1. Фіг. 11e. Старі клітини, мічені BrdU (фіг. 3c, панель (a) вище), імунопреципітували антитілами проти BrdU, та представленість послідовностей L1 у осадженій ДНК оцінювали за допомогою кількісної ПЛР з праймерами, які охоплюють усі елементи L1 (фіг. 1b, c). Фіг. 11f. Старі клітини обробляли кшРНК L1 (застосовуючи лентивірусні вектори, як описано на фіг. 10g) між 12 та 16 тижнями старіння, та визначали експресію генів SASP. Фіг. 11g. Транскрипцію усіх елементів L1 миші оцінювали ланцюг-специфічним способом, використовуючи ту ж стратегію, яку застосовували по відношенню до елементів L1 людини (фіг. 1b, c). Амплікони (позначені W-Z, щоб відрізнити їх від специфічних для людини праймерів) відповідають 5'-НТО (W), BP31 (X), BP32 (Y) та 3'-НТО (Z). Послідовності праймерів також див. у розділі "Методи" та у таблиці 1 (набори праймерів 37, 48-50). Полі(А)-РНК отримували з білої жирової тканини самців. Оцінювали всього 12 тварин (3 групи по 4 тварини у кожній) у трьох незалежних експериментах. Фіг. 11h. Експресія трьох на даний момент активних сімейств елементів L1 миші. Праймери були розроблені таким чином, щоб відрізнити поліморфізми 5'-НТО сімейств MdA, MdN та Tf (див. розділ "Методи", набори праймерів 51-53 у таблиці 1). 3Т-кПЛР проводили, як у (f) вище (без специфічності до ланцюгу). (a, b, e) n=3 незалежні біологічні зразки, повторювали у двох незалежних експериментах. (f), n=3 незалежні експерименти. (a, e-h) Результати являють собою середнє $\pm$ С.О. *P $\leq$ 0,05, **P $\leq$ 0,01. (a) однофакторний дисперсійний аналіз з критерієм множинних порівнянь Т'юкі, (b, e-h) непарні двосторонні t-критерії.

На фіг. 12 показаний ефект порушення активації L1, цитоплазматичного шляху виявлення

ДНК або передачі сигналів інтерферону на експресію IFN-I та відповіді SASP. Фіг. 12a. Клітини 3X обробляли кшРНК L1 або ЗТС впродовж 48 годин, як описано на фіг. 10g, і. Вплив на відповідь IFN-I визначали за допомогою ЗТ-кПЛР, ELISA або імуноблоттингу. Результати на гелях див. на фіг. 16. Фіг. 12b. Здійснювали серійний пасаж клітин до досягнення реплікативного старіння (РсС) з ЗТС (10 мкМ), присутнім на всьому протязі, як на фіг. 3f, та експресію інгібіторів Cdk p21 та p16 оцінювали за допомогою ЗТ-кПЛР. Фіг. 12c. Старі клітини обробляли кшРНК проти cGAS або STING між 12 та 16 тижнями старіння (як описано на фіг. 10l), та визначали експресію генів відповіді IFN-I (IFN- α , IRF7, OAS1). Фіг. 12d. Нокдаун cGAS та STING здійснювали за допомогою кшРНК у клітинах 3X (як на панелі (с) вище), та експресію генів IFN-I досліджували за допомогою ЗТ-кПЛР. Фіг. 12e. Здійснювали нокдаун cGAS та STING у старих клітинах за допомогою кшРНК (як на панелі (с) вище) та експресію генів відповіді SASP (IL-1 β , CCL2, IL-6, MMP3) аналізували за допомогою ЗТ-кПЛР. Фіг. 12f, g. Активність K-9 порівнювали з такою для ЗТС у старих клітинах та клітинах 3X. Культури старих клітин обробляли між 12 та 16 тижнями (як на фіг. 3b), а культури 3X - впродовж 48 годин (як на панелі (а) вище). Вплив на експресію генів IFN-I (IFN- α , IRF7, OAS1) та генів SASP (IL-1 β , IL-6, MMP3) оцінювали за допомогою ЗТ-кПЛР. (a-g), n=3 незалежні експерименти. (a-g) Результати являють собою середнє $\pm$ С.О. *P $\leq$ 0,05, **P $\leq$ 0,01, непарні двосторонні t-критерії.

На фіг. 13 показана оцінка експресії p16, BP31 L1 та pSTAT1 у старих клітинах та зразках шкіри з людей похилого віку. Фіг. 13a. Детектування імунофлуоресценції (ІФ) p16 та BP31 у ранньому пасажі, 3X та старіючих клітинах. Фіг. 13b. Типові зображення комбінованого забарвлювання BP31 та p16 або BP31p та pSTAT1 у дермі людини. Експерименти, представлені на панелях (а, b), незалежно повторювали три рази з одержанням вихідних результатів. Фіг. 13c. Клітини висівали на покривні стекла, зафарбовували та здійснювали кількісний аналіз, як описано у розділі "Методи". Оцінювали 200 клітин у множині полів зору для кожної умови. УОФ, умовні одиниці флуоресценції. На вставках показаний % клітин, виявлених у кожному квадранті. Фіг. 13d, e. Розповсюдженість клітин з BP31 та p16 або pSTAT1 у шкірі людини. Отримували криозрізи біоптатів шкіри та зафарбовували, як описано у розділі "Методи". 200 дермальних фібробластів у множині полів зору оцінювали для кожного суб'єкта. Показані сукупні результати для чотирьох суб'єктів (800 клітин). Фіг. 13f. Результати у (с) та (d) перераховували, щоб показати відносну розповсюдженість p16+ клітин серед усіх клітин, та BP31+ клітин у пулі p16+ клітин. Фіг. 13g. Результати у (е) перераховували як у (f). Фіг. 13h. Характеристика людей, що беруть участь у аналізі дермальних фібробластів. Дані зразки збирали у ході тривалого дослідження довгожителів Leiden Longevity Study. [16] Зразки, використовувані тут, були вибрані довільно із залишків матеріалу. Аналіз індукованих дисфункцією теломер сайтів (TIF) [17] оснований на двопараметричній (кольоровій) візуалізації теломер (із застосуванням зонду FISH) та імунофлуоресцентному детектуванні сайтів пошкодження ДНК (із застосуванням антитіла 53BP1). Внаслідок обмеженої кількості матеріалу не представлялось можливим комбінувати детектування p16 з експериментами TIF у трикольоровому експерименті.

На фіг. 14 показаний вплив лікування ЗТС або K-9 на експресію генів L1, p16, IFN-I та SASP у тканинах миші. Фіг. 14a-с. Мишам у зазначеному віці безперервно вводили ЗТС впродовж двох тижнів (див. також фіг. 4с, е, фіг. 15d-f та розділ "Методи"). Для всіх умов експресію мРНК L1, p16, трьох типових генів відповіді IFN-I (Ifn- α , Irf7, Oas1) та трьох типових генів SASP (Il-6, Mmp3, Rai1) оцінювали за допомогою ЗТ-кПЛР. У жодному випадку експресія через 5 місяців + ЗТС значно не відрізнялася від контролю без лікарського засобу; отже, отримані результати не показані на фігурі (усі зібрані дані див. у таблиці 7). На діаграмах розмаху показаний діапазон даних (вуса), 25-й та 75-й процентилі (ящик), середні значення (пунктирна лінія) та медіани (суцільна лінія). Кожна точка являє собою одну тварину. Фіг. 14a. Вісцеральна біла жирова тканина, самці мишей. 5 місяців, n=8 тварин; 26 місяців, n=12 тварин; 26 місяців + ЗТС, n=12 тварин. Фіг. 14b. Вісцеральна біла жирова тканина, самки мишей. 5 місяців, n=8 тварин; 26 місяців, n=12 тварин; 26 місяців + ЗТС, n=12 тварин. Фіг. 14c. Печінка, самці мишей. 5 місяців, n=8 тварин; 26 місяців, n=10 тварин; 26 місяців + ЗТС, n=10 тварин. Фіг. 14d. Мишам у віці 26 місяців вводили K-9 або ЗТС у питній воді впродовж двох тижнів та аналізували за допомогою ЗТ-кПЛР, як описано вище. НЛ - не лікували. Вісцеральна біла жирова тканина, самці мишей, n=7 тварин у кожній групі. Результати являють собою середнє $\pm$ С.О. *P $\leq$ 0,05, **P $\leq$ 0,01, однофакторний дисперсійний аналіз з критерієм множинних порівнянь Т'юкі.

На фіг. 15 показана комбінована оцінка старіння клітин, маркери IFN-I, SASP та L1 та вплив ЗТС на пов'язані з віком фенотипи у тканинах миші. Фіг. 15a, b. Проводили ІФ тотального препарату білої жирової тканини самців мишей у віці 5 місяців та 26 місяців (з 2 тижнями обробки ЗТС та без обробки). У (а) втрата ламіну В1 (маркеру старіння клітин) колокалізувалася

з IL-6 (маркер SASP). В (b) pStat1 (маркер IFN-I) колокалізувався з BP31 (маркер L1). Фіг. 15с. Кількісний аналіз експериментів, показаних на (a) та (b). Для кожної умови оцінювали чотири тварини та щонайменше 200 клітин на тварину. Фіг. 15d. Нейтральні ліпіди зафарбовували BODIPY, щоб візуалізувати зрілі адипоцити у тотальних препаратах, та макрофаги детектували за допомогою ІФ, застосовуючи антитіло F4/80. Фіг. 15е. Вплив 2 тижнів лікування ЗТС на адипогенез оцінювали шляхом вимірювання середнього розміру адипоцитів (ліва панель) та за допомогою ЗТ-кПЛР, щоб визначити експресію ключових адипогенних генів (праві панелі; Asasa - ацетил-КоА карбоксилаза 1; Ссбра-ССААТ/енхансер-зв'язуючий білок альфа; Fasn - синтаза жирних кислот; Srebp1 - білок 1, зв'язуючий регуляторний елемент стеролу). На діаграмах розмаху показаний діапазон даних (вуса), 25-й та 75-й процентилі (ящик), середні значення (пунктирна лінія) та медіани (суцільна лінія). Розмір адипоцитів (забарвлену BODIPY площу) розраховували, застосовуючи CellProfiler; показані сукупні результати для 5 тварин та всього 500 клітин. У результатах ЗТ-кПЛР кожна точка являє собою одну тварину; n=6 тварин. Фіг. 15f. Експресію гену Ucp1 (термогенін) у бурій жировій тканині визначали за допомогою ЗТ-кПЛР, та вона представлена як у (e). n=5 тварин. Фіг. 15g. Експресію мРНК L1 визначали за допомогою ЗТ-кПЛР, та вона представлена як у (e). 5 місяців, n=8 тварин; 26 місяців, n=12 тварин; 29 місяців, n=6 тварин. (e-g) Результати являють собою середнє $\pm$ С.О. *P $\leq$ 0,05, **P $\leq$ 0,01. (с, е ліва панель, f, g) однофакторний дисперсійний аналіз з критерієм множинних порівнянь Т'юкі, (е праві панелі) непарні двосторонні t-критерії.

На фіг. 16 показані скановані зображення необроблених імуноблотів. Фіг. 16А. Панель а, показаний блот 1-RB1: 1. РП; 2. Стар (П); 3. HE – Стар; 4. Стар (Р); панель b, показаний блот 2-TREX1: 1. РП; 2. Стар (Р); 3. Стар (П); та панель c, показаний блот 3-FOXA1: 1. РП; 2. Зупинка; 3. Стар (Р); 4. Стар (П). Фіг. 16В: панель d, показаний блот 4-RB1: 1. РП; 2. 3Х; панель e, показаний блот 5-TREX1: 1. РП; 2. 3Х; та панель f, показаний блот 6-FOXA1: 1. РП; 2. 3Х. Фіг. 16С. Панель g, показаний блот 7-RB1: 1. Стар (П); 2. shRB1(b); 3. shRB1(a); 4. HE-RB1; панель h, показаний блот 8-TREX1: 1. Стар (П); 2. shTREX1 (b); 3. shTREX1 (a); 4. HE-TREX1; та панель i, показаний блот 9-FOXA1: 1. shFOXA1 (a); 2. shFOXA1 (b); 3. Стар (П); 4. OE-FOXA1. Фіг. 16D. Панель j, показаний блот 10-STAT2: 1. 3Х; 2. shL1; 3. HI3T; 4. Δ IFNAR; 5. РП; панель k, показаний блот 11-IRF7: 1. РП; 2. shL1; 3. 3Х; 4. shL1; 5. Δ IFNAR; панель l, показаний блот 12-STAT2: 1. Стар (П); 2. Δ IFNAR; 3. shL1; 4. HI3T; та панель m, показаний блот 13-IRF7: 5. Стар (П); 6. Δ IFNAR; 7. shL1; 8. HI3T. На Фіг. 16Е показано: панель n, показаний блот 14 – p16 (CDKN2A): 1. РП; 2. Стар (Р); 3. Стар (П); та панель o, показаний блот 15 – p21 (CDKN1A): 1. РП; 2. Стар (Р); 3. Стар (П).

На фіг. 17 показаний вплив адефовіру та ламівудину на викликані старінням клітин підвищення поширеності послідовності L1, експресію генів інтерферону та експресію генів SASP. На фіг. 17а зображено вплив 5 мкМ адефовіру та ламівудину на поширеність послідовності L1 (число копій) у трьох різних лініях клітин фібробластів людини: LF1, IMR90, WI38, визначений із застосуванням аналізу методом кількісної ПЛР. На фіг. 17b зображено вплив 5 мкМ адефовіру та ламівудину на експресію генів інтерферону для двох генів інтерферону (IFN- α та IFN- β) у двох лініях клітин (LF1 та IMR90). На фіг. 17с зображено вплив 5 мкМ адефовіру та ламівудину на два гени SASP (IL-6 та MMP3) у лінії клітин LF1. На фіг. 17d зображено вплив більш високих доз адефовіру та ламівудину (10 мкМ та 50 мкМ) на експресію генів інтерферону (IFN- α та IFN- β) у лінії клітин LF1.

На фіг. 18 показане інгібування активності L1 миші вісьмома сполуками ІЗТ: ламівудин (ЗТС); ставудин; емтрицитабін; априцитабін; тенофовіру дизопроксил; ценсаудин; ельвуцитабін та тенофовір. Отримували дозозалежну відповідь на активність ретротранспозиції активного LINE-1 миші, застосовуючи клітини HeLa, у першому експерименті (фіг. 18А) та у другому незалежному експерименті (фіг. 18В).

На фіг. 19 показане інгібування активності L1 людини трьома сполуками ІЗТ: ламівудин (ЗТС); ценсаудин та ельвуцитабін. Отримували дозозалежну відповідь на активність ретротранспозиції активного LINE-1 людини, застосовуючи клітини HeLa, у першому експерименті із застосуванням ламівудину (ЗТС); ценсаудину та ельвуцитабіну (фіг. 19А); та у другому експерименті із застосуванням ламівудину (ЗТС) та ельвуцитабіну (фіг. 19В).

На фіг. 20 показана життєздатність клітин HeLa після обробки 10 різними сполуками ІЗТ: ламівудин (ЗТС); ставудин; емтрицитабін; априцитабін; тенофовіру дизопроксил; ценсаудин; ельвуцитабін; тенофовір та стауроспорин.

ДОКЛАДНИЙ ОПИС ВИНАХОДУ

Повинно бути зрозуміло, що деякі аспекти, способи, варіанти реалізації, варіації та особливості даного винаходу описані нижче з різними рівнями деталізації, щоб забезпечити значне розуміння цього винаходу.

Наступний опис конкретного(-их) аспекту(-ів) за своїм характером лише ілюстративно та ні у якій мірі не призначений для обмеження обсягу винаходу, його застосувань або використання, які можуть, звичайно, змінюватися. Даний винахід описано у відповідності з необмежуваними визначеннями та термінологією, включеними у дану заявку. Дані визначення та термінологія не

5 призначені для обмеження обсягу або здійснення даного винаходу, та присутні виключно з метою ілюстрування та опису. Хоча композиції або процеси описані як такі, що використовують конкретні матеріали або порядок окремих етапів, має бути зрозуміло, що ці матеріали або етапи можуть бути взаємозамінними, таким чином, що опис винаходу може включати безліч частин або етапів, упорядкованих безліччю способів, що без зусиль зрозуміє фахівець у даній галузі.

10 ВИЗНАЧЕННЯ

Визначення деяких термінів, які використовуються у цьому описі та Формулі винаходу, що додається, представлені нижче. Якщо не вказано інакше, всі технічні та наукові терміни, що використовуються у цьому описі, мають ті ж значення, які зазвичай розуміє середній фахівець у галузі, до якої належить даний винахід.

15 У цьому описі та Формулі винаходу, що додається, форми однини включають посилання на множини, якщо тільки у змісті явно не вказується на інше. Наприклад, термін "клітина" включає комбінацію двох або більше клітин, тощо.

Термін "приблизно" або "близько" при згадці значення або параметру, як правило, використовується, щоб включити кількості, що відхиляються у межах 5 %, 10 %, 15 % або 20 % у

20 будь-якому напрямку (більшому або меншому) від зазначеної кількості, якщо тільки не вказано або не очевидно з контексту інше (за винятком випадків, коли така кількість буде менше 0 % або буде перевищувати 100 % від можливого значення). У цій заявці згадка "приблизно" або "близько" значення або параметру включає (та описує) варіанти реалізації, які спрямовані на це значення або параметр. Наприклад, опис, що посилається на "приблизно X", включає опис "X".

25 У даній заявці термін "або" означає "та/або". У даній заявці мається на увазі, що термін "та/або", використовуваний у такому формулюванні як "А та/або В", включає обидва А та В; А або В; А (окремо) та В (окремо). Аналогічним чином, мається на увазі, що у обсяг терміну "та/або", використовуваного у такому формулюванні як "А, В та/або С", входить кожен з наступних варіантів реалізації: А, В та С; А, В або С; А або С; А або В; В або С; А та С; А та В; В та С; А (окремо); В (окремо) та С (окремо).

Повинно бути очевидно, що у всіх випадках, коли варіанти реалізації описані у даній заявці з терміном "що включає", також запропоновані у іншому випадку аналогічні варіанти реалізації, описані з використанням термінів "що складається з" та/або "що складається по суті з". Також зрозуміло, що у всіх випадках, коли варіанти реалізації описані у даній заявці з терміном "що складається по суті з", також запропоновані у іншому випадку аналогічні варіанти реалізації, описані з використанням терміну "що складається з".

Повинно бути зрозуміло, що деякі особливості цього винаходу, які для ясності описані у даній заявці у контексті окремих варіантів реалізації, також можуть бути запропоновані у комбінації у одному варіанті реалізації. І навпаки, різні особливості даного винаходу, які для

40 стислості описані у контексті одного варіанту реалізації, також можуть бути запропоновані окремо або у будь-якій підкомбінації. Крім того, згадка значень, виражених діапазонами, включає всі без винятку значення всередині даного діапазону.

Термін "суб'єкт" відноситься до ссавця, включаючи, але не обмежуючись перерахованими: собаку, кішку, коня, корову, свиню, вівцю, козу, курчатко, гризуна або примата. Суб'єкти можуть

45 являти собою домашніх улюбленців (наприклад, собак, кішок), сільськогосподарських тварин (наприклад, корів, коней, свиней, курей тощо), лабораторних тварин (наприклад, мишей, щурів, кроликів тощо), але не обмежені ними. Суб'єкти включають людей. Суб'єкт, який являє собою людину, може являти собою суб'єкта дитячого, дорослого або похилого віку. Суб'єкт, який являє собою людину, може бути будь-якої статі.

50 Терміни "ефективна кількість" та "терапевтично ефективна кількість" включають кількість, достатню для запобігання або зниження вираженості прояву захворювання або медичного стану, такого як пов'язаний з віком розлад. Повинно бути очевидно, що у даній галузі відомо багато способів визначення ефективної кількості для даного застосування. Наприклад, можна використовувати фармакологічні способи визначення дозування у терапевтичному контексті. У

55 контексті терапевтичного або профілактичного застосування кількість композиції, яку вводять суб'єкту, буде залежати від типу та тяжкості захворювання та від особливостей суб'єкта, таких як загальний стан здоров'я, вік, стать, маса тіла та переносимість лікарських засобів. Вона також буде залежати від ступеня, тяжкості та типу захворювання. Кваліфікований фахівець зможе визначити відповідні дозування в залежності від даних та інших чинників. Зазначені композиції також можна вводити у комбінації з однією або більше додатковими терапевтичними

60

сполуками.

У даній заявці терміни "процес лікування", або "лікування", або "лікувати", або "полегшення", або "полегшувати" відносяться як до (1) терапевтичних заходів, які зцілюють, уповільнюють, зменшують симптоми та/або зупиняють прогресування діагностованого захворювання або інфекції, так і до (2) профілактичних або попереджувальних заходів, які запобігають або уповільнюють розвиток захворювання або інфекції.

У даній заявці термін "тривале" введення означає, що терапевтичний агент або лікарський засіб вводять впродовж періоду щонайменше 12 тижнів. Це включає випадок, коли терапевтичний агент або лікарський засіб вводять таким чином, що він ефективний понад, або впродовж, періоду, що становить щонайменше 12 тижнів, та не обов'язково має на увазі, що саме введення відбувається впродовж 12 тижнів, наприклад, якщо застосовують композиції з уповільненим вивільненням або тривало діючий терапевтичний агент або лікарський засіб. Таким чином, суб'єкта лікують впродовж періоду, що становить щонайменше 12 тижнів. У багатьох випадках тривале введення відбувається впродовж щонайменше 4, 5, 6, 7, 8, 9 місяців або більше, або впродовж щонайменше 1, 2, 3, 5, 7 або 10 років, або довше.

У даній заявці термін "вікове запалення" (або "пов'язане з віком запалення") означає запалення, зазвичай хронічне, зокрема, хронічне системне запалення, яке виникає при збільшенні віку. Таке запалення можна спостерігати після віку 30, 35 або 40 років, але зазвичай спостерігають у суб'єктів у віці 45, 50, 55 або 60 або більше років. У багатьох випадках це може бути запалення на низькому рівні.

У даній заявці термін "хронічне запалення" означає запалення (наприклад, запальний стан), яке спостерігається постійно або тривалий час у організмі суб'єкта. Загалом, це означає запальну відповідь або стан тривалістю 20, 25 або 30 днів або довше або 1 місяць або довше, зокрема, щонайменше 2 або 3 місяці або довше. Хронічне запалення призводить до прогресуючого зсуву у типі клітин, присутніх у осередку запалення. Хронічне запалення може бути передумовою до розвитку безлічі захворювань або розладів, включаючи, зокрема, дегенеративні захворювання або захворювання або стани, пов'язані з втратою юнацького функціонування або зі старінням.

У даній заявці термін "системне запалення" означає запалення, яке не обмежене конкретно тканиною, або осередком, або локалізацією у організмі. Зазначене запалення може бути поширеним (генералізованим) по всьому організму. У системне запалення зазвичай залучені ендотелій та інші системи органів.

У даній заявці термін "запалення на низькому рівні" (вказаний термін використовують у даній заявці як синонімічний терміну "запалення низького ступеня") характеризується дво-триразовим підвищенням системних концентрацій цитокінів, таких як TNF α , IL-6 та CRP, наприклад, які вимірюють у плазмі або сироватці. Підвищення може бути по відношенню або у порівнянні з нормальними концентраціями або еталонними концентраціями, наприклад, концентраціями, які визначили у конкретній еталонній групі або популяції суб'єктів, наприклад, молодих суб'єктів (наприклад, молодих дорослих) або здорових суб'єктів, наприклад, суб'єктів, які не страждають на будь-яке захворювання або стан, включаючи будь-яке запальне захворювання, або у яких немає запалення. Підвищення також може бути у порівнянні з рівнем концентрації у суб'єкта перед розвиненням запалення. Запалення на низькому рівні можна спостерігати за відсутності явних ознак або симптомів захворювання. Таким чином, запалення на низькому рівні може являти собою субклінічне запалення. У якості альтернативи, у суб'єкта із запаленням на низькому рівні може не бути клінічно діагностованого стану або захворювання, але можуть виявлятися деякі ознаки або симптоми запальної відповіді або запального стану. Іншими словами, можуть бути присутні ознаки або симптоми впливу запалення на організм, але вони можуть ще не прогресувати до явного або помітного захворювання.

У даній заявці термін "ракове запалення" означає запалення, яке відбувається у контексті раку та може, у якості альтернативи, бути назване "пов'язаним з раком запаленням". Встановили, що запалення є характерною ознакою раку та може бути необхідне для онкогенезу та підтримки ракового стану. Симптоми раку пов'язані із запаленням. Таким чином, у суб'єкта з раком може бути присутнім або проявлятися запалення, яке може являти собою запалення на низькому рівні або периферичне запалення, яке обговорювалося вище, та, зокрема, хронічне або системне запалення, яке обговорювалося вище.

Якщо немає інших визначень, всі терміни (включаючи технічні та наукові терміни), які використовуються у даній заявці, мають ті ж значення, які зазвичай розуміє середній фахівець у галузі, до якої належить даний винахід. Крім того, має бути зрозуміло, що терміни, такі як терміни, визначення яких наведено у широко використовуваних словниках, слід тлумачити як такі, що мають значення, яке узгоджується з їх значенням у контексті відповідної галузі техніки

та даного опису, та не слід тлумачити у ідеалізованому або занадто формальному сенсі, якщо тільки вони явно не визначені таким чином у даній заявці.

ФАРМАЦЕВТИЧНІ КОМПОЗИЦІЇ

Композиції та способи відповідно до даного винаходу можна застосовувати для лікування індивіда, який цього потребує. У деяких варіантах реалізації індивід являє собою ссавця, такого як людина, або відмінного від людини ссавця. При введенні тварині, такий як людина, композицію або сполуку переважно вводять у вигляді фармацевтичної композиції, що містить, наприклад, сполуку відповідно до даного винаходу та фармацевтично прийнятний носій. Фармацевтично прийнятні носії добре відомі у даній галузі та включають, наприклад, водні розчини, такі як вода або фізіологічний буферний сольовий розчин, або інші розчинники або середовища, такі як гліколі, гліцерин, масла, такі як оливкове масло, або органічні ефіри для ін'єкцій. У кращих варіантах реалізації, у яких такі фармацевтичні композиції призначені для введення людині, зокрема, для інвазивних шляхів введення (тобто таких шляхів, як ін'єкція або імплантація, при яких уникають транспорту або дифузії через епітеліальний бар'єр), водний розчин є апірогеним або по суті апірогеним. Допоміжні речовини можна вибрати, наприклад, таким чином, щоб вони здійснювали відстрочене вивільнення агенту або селективне націлювання на одну або більше клітин, тканин або органів. Фармацевтична композиція може знаходитися у формі одиничних доз, такий як таблетка, капсула (включаючи капсулу з покритими частинками та желатинову капсулу), гранула, ліофілізат для відновлення вмісту вологи, порошок, розчин, сироп, супозиторій, форма для ін'єкції або тому подібні форми. Композиція також може бути присутньою у системі трансдермальної доставки, наприклад, у шкірному пластирі. Композиція також може бути присутньою у розчині, що підходить для місцевого введення, такому як лосьйон, крем або мазь.

Фармацевтично прийнятний носій може містити фізіологічно прийнятні агенти, які діють, наприклад, щоб стабілізувати, підвищити розчинність або підвищити всмоктування сполуки, такої як сполука відповідно до даного винаходу. Такі фізіологічно прийнятні агенти включають, наприклад, вуглеводні, такі як глюкоза, сахароза або декстрини, антиоксиданти, такі як аскорбінова кислота або глутатіон, хелатуючі агенти, низькомолекулярні білки або інші стабілізатори або допоміжні речовини. Вибір фармацевтично прийнятного носія, включаючи фізіологічно прийнятний агент, залежить, наприклад, від шляху введення композиції. Препарат або фармацевтична композиція може являти собою систему доставки лікарського засобу, яка самоемульгується, або систему доставки лікарського засобу, яка самомікроемульгується. Фармацевтична композиція (препарат) також може являти собою ліпосому або іншу полімерну матрицю, у яку може бути укладено, наприклад, сполуку відповідно до даного винаходу. Ліпосоми, наприклад, які містять фосфоліпіди або інші ліпіди, являють собою нетоксичні, фізіологічно прийнятні носії, які метаболізуються, які відносно просто отримувати та вводити.

Формулювання "фармацевтично прийнятний" використовується у даній заявці по відношенню до тих сполук, матеріалів, композицій та/або лікарських форм, які у межах ретельної медичної оцінки підходять для застосування у контакті з тканинами людей та тварин, не викликаючи надмірну токсичність, подразнення, алергічну відповідь або іншу проблему або ускладнення, які відповідають прийнятному співвідношенню користь/ризик.

Формулювання "фармацевтично прийнятний носій" у даній заявці означає фармацевтично прийнятний матеріал, композицію або середовище, таке як рідкий або твердий наповнювач, розчинник, допоміжна речовина, розчинник або інкапсулюючий матеріал. Кожен носій повинен бути "прийнятним" у тому сенсі, що він сумісний з іншими інгредієнтами складу та не шкідливий пацієнту. Деякі приклади матеріалів, які можуть служити у якості фармацевтично прийнятних носіїв, включають: (1) цукри, такі як лактоза, глюкоза та сахароза; (2) крохмалі, такі як кукурудзяний крохмаль та картопляний крохмаль; (3) целюлозу та її похідні, такі як карбоксиметилцелюлоза натрію, етилцелюлоза та ацетат целюлози; (4) порошок трагакант; (5) солод; (6) желатин; (7) тальк; (8) допоміжні речовини, такі як масло какао та супозиторні воски; (9) масла, такі як арахісове масло, бавовняне масло, сафлорове масло, кунжутне масло, оливкова олія, кукурудзяна олія та соєве масло; (10) гліколі, такі як пропіленгліколь; (11) поліолі, такі як гліцерин, сорбіт, маніт та поліетиленгліколь; (12) ефіри, такі як етилолеат та етиллаурат; (13) агар; (14) буферні речовини, такі як гідроксид магнію та гідроксид алюмінію; (15) альгінова кислота; (16) апірогенну воду; (17) ізотонічний сольовий розчин; (18) розчин Рінгера; (19) етиловий спирт; (20) фосфатно-буферні розчини; та (21) інші нетоксичні сумісні речовини, використовувані у фармацевтичних складах.

Фармацевтичну композицію (препарат) можна вводити суб'єкту за будь-яким з безлічі шляхів введення, включаючи, наприклад, пероральне введення (наприклад, рідкі лікарські форми, такі як у вигляді водних або безводних розчинів або суспензій, таблетки, капсули (включаючи

капсули з покритими частинками та желатинові капсули), болюси, порошки, гранули, пасти для нанесення на язик); всмоктування через слизову оболонку порожнини рота (наприклад, сублінгвально); підшкірне введення; трансдермальне введення (наприклад, у вигляді пластиру, прикріпленого до шкіри); та місцеве введення (наприклад, у вигляді крему, мазі або спрею, нанесеного на шкіру). Сполуку можна також включити до складу для інгаляції. У деяких варіантах реалізації сполуку можна просто розчинити або суспендувати у стерильній воді. Подробиці відносно відповідних шляхів введення та композицій, придатних для них, можна знайти, наприклад, у [патентах США № 6110973; 5763493; 5731000; 5541231; 5427798; 5358970 та 4172896, а також у патентах], цитованих у них.

Склади можуть бути зручним чином представлені у одиничній лікарській формі, та їх можна отримати за допомогою будь-яких способів, добре відомих у галузі фармацевтики. Кількість активного інгредієнту, яку можна об'єднати з матеріалом-носієм для отримання лікарської форми, що містить одну дозу, буде змінюватися в залежності від хазяїна, якого лікують, конкретного способу введення. Кількість активного інгредієнта, яку можна об'єднати з матеріалом-носієм для отримання лікарської форми, що містить одну дозу, як правило, буде являти собою таку кількість сполуки, яка робить терапевтичну дію. Як правило, зі ста відсотків ця кількість буде знаходитися у діапазоні від приблизно 1 відсотку до приблизно дев'яноста дев'яти відсотків активного інгредієнту, переважно від приблизно 5 відсотків до приблизно 70 відсотків, найкраще від приблизно 10 відсотків до приблизно 30 відсотків.

Способи отримання даних складів або композицій включають етап приведення у контакт активної сполуки, такої як сполука відповідно до даного винаходу, з носієм та необов'язково з одним або більше додатковими інгредієнтами. Зазвичай,клади отримують шляхом рівномірного та ретельного приведення у контакт сполуки відповідно до даного винаходу з рідкими носіями, або тонкоподрібненими твердими носіями, або обома типами носіїв, а потім, за необхідності, формування отриманого продукту.

Склади відповідно до даного винаходу, які підходять для перорального введення, можуть перебувати у формі капсул (включаючи капсули з покритими частинками та желатинові капсули), крохмальних облаток, пігулок, таблеток, льодяників (з використанням ароматизованої основи, зазвичай сахарози та камеді акації або трагаканту), ліофілізату, порошків, гранул або у вигляді розчину або суспензії у водній або безводній рідині, або у вигляді рідкої емульсії типу масло у воді або типу вода у маслі, або у вигляді еліксиру або сиропу, або у вигляді пастилок (з використанням інертної основи, такої як желатин та гліцерин, або сахароза та камедь акації) та/або у вигляді рідин для полоскання рота та у тому подібних формах, кожна з яких містить заздалегідь визначену кількість сполуки відповідно до даного винаходу у якості активного інгредієнту. Композиції або сполуки можна також вводити у вигляді болюса, електуарія або пасти.

Для отримання твердих лікарських форм для перорального введення (капсул (включаючи капсули з покритими частинками та желатинові капсули), таблеток, пігулок, драже, порошків, гранул та тому подібних форм), активний інгредієнт змішують з одним або більше фармацевтично прийнятними носіями, такими як цитрат натрію або дикальційфосфат, та/або будь-якими з наступних агентів: (1) наповнювачі або розріджувачі, такі як крохмалі, лактоза, сахароза, глюкоза, маніт та/або кремнієва кислота; (2) зв'язувальні речовини, такі як, наприклад, карбоксиметилцелюлоза, альгінати, желатин, полівінілпіролідон, сахароза та/або камедь акації; (3) зволожувачі, такі як гліцерин; (4) дезінтегруючі агенти, такі як агар-агар, карбонат кальцію, картопляний або маніоковий крохмаль, альгінова кислота, деякі силікати та карбонат натрію; (5) агенти, що уповільнюють розчинення, такі як парафін; (6) прискорювачі всмоктування, такі як сполуки четвертинного амонію; (7) змочувальні агенти, такі як, наприклад, цетиловий спирт та гліцеринмоностеарат; (8) абсорбенти, такі як каолін та бентонітова глина; (9) лубриканти, такі як тальк, стеарат кальцію, магнію стеарат, тверді поліетиленгліколі, лаурилсульфат натрію та їх суміші; (10) комплексоутворюючі агенти, такі як модифіковані та немодифіковані циклодекстрини; та (11) забарвлюючі агенти. У разі капсул (включаючи капсули з покритими частинками та желатинові капсули), таблеток та пігулок фармацевтичні композиції можуть також містити буферні речовини. Тверді композиції подібного типу можна також застосовувати у якості наповнювачів у м'яких та твердих желатинових капсулах, використовуючи такі допоміжні речовини як лактоза або молочні цукри, а також високомолекулярні поліетиленгліколі та тому подібні агенти.

Таблетку можна отримати шляхом пресування або формування, необов'язково з одним або більше додатковими інгредієнтами. Пресовані таблетки можна отримати із застосуванням зв'язувальної речовини (наприклад, желатину або гідроксіпропілметілцелюлози), ковзкої речовини, інертного розчинника, консерванту, дезінтегруючого агенту (наприклад,

крохмальгліколяту натрію або перехресно-зв'язаної карбоксиметилцелюлози натрію), поверхнево-активного або диспергуючого агенту. Формовані таблетки можна отримати шляхом формування у відповідному пристрої суміші порошкової сполуки, зволоженої інертним рідким розріджувачем.

На таблетки та інші тверді лікарські форми фармацевтичних композицій, такі як драже, капсули (включаючи капсули з покритими частинками та желатинові капсули), пігулки та гранули, необов'язково можна нанести риси або отримати їх з покриттям та оболонками, такими як ентросоліюбильне покриття та інші покриття, добре відомі у галузі складання фармацевтичних композицій. Їх також можна включити до складу лікарських форм для забезпечення повільного або контрольованого вивільнення з них активного інгредієнту, застосовуючи, наприклад, гідроксипропілметилцелюлозу у різних співвідношеннях, щоб домогтися бажаного профілю вивільнення, інші полімерні матриці, ліпосоми та/або мікросфери. Їх можна стерилізувати, наприклад, шляхом фільтрації через затримуючий бактерії фільтр або шляхом включення стерилізуючих агентів у формі стерильних твердих композицій, які можна розчинити у стерильній воді або деяких інших стерильних середовищах для ін'єкцій безпосередньо перед застосуванням. Дані композиції можуть також необов'язково містити замутнюючі агенти та можуть мати такий склад, що вони вивільняють активний(-і) інгредієнт(и) тільки, або переважно, у деякій частині шлунково-кишкового тракту, необов'язково відстроченим способом. Приклади інкапсулюючих композицій, які можна застосовувати, включають полімерні речовини та віск. Активний інгредієнт також може бути у мікроінкапсульованій формі, за необхідності, з однією або більше з описаних вище допоміжних речовин.

Рідкі лікарські форми, придатні для перорального введення, включають фармацевтично прийнятні емульсії, ліофілізати для відновлення вмісту вологи, мікроемульсії, розчини, суспензії, сиропи та еліксири. Додатково до активного інгредієнту рідкі лікарські форми можуть містити інертні розріджувачі, які широко застосовуються у даній галузі, такі як, наприклад, вода або інші розчинники, циклодекстрини та їх похідні, соліюбілізуючі агенти та емульгатори, такі як етиловий спирт, ізопропіловий спирт, етилкарбонат, етилацетат, бензиловий спирт, бензилбензоат, пропіленгліколь, 1,3-бутиленгліколь, масла (зокрема, бавовняне, арахісове, кукурудзяне, із зародків пшениці, оливкове, рицинове та кунжутне масла), гліцерин, тетрагідрофуриловий спирт, поліетиленгліколі та складні ефіри жирних кислот та сорбітану, та їх суміші.

Крім інертних розріджувачів пероральні композиції також можуть містити ад'юванти, такі як змочувальні агенти, емульгуючі та суспендуєчі агенти, підсолоджувачі, ароматизатори, барвники, віддушки та консервуючі агенти.

Суспензії, додатково до активних сполук, можуть містити суспендуєчі агенти, такі як, наприклад, етоксильовані ізостеарилові спирти, поліоксиетиленсорбіт та складні ефіри сорбітану, мікрокристалічна целюлоза, метагідроксид алюмінію, бентоніт, агар-агар та трагакант, та їх суміші.

Лікарські форми для місцевого або трансдермального введення включають порошки, спреї, мазі, пасти, креми, лосьйони, гелі, розчини, пластирі та лікарські форми для інгаляції. Активну сполуку можна змішати у стерильних умовах з фармацевтично прийнятним носієм та з будь-якими консервантами, буферами або пропелентами, які можуть знадобитися.

Мазі, пасти, креми та гелі можуть містити, додатково до активної сполуки, допоміжні речовини, такі як тваринні та рослинні жири, масла, віск, парафін, крохмаль, трагакант, похідні целюлози, поліетиленгліколі, силікони, бентоніти, кремнієву кислоту, тальк та оксид цинку, або їх суміші.

Порошки та спреї можуть містити, додатково до активної сполуки, допоміжні речовини, такі як лактоза, тальк, кремнієва кислота, гідроксид алюмінію, силікати кальцію та поліамідний порошок, або суміші цих матеріалів. Спреї можуть додатково містити звичайні пропеленти, такі як хлорфторвуглеводні та леткі незаміщені вуглеводні, такі як бутан та пропан.

Трансдермальні пластирі мають додаткову перевагу, забезпечуючи контрольовану доставку сполуки відповідно до даного винаходу у організм. Такі лікарські форми можна отримати шляхом розчинення або диспергування активної сполуки у підходящому середовищі. Сприяючи всмоктуванню речовини також можна застосовувати для підвищення проникнення сполуки через шкіру. Швидкість такого проникнення можна контролювати або за допомогою контролюючої швидкості проникнення мембрани, або шляхом диспергування сполуки у полімерній матриці або гелі.

Формулювання "парентеральне введення" та "вводили парентерально" у даній заявці означають способи введення, відмінні від ентерального та місцевого введення, зазвичай шляхом ін'єкції, та включають, без обмеження, внутрішньовенну, внутрішньоочну (таку як

інтравітреальну), внутрішньом'язову, інтраартеріальну, інтратекальну, внутрішньокапсулярну, внутрішньоочну, внутрішньосерцеву, внутрішньошкірну, інтраперитонеальну, транстрахеальну, підшкірну, внутрішньошкірну, внутрішньосуглобну, підкапсулярну, субарахноїдальну, внутрішньохребетну та внутрішньостернальну ін'єкцію та інфузію. Фармацевтичні композиції, які підходять для парентерального введення, містять одну або більше активних сполук у комбінації з одним або більше фармацевтично прийнятними стерильними ізотонічними водними або безводними розчинами, дисперсіями, суспензіями або емульсіями, або стерильними порошками, вміст вологи яких можна відновити стерильними ін'єкційними розчинами або дисперсіями безпосередньо перед застосуванням, які можуть містити антиоксиданти, буфери, бактеріостатичні засоби, розчинені речовини, які роблять склад ізотонічним крові передбачуваного реципієнта, або суспендуючі або згущуючі агенти.

Приклади підходящих водних та безводних носіїв, які можна застосовувати у фармацевтичних композиціях відповідно до даного винаходу, включають воду, етанол, поліолі (такі як гліцерин, пропіленгліколь, поліетиленгліколь та тому подібні), та відповідні їх суміші, рослинні масла, такі як оливкове масло, та органічні ефіри для ін'єкцій, такі як етилолеат. Приклади відповідних водних та безводних носіїв, які можна застосовувати у фармацевтичних композиціях відповідно до даного винаходу, включають воду, етанол, поліолі (такі як гліцерин, пропіленгліколь, поліетиленгліколь та тому подібні), та відповідні їх суміші, рослинні масла, такі як оливкове масло, та органічні ефіри для ін'єкцій, такі як етилолеат. Відповідну плинність можна підтримувати, наприклад, шляхом застосування обволікаючих матеріалів, таких як лецитин, шляхом підтримки необхідного розміру частинок у разі дисперсій, та шляхом застосування поверхнево-активних речовин.

Дані композиції також можуть містити ад'юванти, такі як консерванти, змочувальні агенти, емульгуючі агенти та диспергуючі агенти. Запобігання дії мікроорганізмів можна гарантувати шляхом додавання різних антибактеріальних та протигрибкових агентів, наприклад, парабену, хлорбутанолу, фенолсорбінової кислоти та тому подібних агентів. Також може знадобитися додати у композиції ізотонічні агенти, такі як цукри, хлорид натрію та тому подібні агенти. Крім того, пролонгованого всмоктування лікарської форми для ін'єкції можна досягти шляхом додавання агентів, які відтермінують всмоктування, таких як моностеарат алюмінію та желатин.

У деяких випадках для того, щоб продовжити дію лікарського засобу, бажано уповільнити всмоктування лікарського засобу з підшкірної або внутрішньом'язової ін'єкції. Цього можна досягти шляхом застосування рідкої суспензії кристалічного або аморфного матеріалу з поганою розчинністю у воді. Швидкість всмоктування лікарського засобу потім залежить від швидкості його розчинення, яка, у свою чергу, може залежати від розміру кристалів та кристалічної форми. У якості альтернативи, уповільненого всмоктування парентерально введеної лікарської форми досягають шляхом розчинення або суспендування лікарського засобу у масляному середовищі.

Депо-форми для ін'єкцій одержують шляхом формування мікроінкапсульованих матриць обговорюваних сполук у полімерах, які біорозкладаються, таких як полілактид-полігліколід. Залежно від співвідношення лікарського засобу та полімеру та природи конкретного використовуваного полімеру, швидкість вивільнення лікарського засобу можна контролювати. Приклади інших полімерів, які біорозкладаються, включають полі(ортоєфіри) та полі(ангідриди). Депо-склади для ін'єкцій також отримують шляхом укладення лікарського засобу у ліпосомі або мікроемульсії, які сумісні з тканинами організму.

Для застосування у способах відповідно до даного винаходу активні сполуки можна давати у чистому вигляді або у вигляді фармацевтичної композиції, що містить, наприклад, від 0,1 до 99,5 % (більш переважно від 0,5 до 90 %) активного інгредієнту у комбінації з фармацевтично прийнятним носієм.

Способи введення також можуть бути запропоновані за допомогою пристроїв, які перезаправляються або біорозкладаються. Різні полімерні пристрої для повільного вивільнення були розроблені та досліджені *in vivo* у останні роки для контрольованої доставки лікарських засобів, включаючи білкові біофармацевтичні засоби. Різні біосумісні полімери (включаючи гідрогелі), включаючи як полімери, що біорозкладаються, так і полімери, що не розкладаються, можна застосовувати для отримання імплантату для уповільненого вивільнення сполуки у конкретній цільовій ділянці.

Фактичні рівні доз активних інгредієнтів у фармацевтичних композиціях можна змінювати, щоб отримати кількість активного інгредієнту, яка ефективно призводить до досягнення бажаної терапевтичної відповіді для конкретного пацієнта, композиції та способу введення, без токсичної дії на пацієнта.

Обраний рівень дозування буде залежати від різних факторів, включаючи активність конкретної сполуки або комбінації використовуваних сполук, або її складного ефіру, солі або аміду, шляху введення, часу введення, швидкості виведення конкретної(-их) використовуваної(-их) сполуки(сполук), тривалості лікування, інших лікарських засобів, сполук та/або матеріалів, що застосовуються у комбінації з конкретною(ими) використовуваною(ими) сполукою(ами), віку, статі, маси тіла, стану, загального стану здоров'я та анамнезу пацієнта, якого лікують, і тому подібних факторів, добре відомих у галузі медицини.

Лікар або ветеринар із середнім рівнем компетенції у даній галузі може легко визначити та призначити необхідну терапевтично ефективну кількість фармацевтичної композиції. Наприклад, лікар або ветеринар може почати з доз фармацевтичної композиції або сполуки на рівнях, нижчих ніж необхідні для надання бажаної терапевтичної дії, та поступово підвищувати дозування до досягнення бажаного ефекту. Під "терапевтично ефективною кількістю" мають на увазі концентрацію сполуки, якої достатньо, щоб викликати бажану терапевтичну дію. Як правило, зрозуміло, що ефективна кількість сполуки буде змінюватися в залежності від маси тіла, статі, віку та анамнезу суб'єкта. Інші фактори, які впливають на ефективну кількість, можуть включати, але не обмежені перерахованими: тяжкість стану пацієнта, розлад, який лікують, стабільність сполуки та, за необхідності, інший тип терапевтичного агента, який вводять разом із сполукою відповідно до даного винаходу. Більш велику сумарну дозу можна доставити шляхом безлічі введень агенту. Способи визначення ефективності та дозування відомі фахівцям у даній галузі.[18]

Зазвичай, відповідна добова доза активної сполуки, що використовується у композиціях та способах відповідно до даного винаходу, буде являти собою таку кількість сполуки, яка являє собою найменшу дозу, ефективну для надання терапевтичної дії. Така ефективна доза, як правило, буде залежати від факторів, описаних вище.

За необхідності, ефективну добову дозу активної сполуки можна вводити у вигляді однієї, двох, трьох, чотирьох, п'яти, шести або більше часткових доз, які вводять окремо з відповідними інтервалами впродовж дня, необов'язково у вигляді лікарських форм, що містять одну дозу. У деяких варіантах реалізації даного винаходу активну сполуку можна вводити по два або три рази щодня. У інших варіантах реалізації активну сполуку будуть вводити раз на день.

Пацієнт, який отримує дане лікування, являє собою будь-яку тварину, яка цього потребує, включаючи приматів, зокрема, людей; та інших ссавців, таких як представники родини конячих, бичахих, свинячих, овечих, котячих та собачих; домашніх птахів; та домашніх улюбленців у цілому.

У деяких варіантах реалізації сполуки відповідно до даного винаходу можна застосовувати окремо або вводити спільно з іншим типом терапевтичного агента.

Відповідно до даного винаходу запропоноване застосування фармацевтично прийнятних солей сполук відповідно до даного винаходу у композиціях та способах відповідно до даного винаходу. У деяких варіантах реалізації запропоновані солі відповідно до даного винаходу включають, але не обмежені солями алкіл-, діалкіл-, триалкіл- або тетраалкіламонію. У деяких варіантах реалізації запропоновані солі відповідно до даного винаходу включають, але не обмежені солями L-аргініну, бенентаміну, бензатину, бетаїну, гідроксиду кальцію, холіну, деанолу, діетаноламіну, діетиламіну, 2-(діетиламіно)етанолу, етаноламіну, етилендіаміну, N-метилглюкаміну, гідрабаміну, 1H-імідазолу, літію, L-лізину, магнію, 4-(2-гідроксиетил)морфоліну, піперазину, калію, 1-(2-гідроксиетил)піролідину, натрію, триетаноламіну, трометаміну та цинку. У деяких варіантах реалізації запропоновані солі відповідно до даного винаходу включають, але не обмежені солями Na, Ca, K, Mg, Zn або інших металів. У деяких варіантах реалізації запропоновані солі відповідно до даного винаходу включають, але не обмежені солями 1-гідрокси-2-нафтоїної кислоти, 2,2-дихлороцтової кислоти, 2-гідроксиетансульфонової кислоти, 2-оксоглутарової кислоти, 4-ацетамідобензойної кислоти, 4-аміносаліцилової кислоти, оцтової кислоти, адипінової кислоти, l-аскорбінової кислоти, l-аспарагінової кислоти, бензолсульфонової кислоти, бензойної кислоти, (+)-камфорої кислоти, (+)-камфор-10-сульфонової кислоти, капринової кислоти (деканової кислоти), капронової кислоти (гексанової кислоти), каприлової кислоти (октанової кислоти), карбонової кислоти, коричної кислоти, лимонної кислоти, цикламової кислоти, додецилсірчаної кислоти, етан-1,2-дисульфонової кислоти, етансульфонової кислоти, мурашиної кислоти, фумарової кислоти, галактарової кислоти, гентизинової кислоти, d-глюкогептонової кислоти, d-глюконової кислоти, d-глюкуронової кислоти, глутамінової кислоти, глутарової кислоти, гліцерофосфорної кислоти, гліколевої кислоти, гіпурової кислоти, бромистоводневої кислоти, соляної кислоти, ізомасляної кислоти, молочної кислоти, лактобіонової кислоти, лауринової кислоти, малеїнової кислоти, l-яблучної кислоти, маленової кислоти, мигдальної кислоти, метансульфонової кислоти, нафталін-1,5-

дисульфонової кислоти, нафталін-2-сульфонової кислоти, нікотинової кислоти, азотної кислоти, олеїнової кислоти, щавлевої кислоти, пальмітинової кислоти, памоевої кислоти, фосфорної кислоти, пропіонової кислоти, l-піроглютамінової кислоти, саліцилової кислоти, себацінової кислоти, стеаринової кислоти, бурштинової кислоти, сірчаної кислоти, l-винної кислоти, тіоціанової кислоти, p-толуолсульфонової кислоти, трифтороцтової кислоти та ундециленової кислоти.

Фармацевтично прийнятні солі приєднання кислоти можуть також існувати у вигляді різних сольватів, наприклад, з водою, метанолом, етанолом, диметилформамідом та тому подібними розчинниками. Суміші таких сольватів також можна отримати. Джерелом такого сольвату може бути розчинник кристалізації: може бути властивістю, властивою розчиннику, що використовується при отриманні або кристалізації, або може бути зовнішнім по відношенню до розчиннику.

Змочувальні агенти, емульгатори та ковзкі речовини, такі як лаурилсульфат натрію та стеарат магнію, а також забарвлюючі агенти, розділювальні агенти, покривальні агенти, підсолоджувачі, ароматизатори та віддушки, консерванти та антиоксиданти також можуть бути присутніми у композиціях.

Приклади фармацевтично прийнятних антиоксидантів включають: (1) водорозчинні антиоксиданти, такі як аскорбінова кислота, цистеїну гідрохлорид, бісульфат натрію, метабісульфіт натрію, сульфід натрію та тому подібні антиоксиданти; (2) розчинні у маслі антиоксиданти, такі як аскорбілпальмітат, бутилгідроксианізол (BHA), бутилгідрокситолуол (BHT), лецитин, пропілгалати, альфа-токоферол та тому подібні антиоксиданти; та (3) хелатуючі агенти, такі як лимонна кислота, етилендіамінтетраоцтова кислота (ЕДТА), сорбіт, винна кислота, фосфорна кислота та тому подібні агенти.

РОЛЬ СТАРІННЯ КЛІТИН У СТАРІННІ ТА ПОВ'ЯЗАНИХ З ВІКОМ ЗАХВОРЮВАННЯХ

На фіг. 5 представлена схема послідовності, що описує молекулярний шлях старіння клітин, що приводить до пов'язаного з віком стерильного запалення, що описане більш докладно нижче.

Підвищення експресії ретротранспозованих елементів (RTE)

Відомо, що транскрипція RTE активується у старих клітинах [19] та у деяких тканинах миші. [20] Раніше було показано, що три регуляторні фактори беруть участь у регуляції L1: FOXA1, RB, TRESX1. Було описано, що у старих клітинах підвищується експресія FOXA1, [21] та він зв'язується з промотором L1. [22] Було описано, що RB репресує елементи L1. [23] Було описано, що повна втрата TRESX1 (генеративна делеція) приводить до аутоімунного захворювання (синдром Айкарді-Гут'єрес, AGS), яке пов'язане з активацією L1. [24]

Хоча було описано, що дані три регуляторні фактори грають роль у регуляції L1, результати, представлені у даному описі, вперше демонструють, що неправильної регуляції комбінації даних трьох факторів достатньо, щоб забезпечити можливість активації ендегенних елементів L1 у нормальних клітинах. Див. приклад 2. Більше того, у відповідності з даним винаходом запропонований перший опис пізнього клітинного старіння як окремої тимчасової, та до даного часу невідомої, стадії старіння клітин, для якої характерне підвищення експресії елементів L1 та запуск відповіді IFN-I. Див. приклад 1.

Накопичення цитоплазматичної кДНК L1

Існування цитоплазматичної кДНК L1 було відомо. Було показано, що одним її джерелом є мітохондрії. [25] Повідомлялося, що хромосомна ДНК "витікає" з ядер у цитоплазму у старих клітинах. [26] Її згодом назвали "цитоплазматичними фрагментами хроматину" (ЦФХ, CCF) [27] та пізніше описали її наявність у старих клітинах. [28] Проте, у жодному з даних повідомлень не згадували RTE та L1 як компоненти ЦФХ.

Результати у цьому описі показують не тільки те, що послідовності ДНК L1 виявлені у цитоплазмі старих клітин, але також що їх кількість більше, ніж у ядерних послідовностях ДНК. Див. приклад 3. З цієї причини, раніше описане просте витіснення частини хромосомної ДНК з ядра у цитоплазму не може пояснити більшу кількість послідовностей L1, що спостерігається тут.

Хоча раніше повідомляли, що кількість ДНК L1 була підвищена у клітинах, позбавлених TRESX1 (AGS) [29], та що кДНК L1, яка накопичується у клітинах з нокаутом TRESX1, була цитоплазматичної локалізації, [30] AGS є рідкісним аутоімунним захворюванням, яке не пов'язане з віком. Навпаки, результати, представлені у даному описі, дозволяють прийти до висновку, що присутність цитоплазматичної ДНК L1 властива старим клітинам - одному з основних факторів, що стимулюють старіння організму та захворювання, пов'язані зі старінням.

Індукція IFN-I та взаємовплив на імунну систему, посилення SASP

Раніше повідомляли, що цитоплазматична ДНК (і, зокрема, ЦФХ) упізнається сенсорним

сигнальним шляхом cGAS/STING, який, отже, викликає запальний стан. [31] У контексті старіння клітин даний прозапальний стан відомий як асоційований зі старінням клітин секреторний фенотип (SASP). У даних повідомленнях показали, що SASP щонайменше частково залежить від ЦФХ, оскільки нокдаун компонентів сигнального шляху cGAS/STING зменшував SASP. Також повідомляли, що відповідь IFN-I є частиною даного прозапального каскаду. [32] Вище зазначено, що в жодному з даних попередніх повідомлень не пов'язували елементи L1 з активацією SASP за допомогою ЦФХ.

Результати, представлені у даному описі, доводять, що ДНК L1 не тільки становить значну частину ЦФХ, яким збагачена цитоплазматична ДНК у порівнянні з ядерними послідовностями, але вона також функціонально значима для активації SASP. Зокрема, результати, представлені у даному описі, показують, що зменшення кількості цитоплазматичної ДНК L1, або за допомогою кшПНК до L1, або шляхом блокування зворотної транскрипції L1 за допомогою лікарських засобів - ІЗТ, зменшувало як відповідь IFN-I, так і SASP у старих клітинах. Важливо відзначити, що результати, представлені у даному описі, являють собою перший доказ, що підтверджує, що лікування за допомогою ІЗТ може ефективно обернути як IFN-I, так і прозапальний SASP після того, як вони повністю встановилися у старих клітинах. Див. приклади 3 та 4.

Усі попередні дослідження, що мають відношення до терапії, були обмежені перешкоджанням сигнальному шляху виявлення ДНК cGAS/STING, наприклад, що показують, що кшПНК проти компонентів шляху cGAS/STING негативно регулювала відповідь IFN-I та SASP. [33,34] Хоча можна припустити, що застосування низькомолекулярних інгібіторів сигнального шляху cGAS/STING буде знижувальним чином регулювати SASP, таке лікування призведе до підвищеної сприйнятливості до вірусних, бактеріальних інфекцій та інфікування іншими патогенами.

Підхід націлювання лікарських засобів ІЗТ у відповідності з даним винаходом на синтез ДНК L1 звернений до кореня проблеми, так як він націлений на агент, який є початковою причиною (саму ДНК L1), а не на наступні події процесингу, такі як сигнальний шлях виявлення ДНК cGAS/STING, або навіть ще більш далекі компоненти сигнальних шляхів інтерферону або імунітету. Автори даного винаходу розуміють, що всі дані наступні компоненти мають незамінні клітинні функції, і, отже, націлювання на них порушить, у деякому аспекті, нормальні фізіологічні процеси. З іншого боку, ДНК L1 являє собою унікальний "чужорідний" компонент, фармакологічному націлюванню на який можуть перешкоджати тільки "побічні" ефекти.

У останні роки стало ясно, що старіння клітин є одним з основних факторів, що сприяють старінню організму та пов'язаним зі старінням захворюванням. [35] Отже, присутній значний інтерес у "сенотерапевтичних засобах", які блокують шкідливий вплив старих клітин. [36] Основні зусилля були спрямовані на "сенолітичні" лікарські засоби, які селективно знищують (і, отже, видаляють) старі клітини з тканин. "Сеноморфіки" були класифіковані як невеликі молекули, які пригнічують старіючі фенотипи без знищення клітин. Ми вважаємо за краще називати такі лікарські засоби "сеностатичними" лікарськими засобами, щоб особливо підкреслити, що їх основна дія полягає у зупинці або блокуванні шкідливого впливу старих клітин, зокрема, SASP.

Результати у цьому описі демонструють, що у клітинах людини та у моделях на мишах ІЗТ є сеностатичні лікарські засоби, які обертають SASP старих клітин і, отже, послаблюють пов'язаний з віком прозапальний стан. Результати у цьому описі також описують, які конкретно ІЗТ, та у яких дозах, особливо ефективні для обернення SASP. Широка ефективність ІЗТ як сеностатичних лікарських засобів, які можуть лікувати безліч пов'язаних з віком станів, раніше не була описана у даній галузі.

Стимуляція пов'язаного з віком "стерильного" запалення

Стерильне запалення, також відоме як запальне старіння (inflammaging), є характерною ознакою старіння та чинником, що сприяє безлічі пов'язаних з віком захворювань. [37,38] Результати у цьому описі свідчать про те, що активація елементів L1 (та необов'язково інших RTE) викликає запальне старіння, та що ЗТ L1 є підходящою мішенню для лікування пов'язаного з віком запалення та вікових розладів.

У цьому описі запропоновані конкретні приклади старих мишей, у яких пов'язані з віком патології можна обернути або щонайменше зменшити шляхом введення ІЗТ. Наприклад, показано, що НІЗТ ламівудин (також відомий як ЗТС або епівір) обертає або знижувальним чином регулює:

- Панель маркерів IFN-I та SASP, виміряних за допомогою ЗТ-кПЛР у багатьох тканинах;
- Інфільтрацію макрофагів у білу жирову тканину та тканину нирки, виміряну за допомогою

ІФ мікроскопії;

- Атрофію м'язів, виміряну за діаметром м'язового волокна;
 - Гломерулосклероз нирки, виміряний за допомогою патологічної оцінки забарвлених ШІК зрізів;

- Атрофію адипоцитів, виміряну за допомогою мікроскопу за розміром клітин та шляхом аналізу за допомогою ЗТ-кПЛР ключових адипогенних генів; та
 - Термогенез, виміряний шляхом аналізу за допомогою ЗТ-кПЛР експресії Ucp1.

Таким чином, у відповідності з даним винаходом запропоноване застосування ІЗТ у якості "сеностатичних" лікарських засобів, які здатні зупиняти або блокувати шкідливий вплив старих клітин, зокрема, SASP, та попереджати або обертати пов'язані з віком запалення та розлади.

10 НУКЛЕОЗИДНІ ІНГІБІТОРИ ЗВОРОТНОЇ ТРАНСКРИПТАЗИ (НІЗТ)

НІЗТ являють собою активні інгібітори зворотної транскриптази, виявлені у ретровірусах, таких як вірус імунодефіциту людини (ВІЛ). Різні нуклеозидні інгібітори зворотної транскриптази можуть активуватися різним способом, але у них однаковий механізм дії. НІЗТ, як правило, активуються фосфорилуванням клітинними ферментами з утворенням трифосфатної форми. Вона потім конкурує з клітинними трифосфатами, які є субстратами для провірусної ДНК, що продукується вірусною зворотною транскриптазою. НІЗТ були першим типом лікарських засобів, доступних для лікування вірусу імунодефіциту людини (ВІЛ-інфекції) та синдрому набутого імунодефіциту (СНІД).

У таблиці 8 представлений перелік звичайних схвалених лікарських засобів НІЗТ або комбінованих лікарських засобів НІЗТ, що застосовуються для лікування ВІЛ-інфекції та СНІДу. Вище описано, відповідно до способів винаходу, що НІЗТ можна застосовувати у якості "сеностатичних" лікарських засобів, які здатні зупиняти або блокувати шкідливий вплив старих клітин, зокрема, SASP, та запобігати або обертати пов'язані з віком запалення та розлади.

Лікарські засоби на основі НІЗТ, які можна застосовувати у способах даного винаходу, включають, але не обмежені перерахованими: Амдоксовір, Априцитабін (АТС), АТРИПЛА® (ефавіренц/емтрицитабін/теніфовіру дизопроксил), БАРАКЛЮД® (ентекавір; ETV), БІКТАРВІ® (біктегравір/емтрицитабін/теніфовіру алафенамід), Ценсабудин (INN; BMS-986001; OBP-601; фестинавір), КОМБІВІР™ (зидовудин/ламівудин), КОВІРАЦИЛ™ (емтрицитабін; FTC), DAPD/DXG (активний метаболіт DAPD-2,6-діамінопуриндіоксолан), ДЕСКОВІ® (емтрицитабін/теніфовіру алафенамід), D-D4FC (Дексельвудитабін; Реверсет; INCB-8721; DPC 817), dOTC (2'-дезоксид-3'-окса-4'-тіоцитидин; BCH-10652), Ельвудитабін, ЕМТРИВА™ (емтрицитабін), ЕПІВІР™ (ламівудин; ЗТС), EFdA (4'-етиніл-2'-фтор-2'-дезоксиаденозин; МК-8591), ЕВІПЛЕРА™ (рилпівірин/емтрицитабін/теніфовіру дизопроксил), ГЕНВОЯ® (елвітегравір/кобіцистат/емтрицитабін/теніфовіру алафенамід), ХІВІД™ (залцитабін; ddC), КІВЕКСА™ (абакавір/ламівудин), ЛОДЕНОЗИН™ (F-ddA), ОДЕФСЕЙ® (рилпівірин/теніфовіру алафенамід/емтрицитабін), ПРЕВЕОН® (адефовіру дидіпівоксил), Рацивір (RCV; (+/-)-емтрицитабін), РЕТРОВІР™ (зидовудин; ZDV; азидотимідин; AZT), Стампідин, СТІБІЛД® (Елвітегравір /кобіцистат/емтрицитабін/теніфовіру дизопроксил), ТЕНОФОВІР™ (TDF, bis-POC RMPA), ТРИУМЕК® (долутегравір/абакавір/ламівудин), ТРИЗІВІР™ (абакавір/ламівудин/зидовудин), ТРУВАДА® (емтрицитабін/теніфовіру дизопроксил), ВЕМЛІДІ® (теніфовіру алафенамід; TAF), ВІДЕКС™ (диданозин, ddl), ВІРЕАД™ (теніфовіру дизопроксил), ЗІАГЕН™ (абакавір; 159U89), та ЗЕРИТ™ (ставудин; d4T).

У дозах, що застосовуються для терапії ВІЛ/СНІД, дані лікарські засоби можуть викликати широкий діапазон побічних дій. Звичайні побічні дії НІЗТ включають, серед іншого, токсичність для мітохондрій (пов'язану з інгібуванням мітохондріальної полімерази), нейропатію, панкреатит, стеатоз печінки та молочнокислий ацидоз, мієлосупресію, симптоматичну міопатію та кардіоміопатію. [39] Хоча НІЗТ можна застосовувати у дозах, схвалених для лікування ВІЛ/СНІД, для попередження або лікування пов'язаних з віком запалення та розладів можна застосовувати більш низькі дози, щоб уникнути побічних дій, пов'язаних з більш високими дозами. У одному варіанті реалізації дозування, що застосовується для попередження або лікування пов'язаних з віком запалення та розладів, становить половину (50 %) дозування, схваленого для лікування ВІЛ/СНІД (див. Таблицю 9). У альтернативному варіанті реалізації застосовуване дозування становить 75 % від дозування, схваленого для лікування ВІЛ/СНІД. У ще одному альтернативному варіанті реалізації застосовуване дозування становить 25 % від дозування, схваленого для лікування ВІЛ/СНІД. У інших альтернативних варіантах реалізації застосовуване дозування становить 90 %, 80 %, 70 %, 60 %, 40 %, 30 %, 20 %, або 10 % від дозування, схваленого для лікування ВІЛ/СНІД. У інших альтернативних варіантах реалізації застосовувана доза становить від 0,1 до 99,5 %, від 10 до 90 %, від 20 до 80 %, від 25 до 75 %, від 30 до 70 %, від 40 до 60 % або від 45 до 55 % від дозування, схваленого для лікування ВІЛ/СНІД.

У деяких варіантах реалізації суб'єкту проводять тривале введення одного або більше лікарських засобів ІЗТ згідно з визначенням у даній заявці. У одному варіанті реалізації суб'єкта лікують впродовж періоду, що становить щонайменше 12 тижнів. У багатьох випадках тривале введення здійснюють впродовж щонайменше 4, 5, 6, 7, 8, 9 місяців або більше, або впродовж щонайменше 1, 2, 3, 5, 7 або 10 років або більше.

ПОВ'ЯЗАНІ З ВІКОМ РОЗЛАДИ

У зв'язку з тим, що старіння клітин є одним з основних факторів, що сприяють старінню організму та пов'язаним зі старінням захворюванням [40], способи у відповідності з даним винаходом можна застосовувати для попередження або лікування розладів або захворювань, які пов'язані зі старінням клітин, зокрема, у яких присутність старих клітин ймовірно робить шкідливу дію, шляхом введення одного або більше сеностатичних лікарських засобів ІЗТ.

Розлади або захворювання, які пов'язані зі старінням клітин, включають, але не обмежені перерахованими: хворобу Альцгеймера, [41] бічний аміотрофічний склероз (БАС), атеросклероз, [42] хворобу Гентінгтона, втрату зору, втрату слуху, дегенеративні захворювання периферичної нервової системи, дисфункцію серцево-судинної системи, [43] атеросклероз, лобно-скроневу деменцію (ЛСД), розсіяний склероз (РС), синдром Айкарді-Гут'єрес, прогресуючий над'ядерний параліч (ПНП), викликані хіміотерапією небажані явища (наприклад, пригнічення функції кісткового мозку, кардіотоксичність, рецидив раку, тромби, втомлюваність), [44] порушення функціонування гематопоетичних стовбурових клітин, [45] остеоартрит, [46] остеопороз, [47] хворобу Паркінсона, [48] порушення фізичного функціонування, [49] фіброз легень, [50] старіння шкіри, загоєння ран та/або регенерацію тканин. [51]

СПОСОБИ ЛІКУВАННЯ, ПОПЕРЕДЖЕННЯ ТА ОБЕРНЕННЯ ПОВ'ЯЗАНОГО З ВІКОМ ЗАПАЛЕННЯ ЗА ДОПОМОГОЮ ІЗТ

Запропоновано спосіб лікування, попередження та обертання пов'язаного з віком запалення у пацієнта, який цього потребує, шляхом введення інгібітору зворотної транскриптази (ІЗТ) пацієнту, який цього потребує. Пов'язане з віком запалення може бути у пацієнта, у якого є хвороба Альцгеймера, бічний аміотрофічний склероз, хвороба Паркінсона, хвороба Гентінгтона, втрата зору, втрата слуху, дегенеративні захворювання периферичної нервової системи та дисфункція серцево-судинної системи.

У одному варіанті реалізації запропонований спосіб відтермінування або обертання прогресування патології, що лежить у основі пов'язаного з віком запального розладу, який включає введення пацієнту, який цього потребує, терапевтично ефективної кількості щонайменше одного інгібітору зворотної транскриптази (ІЗТ). У деяких варіантах реалізації пацієнт відчуває ослаблення одного або більше симптомів хвороби Альцгеймера у порівнянні з такими перед першим введенням ІЗТ пацієнтові.

У іншому варіанті реалізації запропонований спосіб попередження початку пов'язаного з віком запального розладу у пацієнта, у якого підозрюють наявність легкого когнітивного порушення, що включає введення щонайменше одного ІЗТ пацієнту, який цього потребує.

У деяких варіантах реалізації НІЗТ являє собою абакавір, ламівудин, зидовудин, емтрицитабін, тенофовіру дизопроксилфумарат, тенофовіру алафенамід, диданозин, ставудин, априцитабін, аловудин, дексельвуцитабін, амдоксовір, фосалвудин або ельвуцитабін. У інших варіантах реалізації ІЗТ являє собою абакавір (Зіаген), абакавір/ламівудин (Епзіком), абакавір/ламівудин/зидовудин (Тризівір), ламівудин/зидовудин (Комбівір), ламівудин (Епівір), зидовудин (Ретровір), емтрицитабін/тенофовіру дизопроксилфумарат (Трувада), емтрицитабін (Емтрива), тенофовіру дизопроксилфумарат (Віреад), емтрицитабін/тенофовіру алафенамід (Дескові), диданозин (Відекс), диданозин з пролонгованим вивільненням (Відекс ЕС) або ставудин (Зерит). У іншому варіанті реалізації НІЗТ являє собою ценсавудин.

У деяких варіантах реалізації щонайменше один ІЗТ являє собою нунуклеозидний інгібітор зворотної транскриптази (ННІЗТ). У деяких варіантах реалізації щонайменше один НІЗТ являє собою Ефавіренц (EFV), Невірапін (NVP), Делавірдин (DLV), Етравірін або Рилпівірін.

У додатковому варіанті реалізації ІЗТ інгібує активність зворотної транскриптази L1 у клітині, наприклад, у клітині головного мозку, пацієнта.

У випадках, коли ІЗТ є схваленим FDA лікарським засобом, ІЗТ можна вводити у терапевтично ефективних кількостях, які схвалені для терапевтичного застосування. У інших варіантах реалізації ефективні кількості можна визначити за допомогою не більше ніж проведення звичайного експерименту. Наприклад, ефективні кількості можуть бути у діапазоні від приблизно 1 нг/кг до приблизно 200 мг/кг, від приблизно 1 мкг/кг до приблизно 100 мг/кг або від приблизно 1 мг/кг до приблизно 50 мг/кг. Дозування композиції може являти собою будь-яке дозування, включаючи, але не обмежуючись приблизно 1 мкг/кг. Дозування композиції може являти собою будь-яке дозування, включаючи, але не обмежуючись перерахованими:

приблизно 1 мкг/кг, приблизно 10 мкг/кг, приблизно 25 мкг/кг, приблизно 50 мкг/кг, приблизно 75 мкг/кг, приблизно 100 мкг/кг, приблизно 125 мкг/кг, приблизно 150 мкг/кг, приблизно 175 мкг/кг, приблизно 200 мкг/кг, приблизно 225 мкг/кг, приблизно 250 мкг/кг, приблизно 275 мкг/кг, приблизно 300 мкг/кг, приблизно 325 мкг/кг, приблизно 350 мкг/кг, приблизно 375 мкг/кг, приблизно 400 мкг/кг, приблизно 425 мкг/кг, приблизно 450 мкг/кг, приблизно 475 мкг/кг, приблизно 500 мкг/кг, приблизно 525 мкг/кг, приблизно 550 мкг/кг, приблизно 575 мкг/кг, приблизно 600 мкг/кг, приблизно 625 мкг/кг, приблизно 650 мкг/кг, приблизно 675 мкг/кг, приблизно 700 мкг/кг, приблизно 725 мкг/кг, приблизно 750 мкг/кг, приблизно 775 мкг/кг, приблизно 800 мкг/кг, приблизно 825 мкг/кг, приблизно 850 мкг/кг, приблизно 875 мкг/кг, приблизно 900 мкг/кг, приблизно 925 мкг/кг, приблизно 950 мкг/кг, приблизно 975 мкг/кг, приблизно 1 мг/кг, приблизно 5 мг/кг, приблизно 10 мг/кг, приблизно 15 мг/кг, приблизно 20 мг/кг, приблизно 25 мг/кг, приблизно 30 мг/кг, приблизно 35 мг/кг, приблизно 40 мг/кг, приблизно 45 мг/кг, приблизно 50 мг/кг, приблизно 60 мг/кг, приблизно 70 мг/кг, приблизно 80 мг/кг, приблизно 90 мг/кг, приблизно 100 мг/кг, приблизно 125 мг/кг, приблизно 150 мг/кг, приблизно 175 мг/кг, приблизно 200 мг/кг або більше. У інших варіантах реалізації дозування складає 1 мг - 500 мг. У деяких варіантах реалізації дозування складає 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140 або 150 мг. Дані дози можуть бути одиничними або розділеними та можуть вводитися один або більше разів на день. Наведені вище дозування є прикладами середнього випадку, але можуть бути індивідуальні випадки, у яких варто вводити більш високі або нижчі дозування, та вони входять у обсяг даного винаходу. На практиці лікар визначає терапевтично ефективні кількості та фактичну схему введення доз, яка найбільше підходить для окремого суб'єкта, які можуть змінюватися в залежності від віку, маси тіла та відповіді конкретного суб'єкта.

ІЗТ можна вводить один, два або три рази на добу впродовж від 1 дня до кінця життя, або впродовж від 1 дня до 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 або 10 або більше років, або доти, поки ІЗТ не викликає неприйнятні побічні дії або більше не буде приносити користь.

У пацієнта відстежують зміни у симптомах пов'язаного з віком запального захворювання. У одному варіанті реалізації спостерігається зменшення симптомів. У іншому варіанті реалізації симптоми залишаються приблизно такими ж, та немає ознак прогресування. По відношенню до хвороби Альцгеймера, такі симптоми включають втрату пам'яті, розміщення предметів не на тих місцях, забування назв місць чи об'єктів, повторення питань, меншу пристосованість до нових обставин, замішання, дезорієнтацію, obsесивну поведінку, компульсивну поведінку, марення, афазію, порушення сну, перепади настрою, депресію, тривогу, фрустрацію, збуджений стан, труднощі при виконанні просторових завдань, агнозію, труднощі при пересуванні, втрату маси, втрату здатності говорити, втрату короточасної пам'яті або втрату довготривалої пам'яті. Способи для контролювання та вимірювання будь-яких змін даних симптомів можна здійснити за допомогою стандартних способів або шляхом проведення звичайного експерименту.

У одному варіанті реалізації симптоми легкого когнітивного порушення та будь-яку зміну у симптомах хвороби Альцгеймера визначають, використовуючи критерії, запропоновані у DSM-5. У іншому варіанті реалізації симптоми легкого когнітивного порушення та будь-яку зміну у симптомах хвороби Альцгеймера визначають, використовуючи шкалу оцінки змін клініцистом на підставі опитування (CIBIC-plus). У іншому варіанті реалізації симптоми легкого когнітивного порушення та будь-яку зміну у симптомах визначають, використовуючи шкалу оцінки змін клініцистом на підставі опитування (CIBIC-plus).

Будь-яку зміну у симптомах можна відстежувати впродовж 1-36 місяців або більше, наприклад, впродовж 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 або 36 місяців.

У іншому варіанті реалізації у пацієнта відстежують зміну у патології, що лежить у основі хвороби Альцгеймера. У одному варіанті реалізації спостерігається ослаблення першопричинної патології. У іншому варіанті реалізації першопричинна патологія залишається приблизно на тому ж рівні та не спостерігаються ознаки прогресування.

У деяких варіантах реалізації будь-яку зміну у патології, що лежить у основі хвороби, виявляють шляхом детектування біомаркеру до та після введення ІЗТ. У одному варіанті реалізації біомаркер являє собою β-амілоїд або білок Тау. У іншому варіанті реалізації біомаркер детектують за допомогою ПЕТ-візуалізації. У іншому варіанті реалізації першопричинну патологію ідентифікують шляхом вимірювання об'єму головного мозку до та після введення ІЗТ.

У деяких варіантах реалізації першопричинна патологія обертається або затримується її прояв на 1-36 місяців, наприклад, на 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 або 36 місяців після першого введення ІЗТ.

У деяких варіантах реалізації пацієнту також вводять щонайменше один другий терапевтичний агент, корисний для лікування симптомів пов'язаного з віком запального розладу. У одному варіанті реалізації пацієнтові вводять щонайменше один другий терапевтичний агент, корисний для лікування хвороби Альцгеймера. У деяких варіантах реалізації щонайменше один другий терапевтичний агент являє собою донепезил, галантамін, ривастигмін або мемантін. У іншому варіанті реалізації щонайменше один другий терапевтичний агент являє собою антитіло, яке зв'язується з β -амілоїдом або білком Тау. У іншому варіанті реалізації зазначене антитіло зв'язується з β -амілоїдом та являє собою бапінейзумаб. У іншому варіанті реалізації зазначене антитіло зв'язується з білком Тау та являє собою ABBV-8E12. У іншому варіанті реалізації щонайменше один другий терапевтичний агент являє собою вакцину проти β -амілоїду або білку Тау. У іншому варіанті реалізації щонайменше один другий терапевтичний агент являє собою агент, який знижує або змінює вміст у головному мозку β -амілоїду або Тау. У іншому варіанті реалізації другий терапевтичний агент знижує або змінює вміст у головному мозку β -амілоїду та являє собою інгібітор β -секретази 1 (BACE). У іншому варіанті реалізації інгібітор BACE являє собою CTS-21166, верубецестат (МК 8931), ланабецестат (AZD3293) або LY2886721. У іншому варіанті реалізації другий агент знижує або змінює вміст у головному мозку β -амілоїду або змінює вміст у головному мозку Тау та являє собою нікотинамід, або MPT0G211.

Зазначений щонайменше один ІЗТ та щонайменше один другий терапевтичний агент можна вводити окремо або разом у складі єдиної фармацевтичної композиції.

Якщо пов'язаний з віком запальний розлад являє собою БАС, тоді пацієнту можна вводити щонайменше один другий агент, корисний для лікування симптомів БАС. У деяких варіантах реалізації щонайменше один другий агент являє собою інгібітор інтегрази. У деяких варіантах реалізації інгібітор інтегрази являє собою ралтегравір, куркумін, похідні куркумину, цикорієву кислоту, похідні цикорієвої кислоти, 3,5-дикофеїлхінову кислоту, похідні 3,5-дикофеїлхінової кислоти, ауринтрикарбонову кислоту, похідні ауринтрикарбонової кислоти, складний ефір кавової кислоти та феноїлового спирту, похідні складного ефіру кавової кислоти та феноїлового спирту, тирфостин, похідні тирфостину, кверцетин, похідні кверцетину, S-1360, зінтевір (AR-177), L-870812, та L-25 870810, МК-0518, BMS-538158 або GSK364735C. [52]

У пацієнта можна відстежувати поліпшення симптомів БАС. Такі симптоми включають один або більше з таких симптомів: труднощі при ходьбі або здійсненні нормальних щоденних активностей, спотикання та падіння, слабкість ніг, стоп або щиколоток, слабкість рук або незграбність, невиразну мову або утруднення при ковтанні, м'язові судоми, судомні рухи рук, плечей або язика, неадекватний напад плачу, когнітивні зміни та зміни поведінки.

Будь-яку зміну у симптомах можна відстежувати впродовж 1-36 місяців або більше, наприклад, впродовж 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 або 36 місяців. У деяких варіантах реалізації патологія, що лежить у основі, обертається або затримується її прояв на 1-36 місяців, наприклад, на 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 або 36 місяців після першого введення ІЗТ.

СОЛІ, ФАРМАЦЕВТИЧНІ КОМПОЗИЦІЇ ТА НАБОРИ

Способи у відповідності з даним винаходом можна здійснити шляхом введення щонайменше одного ІЗТ у вигляді чистої сполуки або у вигляді фармацевтичної композиції. Введення фармацевтичної композиції або чистої сполуки ІЗТ можна здійснити до або після встановлення клінічного діагнозу розладу, пов'язаного із запаленням, пов'язаним з віком. Звичайно фармацевтичні композиції стерильні та не містять токсичних, канцерогенних або мутагенних сполук, які будуть викликати небажану реакцію при введенні.

Додатково запропоновані набори, що містять щонайменше один ІЗТ та необов'язково щонайменше один другий терапевтичний агент, корисний для лікування або попередження розладу, пов'язаного із пов'язаним з віком запаленням, упаковані окремо або разом, та вкладиш з інструкціями щодо застосування даних активних агентів. У одному варіанті реалізації щонайменше один ІЗТ упакований окремо разом з інструкціями щодо введення разом з щонайменше одним другим терапевтичним агентом. Зазначені щонайменше один ІЗТ та щонайменше один другий терапевтичний агент можна вводити одночасно або послідовно, щоб досягти бажаного ефекту. Крім того, ІЗТ та щонайменше один другий терапевтичний агент можна вводити у одній композиції або у двох окремих композиціях.

Приклади щонайменше одного другого терапевтичного агента, корисного для лікування хвороби Альцгеймера, який може знаходитися у наборі, включають донепезил, галантамін, ривастигмін та мемантин. Інші необов'язкові терапевтичні агенти, які можуть знаходитися у наборі, включають антитіло, яке зв'язується з β -амілоїдом або білком Тау. У одному варіанті

реалізації зазначеним антитіло зв'язується з β -амілоїдом та являє собою бапінейзумаб. У іншому варіанті реалізації антитіло зв'язується з Тау та являє собою ABBV-8E12.

У іншому варіанті реалізації набір може містити щонайменше один другий терапевтичний агент, який являє собою вакцину проти β -амілоїду або білку Тау.

5 У іншому варіанті реалізації набір може містити щонайменше один другий терапевтичний агент, який знижує або змінює вміст у головному мозку β -амілоїду або білку Тау. У деяких варіантах реалізації другий терапевтичний агент, який змінює або знижує вміст у головному мозку β -амілоїду, являє собою інгібітор β -секретази 1 (BACE). У певному варіанті реалізації інгібітор BACE являє собою CTS 21166, верубеєстат (МК-8931), ланабеєстат (AZD3293) або
10 LY2886721, кожен з яких брав участь у клінічних випробуваннях для лікування хвороби Альцгеймера.

У іншому варіанті реалізації набір може містити другий агент, який знижує або змінює вміст у головному мозку Тау та являє собою нікотинамід, або MPT0G211.

15 У деяких варіантах реалізації пацієнт страждає на БАС та набір додатково містить щонайменше один другий агент, корисний для лікування БАС. У інших варіантах реалізації ІЗТ упакований окремо разом з інструкціями щодо введення щонайменше одного другого терапевтичного агенту для лікування БАС. У деяких варіантах реалізації щонайменше один другий терапевтичний агент для лікування БАС являє собою едаравон або рилузол.

20 У деяких варіантах реалізації щонайменше один другий агент являє собою інгібітор інтегрази. У деяких варіантах реалізації інгібітор інтегрази являє собою ралтегравір, куркумін, похідні куркуміну, цикорієву кислоту, похідні цикорієвої кислоти, 3,5-дикофеїлхінову кислоту, похідні 3,5-дикофеїлхінової кислоти, ауринтрикарбонову кислоту, похідні ауринтрикарбонової кислоти, складний ефір кавової кислоти та феноїлового спирту, похідні складного ефіру кавової кислоти та феноїлового спирту, тирфостин, похідні тирфостину, кверцетин, похідні
25 кверцетину, S-1360, зинтевір (AR-177), L-870812, та L-25 870810, МК-0518, BMS-538158 або GSK364735C. [53]

Другий терапевтичний агент вводять у кількості, достатній для надання їм бажаної терапевтичної дії. Діапазон ефективних доз для кожного необов'язкового терапевтичного агенту відомий у даній галузі, та необов'язковий терапевтичний агент вводять індивіду, який цього
30 потребує, у межах таких встановлених діапазонів.

У обсяг даного винаходу входить отримання та застосування солей ІЗТ. У цій заявці "фармацевтично прийнятна сіль" відноситься до солей або цвіттер-іонних форм ІЗТ. Солі ІЗТ можна отримати на останніх етапах виділення та очищення сполук або окремо шляхом приведення у взаємодію сполуки з відповідною кислотою. Фармацевтично прийнятні солі ІЗТ
35 можуть являти собою солі приєднання кислоти, утворені з фармацевтично прийнятними кислотами. Приклади кислот, які можна застосовувати для отримання фармацевтично прийнятних солей, включають неорганічні кислоти, такі як азотна, борна, соляна, бромистоводнева, сірчана та фосфорна кислоти, та органічні кислоти, такі як щавлева, малеїнова, бурштинова та лимонна кислоти. Лише деякі з прикладів солей ІЗТ включаються, але не обмежені перерахованими солями: гідрохлорид, гідробромід, гідройодид, сульфат, бісульфат, 2-гідроксиетансульфонат, фосфат, вторинний кислий фосфат, ацетат, адипат, альгінат, аспартат, бензоат, бісульфат, бутират, камфорат, камфорсульфонат, диглюконат, гліцеринфосфат, гемісульфат, гептаноат, гексаноат, формат, сукцинат, фумарат, малеат, аскорбат, ізетіонат, саліцилат, метансульфонат, мезитиленсульфонат, нафтиленсульфонат, нікотинат, 2-нафталінсульфонат, оксалат, памоат, пектинат, персульфат, 3-фенілпропіонат, пікрат, півалат, пропіонат, трихлорацетат, трифторацетат, фосфат, глутамат, бікарбонат, пара-толуолсульфонат, ундеканат, лактат, цитрат, тартрат, глюконат, метансульфонат, етандисульфат, бензолсульфонат та пара-толуолсульфонат. Крім того, доступні аміногрупи, присутні у ІЗТ, можуть бути кватернізовані метил-, етил-, пропіл- та бутилхлоридами, бромідами
40 та йодидами; диметил-, діетил-, дибутил- та діамілсульфатами; децил, лаурил, міристил та стерилхлоридами, бромідами та йодидами; та бензил- та феноїлбромідами. У світлі описаного вище, мається на увазі, що будь-яка згадка про ІЗТ, що зустрічається у даній заявці, включає ІЗТ, а також його фармацевтично прийнятні солі, гідрати або сольвати.

55 У обсяг даного винаходу входить отримання та застосування сольватів ІЗТ. Сольвати зазвичай істотно не змінюють фізіологічну активність або токсичність сполук та, відповідно, можуть діяти як фармакологічні еквіваленти. Термін "сольват" у даній заявці являє собою комбінацію, фізичну взаємодію та/або сольватацію сполуки відповідно до даного винаходу молекулою розчиннику, такою як, наприклад, дисольват, моносольват або гемісольват, де співвідношення молекули розчиннику до сполуки відповідно до даного винаходу становить
60 приблизно 2: 1, приблизно 1: 1 або приблизно 1: 2, відповідно. Така фізична взаємодія включає

різні ступені іонних та ковалентних зв'язків, включаючи водневий зв'язок. У деяких випадках сольват можна виділити, наприклад, коли одна або більше молекул розчиннику включені у кристалічну ґратку кристалічної твердої речовини. Таким чином, у обсяг терміну "сольват" входять як сольвати у рідкій фазі, так і сольвати, що піддаються виділенню. ІЗТ може бути присутнім у вигляді сольватованих форм з фармацевтично прийнятним розчинником, таким як вода, метанол та етанол, та передбачається, що у обсяг даного винаходу входять як сольватована, так і несольватована форми ІЗТ. Один тип сольвату являє собою гідрат. "Гідрат" відноситься до конкретної підгрупи сольватів, у якій молекула розчиннику являє собою воду. Сольвати зазвичай можуть функціонувати як фармакологічні еквіваленти. Отримання сольватів відомо у даній галузі. Див., наприклад, Саїга та інш. (2004), [54] у якій описане одержання сольватів флуконазолу з етилацетатом та водою. Аналогічне одержання сольватів, гемісольватів, гідратів та тому подібних описані у Van Tonder та інш. (2004) [55] та Bingham та інш. (2001). [56] Звичайний необмежувачий процес отримання сольвату включатиме розчинення щонайменше одного ІЗТ або щонайменше одного другого терапевтичного агенту у бажаному розчиннику (органічному, воді або їх суміші) при температурах вище 20 °C до приблизно 25 °C, потім охолодження розчину при швидкості, достатній для утворення кристалів, та виділення кристалів за допомогою відомих способів, наприклад, фільтрації. Аналітичні методики, такі як інфрачервона спектроскопія, можна застосовувати для підтвердження присутності сольвату у кристалі сольвату.

Щонайменше один ІЗТ та щонайменше один другий терапевтичний агент звичайно вводять у суміші з фармацевтичним носієм з одержанням фармацевтичної композиції, вибраної з урахуванням передбачуваного шляху введення та стандартної фармацевтичної практики. Фармацевтичні композиції для застосування у відповідності з даним винаходом складають звичайним способом, застосовуючи один або більше фізіологічно прийнятних носіїв, що містять допоміжні речовини та/або добавки, які полегшують обробку щонайменше одного ІЗТ та щонайменше одного другого терапевтичного агенту.

Дані фармацевтичні композиції можна виробляти, наприклад, за допомогою звичайних процесів змішування, розчинення, гранулювання, дражування, емульгування, інкапсулювання, укладення у оболонку або ліофілізації. Відповідний склад залежить від обраного шляху введення. Коли терапевтично ефективну кількість щонайменше одного ІЗТ та/або щонайменше одного другого терапевтичного агенту вводять перорально, композиція зазвичай знаходиться у формі таблетки, капсули, порошку, розчину або еліксиру. При введенні у формі таблетки композиція може додатково містити твердий носій, такий як желатин або ад'ювант. Пігулка, капсула та порошок містять від приблизно 0,01 % до приблизно 95 % та переважно від приблизно 1 % до приблизно 50 % щонайменше одного ІЗТ та щонайменше одного другого терапевтичного агенту. При введенні у рідкій формі можна додати рідкий носій, такий як вода, нафтопродукт або масла тваринного або рослинного походження. Рідка форма композиції може додатково містити фізіологічний сольовий розчин, розчини глюкози або інших сахаридів, або гліколі. При введенні у рідкій формі композиція містить від приблизно 0,1 % до приблизно 90 %, та переважно від приблизно 1 % до приблизно 50 %, за масою, щонайменше одного ІЗТ та щонайменше одного другого терапевтичного агенту.

Коли терапевтично ефективну кількість щонайменше одного ІЗТ та щонайменше одного другого терапевтичного агенту вводять шляхом внутрішньовенної, шкірної або підшкірної ін'єкції, зазначена композиція знаходиться у формі апірогенного прийнятного для парентерального введення водного розчину. Отримання таких прийнятних для парентерального введення розчинів з відповідним урахуванням рН, ізотонічності, стабільності та тому подібного, знаходиться у межах компетенції у даній галузі. Бажана композиція для внутрішньовенної, шкірної або підшкірної ін'єкції зазвичай містить ізотонічне середовище.

Щонайменше один ІЗТ та щонайменше один другий терапевтичний агент можна легко об'єднати з фармацевтично прийнятними носіями, добре відомими у даній галузі. Стандартні фармацевтичні носії описані у Remington's Pharmaceutical Sciences. [57] Такі носії дозволяють включати активні агенти у форму таблеток, пігулок, драже, капсул, рідин, гелів, сиропів, суспензій, суспензій та тому подібні форми для перорального прийому всередину суб'єктом, якого лікують. Фармацевтичні композиції для перорального застосування можна отримати шляхом додавання щонайменше одного ІЗТ та/або щонайменше одного другого терапевтичного агенту до твердої допоміжної речовини, необов'язково перемелювання отриманої у результаті цього суміші та обробку суміші гранул, після додавання відповідних добавок, за необхідності, з отриманням таблеток або серцевин драже. Підходящі допоміжні речовини включають, наприклад, наповнювачі та препарати целюлози. За необхідності можна додати дезінтегруючі агенти.

Щонайменше один ІЗТ та щонайменше один другий терапевтичний агент можна включити до складу для парентерального введення шляхом ін'єкції, наприклад, у формі болюсної ін'єкції або безперервної інфузії. Склади для ін'єкції можуть бути представлені у одиничній лікарській формі, наприклад, у ампулах або у багатодозових контейнерах з доданим консервантом.

Композиціям можна надавати такі форми як суспензії, розчини або емульсії у маслянистих або водних середовищах, та вони можуть містити такі агенти для отримання лікарської форми, як суспендуєчі, стабілізуючі та/або диспергуючі агенти.

Фармацевтичні композиції для парентерального введення містять водні розчини активного агенту у водорозчинній формі. Крім того, суспензії щонайменше одного ІЗТ та щонайменше одного другого терапевтичного агенту можна отримати у вигляді відповідних маслянистих суспензій для ін'єкції. Підходящі ліпофільні розчинники або середовища включають жирні масла або синтетичні ефіри жирних кислот. Водні суспензії для ін'єкції можуть містити речовини, які підвищують в'язкість суспензії. Необов'язково суспензія також може містити відповідні стабілізатори або агенти, які підвищують розчинність сполук та дозволяють отримання високо концентрованих розчинів. У якості альтернативи, композиція у відповідності з даним винаходом може бути у формі порошку для розведення у підходящому середовищі, наприклад, стерильній апірогенній воді, перед застосуванням.

Щонайменше один ІЗТ та щонайменше один другий терапевтичний агент також можна включити до складу ректальних композицій, таких як супозиторії або мікроклізми з утриманням, наприклад, що містять звичайні основи для супозиторіїв. Додатково до складів, описаних раніше, щонайменше один ІЗТ та щонайменше один другий терапевтичний агент також можна включити до складу у вигляді депо-препарату. Такі склади тривалої дії можна вводити шляхом імплантації (наприклад, підшкірної або внутрішньом'язової) або шляхом внутрішньом'язової ін'єкції. Таким чином, наприклад, щонайменше один ІЗТ та щонайменше один другий терапевтичний агент можна включити до складу з відповідними полімерними або гідрофобними матеріалами (наприклад, у вигляді емульсії у підходящому маслі) або іонообмінними смолами.

Зокрема, щонайменше один ІЗТ та щонайменше один другий терапевтичний агент можна вводити перорально, букально або сублінгвально у формі таблеток, що містять допоміжні речовини, такі як крохмаль або лактоза, або у капсулах або капсулах яйцевидної форми, або окремо, або у суміші з допоміжними речовинами, або у формі еліксирів або суспензій, що містять ароматизатори або фарбувальні агенти. Такі рідкі препарати можна отримати з фармацевтично прийнятними допоміжними речовинами, такими як суспендуєчі агенти. Щонайменше один ІЗТ та щонайменше один другий терапевтичний агент також можна вводити шляхом парентеральної ін'єкції, наприклад, внутрішньовенно, внутрішньом'язово, підшкірно або внутрішньокоронарно. Для парентерального введення щонайменше один ІЗТ та щонайменше один другий терапевтичний агент зазвичай застосовують у формі стерильного водного розчину, який може містити інші речовини, наприклад, солі або моносахариди, такі як маніт або глюкоза, щоб зробити розчин ізотонічним крові.

Деякі варіанти реалізації технології, описаної у даній заявці, можна визначити відповідно до будь-якого з наступних пронумерованих абзаців:

Спосіб лікування, попередження та/або обернення пов'язаного з віком запалення у пацієнта, який цього потребує, що включає введення терапевтично ефективної кількості інгібітору зворотної транскриптази (ІЗТ) пацієнту, який цього потребує, який відрізняється тим, що ІЗТ включає ценсавудин або ельвучитабін.

Спосіб відповідно до абзацу 1, який відрізняється тим, що пов'язане з віком запалення присутнє у пацієнта, у якого є хвороба Альцгеймера, бічний аміотрофічний склероз (БАС), хвороба Паркінсона, хвороба Гентінгтона, втрата зору, втрата слуху, дегенеративні захворювання периферичної нервової системи, або дисфункція серцево-судинної системи, лобно-скронева деменція (ЛСД), розсіяний склероз (РС), синдром Айкарді-Гут'єрес, прогресуючий над'ядерний параліч (ПНП), остеоартрит, старіння шкіри, атеросклероз, викликані хіміотерапією небажані явища, розлад функціонування гематопоетичних стовбурових клітин, остеопороз, розлад фізичного функціонування та/або фіброз легень, - або у пацієнта, який потребує загоєння ран або регенерації тканин.

Спосіб відповідно до абзацу 1, який відрізняється тим, що пов'язане з віком запалення присутнє у пацієнта, у якого є хвороба Альцгеймера.

Спосіб відповідно до абзацу 1, який відрізняється тим, що пов'язане з віком запалення присутнє у пацієнта, у якого є БАС.

Спосіб затримки прояву або обернення прогресування патології, що лежить у основі розладу, викликаного пов'язаним з віком запаленням, що включає введення пацієнту, який цього потребує, терапевтично ефективної кількості інгібітору зворотної транскриптази (ІЗТ),

причому зазначений ІЗТ включає ценсавудин або ельвучитабін.

Спосіб відповідно до абзацу 5, який відрізняється тим, що пацієнт страждає на хворобу Альцгеймера або БАС та відчуває ослаблення одного або більше симптомів хвороби Альцгеймера або БАС у порівнянні з такими перед першим введенням пацієнту.

5 Спосіб відповідно до абзацу 6, який відрізняється тим, що пацієнт страждає на хворобу Альцгеймера, та один або більше симптомів включають втрату пам'яті, розміщення предметів не на тих місцях, забування назв місць або об'єктів, повторення питань, меншу пристосованість до нових обставин, замішання, дезорієнтацію, obsесивну поведінку, компульсивну поведінку, марення, афазію, порушення сну, перепади настрою, депресію, тривогу, фрустрацію, збуджений стан, труднощі при виконанні просторових задач, агнозію, труднощі при пересуванні, втрату маси, втрату здатності говорити, втрату короточасної пам'яті або втрату довготривалої пам'яті.

Спосіб відповідно до абзацу 6, який відрізняється тим, що пацієнт страждає на хворобу Альцгеймера, та зменшення одного або більше симптомів оцінюють у відповідності з DSM-5.

15 Спосіб відповідно до абзацу 6, який відрізняється тим, що пацієнт страждає на хворобу Альцгеймера, та зменшення симптомів визначають, використовуючи когнітивну субшкалу шкали оцінки важкості хвороби Альцгеймера (ADAS-cog).

Спосіб відповідно до абзацу 6, який відрізняється тим, що пацієнт страждає на хворобу Альцгеймера, та зменшення симптомів визначають, використовуючи шкалу оцінки змін клініцистом на підставі опитування (CIBIC-plus).

20 Спосіб відповідно до абзацу 6, який відрізняється тим, що пацієнт страждає на хворобу Альцгеймера, та зменшення симптомів визначають, використовуючи шкалу оцінки повсякденної діяльності (ADL).

Спосіб відповідно до будь-якого одного з абзаців 6-11, який відрізняється тим, що зменшення симптомів відбувається впродовж 1-36 місяців.

25 Спосіб відповідно до будь-якого одного з абзаців 6-11, який відрізняється тим, що будь-яку зміну у першопричинній патології виявляють шляхом детектування біомаркеру до та після введення ІЗТ.

Спосіб відповідно до абзацу 13, який відрізняється тим, що біомаркер являє собою β-амілоїд або білок Тау.

30 Спосіб відповідно до абзаців 13 або 14, який відрізняється тим, що біомаркер детектують за допомогою ПЕТ-візуалізації.

Спосіб відповідно до абзаців 13 або 14, який відрізняється тим, що біомаркер детектують шляхом вимірювання у спинномозковій рідині.

35 Спосіб відповідно до будь-якого одного з абзаців 6-11, який відрізняється тим, що першопричинну патологію ідентифікують шляхом вимірювання об'єму головного мозку до та після введення ІЗТ.

Спосіб відповідно до будь-якого одного з абзаців 6-17, який відрізняється тим, що першопричинну патологію обертають або відтермінують на 1-36 місяців.

40 Спосіб попередження початку хвороби Альцгеймера у пацієнта, у якого підозрюють наявність легкого когнітивного розладу, що включає введення пацієнту, який цього потребує, терапевтично ефективної кількості інгібітору зворотної транскриптази (ІЗТ), причому зазначений ІЗТ включає ценсавудин або ельвучитабін.

45 Спосіб відповідно до будь-якого одного з абзаців 1-19, який відрізняється тим, що пацієнт страждає на хворобу Альцгеймера або легкий когнітивний розлад, та додатково включає введення щонайменше одного другого терапевтичного агенту, корисного для лікування симптомів хвороби Альцгеймера.

Спосіб відповідно до абзацу 20, який відрізняється тим, що щонайменше один другий терапевтичний агент являє собою донепезил, галантамін, ривастигмін або мемантин.

50 Спосіб відповідно до абзацу 20, який відрізняється тим, що щонайменше один другий терапевтичний агент являє собою антитіло, яке зв'язується з β-амілоїдом або білком Тау.

Спосіб відповідно до абзацу 22, який відрізняється тим, що антитіло зв'язується з β-амілоїдом та являє собою бапінейзумаб.

Спосіб відповідно до абзацу 22, який відрізняється тим, що антитіло зв'язується з білком Тау та являє собою ABBV-8E12.

55 Спосіб відповідно до абзацу 20, який відрізняється тим, що щонайменше один другий терапевтичний агент являє собою вакцину проти β-амілоїду або білку Тау.

Спосіб відповідно до абзацу 20, який відрізняється тим, що щонайменше один другий терапевтичний агент являє собою агент, який знижує або змінює вміст у головному мозку β-амілоїду або Тау.

60 Спосіб відповідно до абзацу 26, який відрізняється тим, що другий терапевтичний агент

знижує або змінює вміст у головному мозку β -амілоїду та являє собою інгібітор β -секретази 1 (BACE).

Спосіб відповідно до абзацу 27, який відрізняється тим, що інгібітор BACE являє собою CTS-21166, верубецестат (МК-8931), ланабецестат (AZD3293) або LY2886721.

5 Спосіб відповідно до абзацу 26, який відрізняється тим, що другий агент знижує або змінює вміст у головному мозку Тау та являє собою нікотинамід, або MPT0G211.

Спосіб відповідно до будь-якого одного з абзаців 1, 2 або 4, який відрізняється тим, що пацієнт страждає на БАС, та який додатково включає введення щонайменше одного другого агенту, корисного для лікування БАС.

10 Спосіб відповідно до абзацу 30, який відрізняється тим, що лікарський засіб, корисний для лікування БАС, являє собою едаравон або рилузол.

Спосіб відповідно до абзацу 30, який відрізняється тим, що щонайменше один другий агент являє собою інгібітор інтегрази.

15 Спосіб відповідно до абзацу 32, який відрізняється тим, що інгібітор інтегрази являє собою ралтегравір, куркумін, похідні куркумину, цикорієву кислоту, похідні цикорієвої кислоти, 3,5-дикофеїлхінову кислоту, похідні 3,5-дикофеїлхінової кислоти, ауринтрикарбонову кислоту, похідні ауринтрикарбонової кислоти, складний ефір кавової кислоти та фенетилового спирту, похідні складного ефіру кавової кислоти та фенетилового спирту, тирфостин, похідні тирфостину, кверцетин, похідні кверцетину, S-1360, зинтевір (AR-177), L-870812, та L-25 870810, МК-0518, BMS-538158 або GSK364735C.

Спосіб відповідно до будь-якого одного з абзаців 1-33, який відрізняється тим, що оцінюють наявність у пацієнта одного або більше симптомів або патології захворювання через 1-36 місяців після першого введення ІЗТ пацієнту.

25 Спосіб відповідно до будь-якого одного з абзаців 1-34, який відрізняється тим, що ІЗТ інгібує активність зворотної транскриптази L1 у клітині пацієнта.

Спосіб відповідно до будь-якого одного з абзаців 1-35, який відрізняється тим, що ІЗТ являє собою ельвудитабін.

Спосіб відповідно до будь-якого одного з абзаців 1-35, який відрізняється тим, що ІЗТ являє собою ценсавудин.

30 Спосіб відповідно до будь-якого одного з абзаців 1-35, який додатково включає введення щонайменше одного другого терапевтичного агенту пацієнту.

Спосіб відповідно до абзацу 38, який відрізняється тим, що пацієнт страждає на хворобу Альцгеймера, та щонайменше один другий терапевтичний агент корисний для лікування симптомів хвороби Альцгеймера.

35 Спосіб відповідно до абзацу 38, який відрізняється тим, що пацієнт страждає на бічний аміотрофічний склероз (БАС), та щонайменше один другий терапевтичний агент корисний для лікування БАС.

Приклади

40 Даний винахід тепер описано у загальних рисах, його буде легше зрозуміти, посилаючись на наступні приклади, які включені у дану заявку виключно з метою ілюстрування деяких аспектів та варіантів реалізації винаходу та не призначені для обмеження цього винаходу.

МЕТОДИ

Культивування клітин

45 У даному дослідженні використовували декілька різних штамів нормальних фібробластів людини. Клітини LF1 отримували з ембріональної тканини легені, як було описано. [58] Дані клітини безперервно використовувались у нашій лабораторії з моменту їх виділення у 1996 році. Для даного дослідження вилучали та використовували вихідні зразки, які були заморожені у 1996 році та безперервно зберігалися у нашій лабораторії. Клітини IMR-90 та WI-38 отримали з АТСС. Жодна з даних ліній клітин не перерахована у базі даних Міжнародного комітету з аутентифікації клітинних ліній (ICLAC). Дані лінії нормальних фібробластів культивували, використовуючи фізіологічні умови вмісту кисню (92,5 % N_2 , 5 % CO_2 , 2,5 % O_2), у поживній суміші Хема F-10 (Thermo Scientific) з 15 % фетальною бичачою сироваткою (ФБС, Hyclone). Середовище додатково доповнювали L-глутаміном (2 мМ), пеніциліном та стрептоміцином. [59]

50 Культури клітин періодично досліджували на наявність зараження мікоплазмою за допомогою набору для детектування мікоплазми MycoAlert® (Lonza).

55

Для отримання реплікативно старих (РЕС) клітин, культури LF1 серійно розмножували до припинення проліферації. При кожному пасажі після досягнення 80 % конфлюентності клітини трипсинізували та розбавляли 1:4. Отже, кожен пасаж еквівалентний приблизно двом подвоєнням популяції. У культурах ранніх пасажів час між пасажами був постійним та становив

60 приблизно 3 дні. У міру наближення культурами до старіння час між пасажами поступово

збільшувалася. Інтервал у 2-3 тижні свідчив про те, що культура перебувала на передостанньому пасажі. У цей момент після досягнення 80 % конфлюентності клітини пересівали при розведенні 1:2 та даний момент часу позначали як останній пасаж (точка А на Фіг. 2а). Деякий ріст клітин зазвичай ще відбувається у наступні 2-3 тижні, але культури не досягають 80 %. У даній схемі експерименту більшість клітин у культурі входять у стан старіння впродовж 3-4-тижневого вікна, середина якого знаходиться грубо близько моменту останнього пасажу (сірий стовпчик на Фіг. 2а). У точці В (4 тижні) культури трипсинізували та пересівали, як описано, [60] щоб видалити невелику фракцію збережених клітин з контактним інгібуванням. Культури знову пересівали у точці С (8 тижнів).

Викликаного онкогеном старіння клітин (BOC) досягали шляхом інфікування проліферуючих клітин LF1 плазмідом рLenti CMV RasV12 Neo (Addgene, плазмід № 22259). Освіта лентівірусних частинок та процедура інфікування описані нижче. Після закінчення інфікування клітини пересівали при 15-20 % конфлюентності та проводили селекцію за допомогою G418 при концентрації 250 мкг/мл, яку постійно підтримували до завершення експерименту. Середовище міняли кожні 3 дні до збору культур у зазначені моменти часу. Викликаного стресом передчасного старіння клітин (BCPC) досягали шляхом опромінення рентгенівськими променями у дозі 20 Гр при швидкості 87 сГр/хвил. у одній фракції, застосовуючи джерело гамма-випромінювання цезій-137 (Nordion Gammacell 40). Клітини були конфлюентні на 15-20 % на момент опромінення. Середовище замінювали негайно після опромінення та з інтервалами у 3 дні після цього. Клітини 293T (Clontech) використовували для упаковки лентівірусних векторів та культивували їх при 37 °C у DMEM з 10 % ФБС в умовах нормального вмісту кисню (повітря, доповнене 5 % CO₂).

Інгібітори зворотної транскриптази (ІЗТ)

Усі ІЗТ (ламівудин, ЗТС; зидовудин, AZT; абакавір, ABC; емтрицитабін, FTC), використовувані у даному дослідженні, були фармацевтичної чистоти (USP) та були отримані від Aurubindo Pharma, Хайдарабад, Індія. Для одержання тризівіру (TZV) його компоненти (ABC, AZT та ЗТС) об'єднували у підходящих кількостях.

Умови утримання мишей

Мишей C57BL/6J обох статей отримували з колоній старих гризунів з Національного інституту з проблем старіння (NIA) [61] у віці 5 та 18 місяців. Тварин у віці 5 місяців умертвляли після короткочасного (впродовж 1 тижня) періоду акліматизації, різні тканини збирали, швидко заморожували у LN2 та зберігали при -80 °C. Тварин у віці 18 місяців поміщали до досягнення ними бажаного віку. Мишей поселяли у спеціальний вільний від патогенів сертифікований Міжнародною асоціацією з атестації та акредитації утримання лабораторних тварин (AAALAC) віварій бар'єрного типу. Клітки, устілку (устілка з деревини листяних порід Sani-chip) та корм (Purina Lab Chow 5010) стерилізували шляхом автоклавування. Корм та воду (також стерилізували) надавали без обмежень. Використовували цикл світла/темноти по 12 годин (у 7 ранку світло вмикали, у 7 вечора вимикали). Підтримували температуру 70 °F та вологість 50 %. Всіх тварин оглядали щоденно та зважували раз на тиждень. У пробному експерименті три групи по 10 тварин у кожній лікували ЗТС, розчиненим у питній воді (1,5 мг/мл, 2,0 мг/мл, 2,5 мг/мл) безперервно починаючи з 18 місяців і до умертвіння у 24 місяці. Четвертій (контрольній) групі давали ту ж воду без лікарського засобу. Не спостерігали значної відмінності у поведінці, масі тіла або виживаності між 4 групами впродовж всього експерименту. Один раз під час експерименту (у віці 20 місяців) у тварин одноразово брали приблизно 70 мкл крові з хвостової вени. Зібрану плазму пересивали у Центр клінічної фармакології та аналітичної хімії CFAR університету Північної Кароліни для аналізу ЗТС. Для групи 2 мг/мл концентрація ЗТС у плазмі в середньому складала 7,2 мкМ. Дану дозу лікарського засобу вибрали для подальших експериментів, щоб імітувати терапевтичну дозу проти ВІЛ у людини (300 мг на добу, 5-8 мкМ у плазмі). [62] Для експериментів, представлених у даному повідомленні, тварини старіли всередині лабораторії до досягнення ними віку 26 місяців. Потім їх довільно розподіляв на дві групи технічний спеціаліст, який не був засліплений у відношенні зовнішнього вигляду або інших особливостей тварин. Одну групу лікували впродовж 2 тижнів 2 мг/мл ЗТС у питній воді, а іншій (контрольній) групі давали ту ж воду без лікарського засобу, яку вводили тим же способом. Після закінчення періоду лікування всіх тварин умертвляли та збирали з них тканини, як описано вище. Усіх тварин з обох груп включили у всі наступні експерименти. Експеримент проводили у окремих випадках на самцях та самках тварин. Проводили нелетальне опромінення всього організму (6 Гр), як описано, [63] та зразки тканин тримали на сухому льоді.

ПЛР

Для всіх експериментів використовували пристрій ABI ViiA 7 (Applied Biosystems). Кількісну ПЛР ДНК проводили, застосовуючи систему TaqMan (Applied Biosystems), як описано у Coufal та

інш. (2009). [64] 100 пг очищеної геномної ДНК використовували із зазначеними праймерами (див. таблицю 1). Кількісну ПЛР із зворотною транскрипцією (ЗТ-кПЛР) РНК проводили, застосовуючи систему SYBR Green (Applied Biosystems). Поліаденільовану РНК використовували у всіх експериментах, у яких оцінювали транскрипцію елементів L1, та загальну РНК використовували для всіх інших генів. Загальну РНК отримували, застосовуючи реагент Тризол (Invitrogen). Полі(А)-РНК виділяли із загальної РНК, застосовуючи модуль для виділення полі(А)-мРНК за допомогою магнітних гранул NEBNext (New England Biolabs). Проводили зворотну транскрипцію 1 мкг загальної РНК або 10 нг полі(А)-РНК з одержанням кДНК у 50 мкл реакційної суміші, застосовуючи набір TaqMan (Applied Biosystems). Для того щоб оцінити ланцюг-специфічну транскрипцію, випадкові праймери у реакції ЗТ заміняли на ланцюг-специфічний праймер до цільової РНК. 1 мкл кожної реакційної суміші ЗТ використовували у наступних реакціях кількісної ПЛР. GAPDH використовували у якості контролю для нормування у експериментах з клітинами людини. Середнє арифметичне значення для *Gardh* та двох додаткових контролів (*Hsp90* та *GusB*) використовували для нормування експериментів ЗТ-кПЛР з тканинами мишей, за виключенням печінки, яку нормували на *Hsp90* та *GusB*. Для вимірювання транскрипції L1 зразки полі(А)-РНК ретельно розщеплювали вільною від РНКаз ДНКазою (Qiagen) перед синтезом кДНК6. Ефективність розщеплення ДНКазою оцінювали із застосуванням контролів без використання ферменту ЗТ.

Розробка праймерів для ПЛР

Набори праймерів з 1 по 5 (таблиця 1, амплікони А-Е на фіг. 1b) до L1 людини були розроблені таким чином, щоб переважно ампліфікувати елементи підсемеїств специфічного для людини L1HS та еволюційно недавнього специфічного для приматів L1PA(2-6), як описано далі. По-перше, отримували консенсусні послідовності елементів L1HS та L1PA2-L1PA6 з Repbase (Дослідницький інститут генетичної інформації (Genetic Information Research Institute [65])). По-друге, отримували консенсусну послідовність даних шести послідовностей за допомогою інструменту для множинного вирівнювання послідовностей Clustal Omega. [66,67] Потім здійснювали розробку праймерів на загальному консенсусі за допомогою Primer3 та BLAST, застосовуючи інструмент Primer-BLAST NCBI. [68,69] Пари праймерів до L1 оцінювали проти їх мішеней, застосовуючи інструмент In-Silico PCR, [70] на останній зборці геному (hg38) з мінімальним ідеальним співпадінням на 3'-кінці кожного праймеру, рівним 15. Праймери до BP32 (набір праймерів 6, амплікон F на фіг. 1b) були розроблені Soufal та інш. (2009), щоб вони переважно націлювалися на L1HS. Праймери для оцінки транскрипції активних елементів L1 миші (набір праймерів 37, таблиця 1) розробляли на об'єднаній консенсусній послідовності сімейств L1MdA та L1Tf, отриманій з Repbase, та перевіряли, як описано вище. Пари праймерів до L1, що перекривають усю довжину даних елементів (набори праймерів 48-50), були розроблені із застосуванням тієї ж стратегії. Пари праймерів, специфічні до трьох активних поліморфізмів у області 5'-НТО. Аналіз за допомогою ЗТ-кПЛР транскрипції L1 проводили на очищеній полі(А)-РНК, застосовуючи спосіб SYBR Green. Для всіх інших (не L1) генів, кожен раз, коли це було можливо, праймери були відділені щонайменше одним інтроном у послідовності геномної ДНК (як зазначено у таблиці 1). Праймери до сімейств IFN-альфа людини були розроблені проти консенсусної послідовності для всіх послідовностей генів IFN-альфа людини (IFNA1, IFNA2, IFNA4, IFNA5, IFNA6, IFNA7, IFNA8, IFNA10, IFNA13, IFNA14, IFNA16, IFNA17, IFNA21), згенерованої за допомогою інструменту для множинного вирівнювання послідовностей Clustal Omega. Усі праймери проти мишачих мішеней були розроблені, як описано вище, та представлені у таблиці 1. Послідовності праймерів, які відповідають консенсусу для всіх генів сімейства IFN-альфа миші, а також гену IFNB1, були отримані з публікації Gautier та інш. [71] Для вимірювання відносного числа копій L1 у геномі (клітини людини) використовували мультиплексний спосіб TaqMan, розроблений Soufal та інш. (2009) [72]. Дані праймери перераховані як набір №6 та набір №7 (з відповідними зондами VIC та 6FAM) у таблиці 1.

Імунопреципітація хроматину

Усі експерименти ChIP проводили, застосовуючи набір для ChIP з центрифужною колонкою Chromatrap (Porvair). Коротко, 2×10^6 клітин перехресно зв'язували у культуральних чашках за допомогою 1 % формальдегіду (10 хвил., кімнатна температура), реакцію гасили гліцином, промивали двічі льодяним ФБР (що містить інгібітор протеаз) та, нарешті, зшкрябували у мікроцентрифужну пробірку. Осади клітин ресуспендували у 0,4 мл гіпотонічного буферу та інкубували впродовж 10 хвил. на льоду. Ядра осаджували центрифугуванням, ресуспендували у 0,3 мл лізуючого буферу та руйнували ультразвуком, застосовуючи пристрій Bioruptor UCD-200 (Diagenode) із встановленим імпульсом "високий" (30 сек, а потім 30 сек спокою) впродовж сумарного часу 10 хвил. Екстракти центрифугували у мікроцентрифузі (максимальна швидкість,

5 хвил., 4 °C), щоб видалити уламки клітин, супернатанти переносили у нові пробірки та зберігали при -80 °C. Кількість екстракту, що містить 2 мкг ДНК, змішували з 4 мкг антитіла та завантажували на твердофазну матрицю з білком A Chromatrap. Імунокомплексам дозволяли сформуватися впродовж ночі при 4 °C при легкому струшуванні, після чого зразки промивали та елюювали, слідуючи протоколу виробника. IgG кролика та 1 % вхідної ДНК використовували у якості контролів. 1 мкл імунопреципітованої ДНК використовували у кожній реакції кількісної ПЛР.

Осадження BrdU

Для отримання клітин у спокої проліферуючі клітини ростили до 50 % конфлюентності, замість додавання сироватки у середовище використовували 0,1 % ФБС та інкубацію продовжували до моменту збору. Клітини у спокої та старі клітини безперервно мітили впродовж двох тижнів бромдезоксидуридином (BrdU labeling reagent, Thermo Fisher), слідуючи протоколу виробника для мічення культивованих клітин. Клітини збирали та підраховували: обробляли по 5×10^5 клітин на умову. Геномну ДНК очищали шляхом екстракції фенолом-хлороформом, обробляли РНКазою А, а потім розщепляли, застосовуючи пристрій Bioruptor UCD-200 (встановлений імпульс "низький", 30 сек. включений та 30 сек. вимкнений, всього 10 хвил.). Пробірки з ДНК інкубували у термоблоці (100 °C) впродовж рівно однієї хвилини, а потім швидко заморожували у рідкому азоті. Пробіркам дозволяли розморозитися при кімнатній температурі та додавали по 1 мкг очищеного антитіла проти BrdU [BD Pharmingen, № у каталозі 555627] на пробірку разом з магнітними гранулами з білком A/G та буфер для розведення для ChIP. Імунні суспензії інкубували впродовж ночі при 4 °C при постійному обертанні. Імунологічно захоплену мічену BrdU ДНК очищали за допомогою набору для імунопреципітації хроматину Magna ChIP™ A/G (Millipore Sigma). Незв'язану ДНК зберігали у якості вихідної. 1 мкл імунопреципітованої ДНК використовували у кожній реакції кількісної ПЛР. У якості альтернативи, для збагачення одноланцюжковими міченими BrdU ДНК, опосередковану нагріванням денатурацію опускали та зразки обробляли для осадження BrdU, як описано вище. Потім отримували другий ланцюжок ДНК шляхом додавання суміші випадкових праймерів (Thermo Fisher), буферу для реакції синтезу другого ланцюгу, дНТФ та ДНК-полімерази I (Pol I, New England Biolabs). Реакційну суміш інкубували впродовж 4 годин при 16 °C, а потім очищали шляхом екстракції фенолом-хлороформом. Після синтезу другого ланцюгу дцДНК кінці ДНК добудовували за допомогою набору End-It DNA End-Repair [Epicenter, № у каталозі ER0720]. Фрагменти з тупими кінцями клонували, застосовуючи набір для ПЛР-клонування Zero Blunt TOPO (Thermo Fisher), а потім використовували для трансформації хімічно компетентних E. coli One Shot TOP10 [Thermo Fisher, № у каталозі C404010]. Окремі колонії збирали та піддавали секвенуванню за Сенгером, застосовуючи праймер до промотору T7, у Beckman Coulter Genomics.

Секвенування РНК (RNA-seq)

Загальну РНК з раннього пасажу, ранніх старіючих та глибоко старих клітин (фіг. 6a) екстрагували, як описано вище. Загальну РНК обробляли за допомогою набору Illumina TruSeq Stranded Total RNA Ribo-Zero та проводили секвенування спарених кінців 2×125 п.о. на HiSeq2500 Illumina, застосовуючи реагенти версії 4, у Beckman Coulter Genomics Inc. Для кожного зразку отримували більше 70 мільйонів прочитань. Експеримент з секвенування РНК проводили у трьох біологічних повторах.

Необроблені зчитування секвенування РНК вирівнювали зі збіркою геному людини GrCh38, застосовуючи HiSat2. [73] Кількість прочитань, картованих на геном, визначали, застосовуючи featureCounts. [74] Кількість прочитань потім нормували, застосовуючи спосіб усередненого середнього М-значень (TMM), у EdgeR. [75] EdgeR додатково використовували для одержання диференційної експресії по набору нормованих результатів. Результати диференційної експресії потім ранжували за кратністю зміни $\log_2$ та вводили у інтерфейс GenePattern для GSEA Preranked, використовуючи 1000 пермутацій, щоб визначити збагачення шляхами KEGG, SASP та відповіді інтерферону. [76,77] Результати потім корегували на множинні порівняння шляхом корегування номінального р-значення із застосуванням способу Беньяміні-Хохберга. [78] Результати відображували, застосовуючи програмне забезпечення GENE-E. [79]

Аналіз in silico факторів транскрипції, що зв'язуються з L1

Спектри факторів транскрипції створювали, використовуючи дані ChIP-seq з проекту ENCODE (номери доступу GEO GSE2961 та GSE32465). Прочитання ChIP-seq факторів транскрипції та контролю вхідної ДНК вирівнювали з консенсусною послідовністю L1HS, застосовуючи bowtie1. [80] Розраховували кратність зміни $\log_2$ збагачення на пару основ консенсусної послідовності L1HS, використовуючи покриття прочитань ChIP-seq факторів транскрипції на мільйон картованих прочитань (RPM) у порівнянні зі значеннями RPM для

контролю вхідної ДНК та згладжували шляхом локально зваженого згладжування діаграми розсіяння (LOESS) з параметром $\alpha=0,1$. Загальну кількість картованих прочитань, використаних у нормуванні RPM, визначали за окремим вирівнювання bowtie1 з геномом людини (hg19).

Конструювання репортерів FOXA1

Репортерні плазмиди промотору L1-L1WT та L1 del (390-526) - отримували від Сергія Дмитрієва, Інститут біоорганічної хімії, Москва. [81,82] Обидві містили люциферазу у якості репортеру, клоновану у смисловій орієнтації. Для того щоб визначити антисмислову транскрипцію з тієї ж плазмиди, вставляли усилений варіант жовтого флуоресцентного білку (EYFP) у зворотній орієнтації проти ходу транскрипції від 5'-НТО L1, як описано далі. Послідовність EYFP вирізали з pEYFP-N1 [Clontech, № у каталозі 6006-1] за допомогою рестриктаз AgeI та NotI та створювали тупі кінці. Плазмиди L1WT та L1del розщеплювали рестриктазою XbaI, створювали тупі кінці та обробляли FastAP (Fermentas). Успішну вставку антисмислової EYFP перевіряли із застосуванням праймерів ПЛР AAAGTTTCTTATGGCCGGGC (у EYFP) та GCTGAACCTTGTGGCCGTTTA (у промоторі L1) та секвенування за Сенгером. Плазмиду pcDNA3.1/LacZ використовували у якості контролю котрансфекції. Експерименти з люциферазою та β -галактозидазою проводили, як описано. [83] EYFP-N1 використовували у якості позитивного контролю для детектування сигналу EYFP. Котрансфекції проводили на клітинах раннього пасажу LF1, застосовуючи ліпофектамін з реагентом Plus (Invitrogen), слідуючи інструкціям виробника.

Лентивірусні вектори

Конструкції отримували із загальнодоступних депозитаріїв, як зазначено нижче. Отримували віриони та інфікували клітини-мішені, як описано. [84] Послідовності кшПНК отримували з The RNAi Consortium (TRC), [85] клонували у вектори pLKO.1 третього покоління та досліджували їх ефективність. Чотири селекуємі маркери використовували для забезпечення можливості селекції множиною лікарських засобів: pLKO.1 puro (2 мкг/мл) та pLKO.1 hygro (200 мкг/мл) (Addgene, плазмід № 8453, 24150), pLKO.1 blast (5 мкг/мл) (Addgene, плазмід № 26655), pLKO.1 neo (250 мкг/мл) (Addgene, плазмід 13425). pLKO-RB1-shRNA63 та pLKO-RB1-shRNA19 (Addgene, плазмиди # 25641 та 25640). [86] Для FOXA1 використовували кшПНК TRCN0000014881 (a) та TRCN0000014882 (b). Для TREX1 використовували кшПНК TRCN0000007902 (a) та TRCN0000011206 (b). Для нокдауну L1 були розроблені та досліджені дев'ять кшПНК, з яких для двох (shL1_11 до BP31, AAGACACATGCACACGTATGT та shL1_44 до BP32 AAGACACATGCACACGTATGT) виявили значний нокдаун (фіг. 10g), та вони були вибрані для подальшої роботи. Решта сім кшПНК не викликали або викликали мінімальний нокдаун. Для cGAS використовували кшПНК TRCN0000128706 (a) та TRCN0000128310 (b). Для STING використовували кшПНК TRCN0000161345 (a) та TRCN0000135555 (b).

У всіх експериментах з ектопічної експресії використовували конструкції, отримані у ORFeome Collaboration [87] у лентивірусному векторі pLX304 (стійкому до бластицидину, Addgene, плазмід 25890), та їх отримували з депозитарію плазмід DNASU. [88] RB1 (ccsbBroad304_06846, HsCD00434323), TREX1 (ccsbBroad304_02667, HsCD00445909), FOXA1 (ccsbBroad304_06385, HsCD00441689).

Усі втручання у старі клітини починали шляхом інфікування клітин у 12 тижнів старіння (точка D на фіг. 6a). Після селекції підходящими лікарськими засобами клітини інкубували до 16 тижнів старіння (точка E на фіг. 6a), а потім збирали для подальшого аналізу.

Втручання 3X проводили шляхом інфікування клітин раннього пасажу LF1 послідовно векторами pLKO.1 puro shRB, pLKO.1 hygro shTREX1 та pLX304 blast FOXA1 (фіг. 10c). Після кожної інфекції наростаючий стійкий до лікарського засобу пул клітин відразу ж інфікували наступним вектором. Після третьої інфекції клітини збирали для подальшого аналізу через 48 годин після завершення селекції лікарським засобом. Інфікування також здійснювали у різних комбінаціях, та у кожному випадку вони приводили до активації експресії L1, початку старіння клітин та індукції відповіді IFN-I. Зазначену вище послідовність вибирали, так як вона приводила до найбільш ефективної селекції клітин для подальшого аналізу. Для того щоб забезпечити можливість додаткового (четвертого) втручання у клітини 3X (shL1, shSTING або shCGAS), шпильки, націлені на RB1, переклонували у pLKO.1 нео, таким чином, вивільнюючи pLKO.1 puro для четвертого гену, що цікавить. Це дозволяло ефективно здійснити процес селекції лікарським засобом та зібрати зразок через 48 годин після останньої селекції.

Репортери ретротранспозиції

Двовекторну репортерну систему з подвійною люциферазою, описану Xie та інш. (2011), [89] пристосовували для лентивірусної доставки. Репортери L1RP-Fluc переклонували з плазмід pWA355 та pWA366 у лентивірусний каркас pLX304. pWA355 містила функціональний активний елемент L1_{RP}, тоді як pWA366 містила мutowаний елемент L1RP(JM111), що несе дві місценс-

мутації у BP31, який нездатний до ретротранспозиції. Клітини раннього пасажу LF1 інфікували Rluc, що експресує лентівірус та ген стійкості до пуроміцину. Об'єднані стійкі до лікарського засобу клітини потім інфікували високим титром частинок з конструкціями pLX304-WA355 або pLX304-WA366. Негайно після інфікування клітини обробляли впродовж чотирьох днів ЗТС (при зазначених концентраціях). Клітини потім збирали та аналізували у них активності люцифераз Rluc та Fluc. Клітини HeLa котрансфікували репортером ретротранспозиції нативного L1 pLD143 [90] з векторами pLKO (shLuc, shL1_11 та shL1_44), застосовуючи FuGene HD (Promega). Культивування клітин, трансфекцію та аналіз ретротранспозиції проводили, як описано вище. Активність ретротранспозиції нормували на активність L1_{RP}, котрансфікованого з shLuc. Проводили по три незалежні експерименти для кожної конструкції.

Ідентифікація експресованих елементів L1 за допомогою ЗТ-ПЛР довгих фрагментів та 5'RACE

Загальну РНК збирали з клітин, застосовуючи реагент Тризол (Invitrogen). Отриману РНК додатково очищали, застосовуючи набір Purelink RNA Mini (Invitrogen), з розщепленням ДНКазою I. З елюйованої загальної РНК виділяли полі(A)-РНК, застосовуючи модуль для виділення полі(A)-мРНК за допомогою магнітних гранул NEBNext (New England Biolabs). Прямий праймер (MDL15UTRPRAF, набір праймерів 1, таблиця 1) застосовували з будь-яким з двох зворотних праймерів (MDL15UTRPRCR, набір праймерів 3, розмір амплікону 537 п.о., або MDL15UTRPRDR, набір праймерів 4, розмір амплікону 654 п.о.). Застосовували високоточну термостабільну зворотну транскриптазу (набір PyroScript RT-PCR Master Mix, Lucigen) з 10 нг полі(A)-мРНК на реакцію та ампліфікували впродовж 10 циклів. У якості негативних контролів використовували реакційну суміш без матриці та оброблені РНКазою А зразки. Отримані амплікони клонували у вектор TOPO-TA (Invitrogen) та отримані у результаті цього плазмиди використовували для трансформації хімічно компетентних E. coli One Shot TOP10. Окремі колонії збирали та проводили секвенування за Сенгером, застосовуючи праймер для секвенування до промотору T7, у Beckman Coulter Genomics. 96 реакцій секвенування (1 планшет) проводили для кожної пари праймерів у чотирьох експериментах, сумарно 768 секвенованих клонів. З результатів секвенування видаляли праймери ЗТ-ПЛР, та вирівнювали їх з геномом людини (GRCh38) за допомогою BLAST з ціною співпадіння/неспівпадіння +1, -4, дозволяючи видоспецифічні повтори для Homo sapiens. Оцінювали тільки ідеальні співпадіння та анотували їх геномні координати. 658 клонів можна було картувати на еталонному геномі, 51 містили щонайменше 1 неспівпадіння та, отже, можливо являли собою елементи, які були поліморфні у лінії клітин, та 58 були артефактами клонування. Якщо клон був наданий у множині випадків ідеальної ідентичності, тоді використовували фракційну кількість шляхом ділення підрахованої кількості на кількість елементів з такою ж послідовністю. Кожен картований клон додатково аналізували, застосовуючи L1Xplorer, [91] щоб виявити особливості класифікації елементу L1 та інтактний він або ні.

У якості альтернативи, полі(A)-РНК, виділену як описано вище, піддавали швидкій ампліфікації кінців кДНК (RACE). Кожна реакційна суміш містила 10 нг полі(A)-РНК, та її обробляли, застосовуючи набір 5'RACE System [Thermo Fisher, № у каталозі 18374-041]. Два антисмислові ген-специфічні праймери (GSP), використовували для 5'RACE, перераховані далі: у якості GSP1-MDL15UTRPRDR (набір праймерів 4, таблиця 1), та у якості гніздового GSP2-MDL15UTRPRCR (набір праймерів 3, таблиця 1). Продукти ампліфікації клонували та секвенували, як описано вище, застосовуючи праймер для секвенування до промотору T7, у Beckman Coulter Genomics. Всього секвенували 94 клони: 26 містили, головним чином, ділянку полі(G), утворену на етапі створення хвосту у протоколі RACE, та 18 неможливо було картувати на геном людини. Решта 50 картованих клонів містила послідовності L1, та їх вирівнювали з консенсусною послідовністю L1HS, використовуючи установку >95 % ідентичності у положеннях 1-450. [92] Картовані клони також приписували окремим сімействам L1, застосовуючи програмне забезпечення RepEnrich. [93] Попарні вирівнювання з консенсусом проводили за допомогою LALIGN. [94] Множинні вирівнювання послідовностей розраховували, застосовуючи MAFFT (множинне вирівнювання із застосуванням швидкого перетворення Фур'є) з алгоритмом L-INS-i (точний для вирівнювання <200 послідовностей). [95] Візуалізацію вирівнювання, роззвічування % ідентичності та консенсус отримували за допомогою Jalview. [96]

Створення та аналіз нокаутів CRISPR-Cas9

Досліджували три різні послідовності нРНК для кожного ланцюгу рецептору IFNAR (IFNAR1 та IFNAR2), перераховані у ресурсі GeCKO версії 2.0 (Feng Zhang Lab, MIT [97,98]), та вибрали наступні: IFNAR1 (HGLibA_29983) AACAGGAGCGATGAGTCTGTA; IFNAR2 (HGLibA_29985) GTGTATATCAGCCTCGTGTT. Cas9 та нРНК доставляли, використовуючи один лентівірусний вектор [LentiCRISPR_v2, Feng Zhang Lab, MIT; Addgene, плазміда № 52961], що несе ген

стійкості до пуроміцину. Ефективність мутагенезу CRISPR-Cas9, на основі якої вибрали зазначені вище дві нРНК, оцінювали за допомогою обробки інтерфероном інфікованих клітин та тих, що пройшли селекцію лікарським засобом [універсальний інтерферон I типу, PBL Аналіз Science, № у каталозі 11200-1] та відстежування транслокації у ядро фосфо-STAT2 та IRF9 за допомогою імунофлуоресценції. Відсутність транслокації означала відсутність відповіді IFN-I та, отже, втрату функції IFNAR. Експериментальні процедури проводили, слідуючи протоколам, наданим Zhang lab. [99,100] У експерименті, показаному на фіг. 3h (PeC) та фіг. 10k, використовували обидві нРНК IFNAR1 та IFNAR2 для обробки одних і тих же клітин, щоб додатково підвищити ефективність порушення відповіді INF-I. Для клітин раннього пасажу та старих клітин здійснювали коінфікування векторами IFNAR1 та IFNAR2, а потім селекцію пуроміцином. Для старих клітин високим титром лентівірусних частинок обробляли старі клітини у 12 тижнів старіння клітин (точка D, фіг. 6a), та клітини аналізували через 4 тижні (точка E, фіг. 6a). Для експерименту, показаного на фіг. 3h (BCPC), редаговані клітини раннього пасажу клонували шляхом клонування потомства однієї клітини. 24 окремі клітини виділяли, застосовуючи технологію CellRaft (Cell Microsystems), та розмножували. Геномний скринінг сайтів розрізання CRISPR проводили за допомогою CRISPR Sequencing Service (CCIB DNA Core, Лікарня загального профілю Массачусетса). [101] Успішний нокаут IFNAR1 та IFNAR2 підтвердили у чотирьох з 24 розмножених клональних ліній клітин.

Імуноблоттинг

Клітини збирали у буфер для зразку Леммлі (60 мМ Tris, pH 6,8, 2 % DCH, 10 % гліцерин, 100 мМ ДТТ) та кип'ятили впродовж 5 хвил. при 100 °C. Екстракти цільних клітин (60 мкг білку) розділяли за допомогою ЕФ ТА ПААГ/ДЧН ТА переносили на мембрани Immobilon-FL (Millipore). Неспецифічне зв'язування блокували шляхом інкубації у 4 % бичачому сироватковому альбуміні (BCA; Thermo Fisher) та 0,1 % твін-20 на ФБР впродовж 1 год. при кімнатній температурі. Первинні антитіла розбавляли у блокуючому розчині та інкубували впродовж ночі при 4 °C. Перелік усіх первинних антитіл представлений у таблиці 2. Вторинні антитіла розбавляли у блокуючому розчині та інкубували впродовж 1 години при кімнатній температурі. Сигнали детектували, застосовуючи систему візуалізації у інфрачервоному діапазоні LI-COR Odyssey (LI-COR Biosciences). Для кількісного аналізу сигналів усі зразки, які необхідно було порівняти, розділяли на одному гелі. Стандарти завантаження візуалізували на тому ж блоті, що і тестовані зразки, застосовуючи 2-кольорову систему LI-COR. Смуги візуалізували та здійснювали кількісний аналіз, застосовуючи програмне забезпечення LI-COR. Кількісний аналіз усіх смуг, які необхідно було порівняти, проводили на одному зображенні, та сигнали смуг знаходилися у межах лінійного діапазону детектування пристроєм.

Імунофлуоресцентна мікроскопія, проведена на клітинах у культурі

Клітини ростили на покривних стеклах та зразки обробляли, як описано раніше. [102] Первинні антитіла приведені у таблиці 2. Зафарбовування олдНК проводили, як описано у Thomas та інш. [103] Коротко, клітини, висіяні на покривні стекла, фіксували на льоду за допомогою 4 % параформальдегіду (ПФА) впродовж 20 хвил., а потім інкубували у 100 % метанолі при -20 °C впродовж ночі. Клітини потім обробляли 200 мкг/мл РНКаз А при 37 °C впродовж 4 годин. Клітини блокували 3 % БСА та інкубували впродовж ночі при 4 °C з первинними антитілами, розведеними у 3 % БСА. Зображення отримували, застосовуючи конфокальний лазерний скануючий мікроскоп LSM 710 Zeiss або інвертований флуоресцентний мікроскоп Ti-S Nikon. Усі налаштування мікроскопу були встановлені для збору зображень нижче насичення, та їх зберігали постійними для всіх отриманих зображень у одному експерименті, як описано раніше. [104] Аналіз зображень проводили, як описано нижче для тканин.

Панелі для ПЛР

Загальну РНК збирали з клітин, як зазначено вище (кількісна ПЛР) та аналізували, застосовуючи панель для проведення ПЛР RT² Profiler™ Human Type I Interferon Response від Qiagen [№ у каталозі PAHS-016ZE-4]. Реакції зворотної транскрипції проводили за допомогою набору Qiagen RT² First Strand [№ у каталозі 330404], використовуючи 1 мкг загальної РНК у якості вихідного матеріалу. У 102 мкл суміші із завершеною реакцією додавали 650 мкл загальної суміші Qiagen RT² SYBR Green ROX qPCR Mastermix [№ у каталозі 330521] та 548 мкл вільної від РНКаз води, чистої для молекулярного аналізу, та аналізували у 384-лунковому блоці на пристрої ViiA 7 Applied Biosystems. При всіх процедурах слідували протоколам виробника. Усі умови аналізували у трьох повторях. Результати аналізували, використовуючи GeneGlobe Data Analysis Center від Qiagen. [105] Коротко, значення C_t нормували по панелі генів домашнього господарства (HKG). Значення ΔC_t розраховували між значеннями для гену, що цікавить, (GOI) та середнім значенням для HKG. Кратність зміни потім розраховували,

застосовуючи формулу $2^{-\Delta\Delta CT}$. Нижню межу детектування встановлювали на C_t , рівний 35. Для будь-якого GOI, щоб вважати значення значимим, встановлювали наступні фільтри: (i) зміна у експресії > 2 рази; та (ii) р-значення $> 0,05$. Крім того, гени із середнім $C_t > 32$ як у контрольному, так і у тестованих зразках, також видаляли.

5 Твердофазний імуноферментний аналіз (ELISA)

Проводили кількісний аналіз рівнів інтерферону β за допомогою набору для аналізу ELISA сироватки VeriKine-HS Human Interferon Beta Serum (PBL Assay Science, № у каталозі 41415). Культуральні середовища кондиціювали впродовж 48 годин перед збором. Для видалення частинок та уламків аліквоти по 1 мл центрифугували 5 хвил. при 5000 x g. Усі інкубації проводили у закритій камері при кімнатній температурі (22-25 °C), намагаючись уникнути коливань температури. 50 мкл буферу для зразку, а потім 50 мкл розчину розведеного антитіла додавали у кожну лунку. Нарешті, додавали по 50 мкл на лунку тестованих зразків, стандартів або пустих контролів. Планшети запечатували та струшували при 450 об/хвил. впродовж 2 годин. Після закінчення періоду інкубації вміст планшету видаляли та лунки промивали три рази 300 мкл розведеного розчину для промивання. У кожну лунку додавали по 100 мкл розчину HRP та інкубували впродовж 30 хвил. при постійному струшуванні. Лунки випорожняли та промивали чотири рази розчином для промивання. У кожну лунку додавали по 100 мкл розчину субстрату TMB. Планшети інкубували у темноті впродовж 30 хвил. Нарешті, у кожну лунку додавали по 100 мкл зупиняючого реакцію розчину та впродовж 5 хвил. реєстрували поглинання на 450 нм. Значення, зареєстровані для пустих контролів, віднімали із значень для стандартів, а також для зразків, щоб прибрати фон. Одиниці оптичної густини (ОГ) наносили на графік, використовуючи 4-параметричну апроксимацію стандартної кривої, та використовували для розрахунку титрів інтерферону у зразках.

Зразки тканин людини

Зразки шкіри людини збирали у ході дослідження Leiden Longevity Study, [106,107] та вони були надані Медичним центром Лейденського університету, Нідерланди. Отримували інформовану згоду, та усі протоколи були схвалені етичним комітетом Медичного центру Лейденського університету. Зразки збирали у вигляді біоптатів товщиною 4 мм, отриманих шляхом щипкової біопсії на усю товщину, заливали середовищем для одержання зрізів при оптимальній температурі (ОСТ), швидко заморожували та зберігали при -80 °C. Дослідники були засліплені у відношенні всього, крім віку та статі суб'єктів. Із залитих ОСТ зразків отримували кріозрізи товщиною 8 мкм, застосовуючи кріомікромом Leica CM3050S. Стекла фіксували 4 % ПФА та 0,5 % тритоном X-100 на ФБР (попередньо нагрітим до 37 °C) впродовж 20 хвил. при кімнатній температурі. Не проводили додаткову пермеабілізацію. Інкубації з антитілом передували етап блокування 4 % бичачим сироватковим альбуміном (BCA; фракція V, Thermo Fisher), 2 % сироваткою осла, 2 % сироваткою кролика та 0,1 % тритоном X-100 на ФБР впродовж 1 години при кімнатній температурі. Первинні антитіла розбавляли у описаному вище блокуючому розчині (1:200) та інкубували впродовж ночі при 4 °C на качалці у вологій камері. Вторинні антитіла (мічені AlexaFluor 546 та AlexaFluor 647, Life Technologies) також розбавляли у блокуючому розчині та інкубували впродовж 2 годин при кімнатній температурі. По три 15 хвил. етапи промивання у ФБР, що містить 0,2 % тритон X-100, йшло після кожної інкубації з антитілом. Здійснювали контрастне забарвлювання ядер за допомогою 2 мкг/мл DAPI на ФБР, що містить 0,2 % тритон X-100, впродовж 15 хвил. Забарвлені стекла заключали у ProLong Antifade Mountant без DAPI (Life Technologies) та візуалізували за допомогою конфокального лазерного скануючого мікроскопу Zeiss LSM 710. Для кожного поля отримували серію зрізів по осі z, що охоплюють усю товщину тканини. Усі установочні параметри мікроскопу та час експозиції встановлювали таким чином, щоб отримати зображення нижче насичення, та тримали постійними для всіх зображень, отриманих у межах одного експерименту. Аналіз зображень проводили, застосовуючи або програмне забезпечення CellProfiler, [108] або відкрите програмне забезпечення ImageJ від NIH. [109] Ядра визначали, використовуючи канал DAPI. Контури клітин визначали шляхом радіального розширення маски для ядер, використовуючи функцію Propagate, доти, поки не був досягнутий поріг інтенсивності у каналах AlexaFluor 546 та AlexaFluor 647. Інтенсивність флуоресценції всередині даних областей потім реєстрували у обох каналах. Для кожного зразку реєстрували всього 200 ядер у множині полів зору. Зрізи тканин миші обробляли та аналізували таким же чином, як описано вище.

Зразки тканин миші

Загальну РНК екстрагували з 50 мг вісцеральної жирової тканини, тканини тонкого кишечника, тканини скелетних м'язів, бурої жирової тканини або тканини печінки шляхом подрібнення, а потім гомогенізації у тризолі (Invitrogen) із застосуванням гомогенізатору Power Gen 125 (Fischer Scientific). Після розділення фаз РНК у водному шарі очищали, застосовуючи

набір для виділення РНК Purelink RNA Mini (Invitrogen) з розщепленням ДНКазою I. Щоб оцінити експресію генів за допомогою ЗТ-кПЛР, здійснювали зворотну транскрипцію 1 мкг загальної РНК, як описано вище. У кожному окремому експерименті усі зразки обробляли паралельно та без засліплення.

Візуалізацію тотального препарату білої жирової тканини здійснювали, слідуючи способу, описаному у Martinez-Santibañez та інш. (2014). [110] Коротко, білу жирову тканину (вісцеральні відкладення) розділяли на шматочки 0,5-1 см³ та інкубували у 10 мл свіжого фіксуючого буферу (1 % ПФА на ФБР, рН 7,4) впродовж 30 хвил. при кімнатній температурі при легкому покачуванні. Після трьох етапів промивання за допомогою ФБР, тканинні блоки розрізали на шість рівних шматочків. Усі наступні інкубації проводили у циліндричних мікроцентрифужних пробірках ємністю 2 мл. Перед інкубацією з первинним антитілом проводили етап блокування за допомогою 5 % БСА, 0,1 % сапоніну на ФБР впродовж 30 хвил. при кімнатній температурі. Первинні антитіла розбавляли у описаному вище блокуючому розчині (1:200) та інкубували впродовж ночі при 4 °C при легкому покачуванні. Вторинні антитіла (забарвлені AlexaFluor 546, AlexaFluor 594 та AlexaFluor 647, Life Technologies) також розбавляли у блокуючому розчині та інкубували впродовж 2 годин при кімнатній температурі. По три 10 хвил. етапу промивання у ФБР йшло після кожної інкубації з антитілом. Антитіло-незалежне зафарбовування ядер та ліпідів проводили після імунологічного зафарбовування: DAPI та BODIPY (Thermo Fisher) розбавляли у ФБР з 5 % БСА та інкубували із зразками тканин впродовж 20 хвил. з наступними трьома етапами промивання, як описано вище. Зафарбовані зразки акуратно поміщали на оптимізовані для конфокальної візуалізації предметні стекла з лунками з боросилікатного скла № 1,5. Маленька крапля ФБР попереджала висихання. Отримані зображення аналізували, як описано вище.

Однчасне зафарбовування активності SA- β -Gal та білку BP31 у зрізах печінки здійснювали шляхом зафарбовування спочатку SA- β -Gal, як описано. [111] Потім зразки піддавали тепловому демаскуванню епітопів шляхом обробки паром впродовж 20 хвил. у буфері для демаскування антигену (10 мМ Тріс, 1 мМ ЕДТА, 0,05 % твін 20, рН 9,0). Зразки потім обробляли для імуофлуоресцентного зафарбовування, як описано вище ("Зразки тканин людини").

Отримували криозрізи тканини нирки, збереженої у OCT, обробляли впродовж 10 хвил. 0,5 % (маса/об'єм) періодною кислотою, потім зафарбовували реагентом Шифф-йодною кислотою (Fisher Scientific, № у каталозі SS32-500) впродовж 10 хвил. Зафарбовані зрізи тканини поміщали у Shandon Aqua Mount (Fisher Scientific, № у каталозі 14-390-5), а потім візуалізували шляхом освітлення методом світлого поля. Гломерулосклероз оцінювали, як описано. [112] Коротко, 40 клубочків на тварину оцінювали засліпленим способом та розподіляли бали від 1 до 4: бал 1-<25 % склерозу; 2-25-50 % склерозу; 3-50-75 % склерозу; 4-75 % склерозу. Властивістю, застосовуваною для оцінки склерозу, була інтенсивність та глибина проникнення забарвлення у ШИК-позитивні ушкодження всередині клубочків. На фіг. 4е приведений приклад склерозованого клубочку, який виглядає більш зморщеним та забарвлюється ШИК більш інтенсивно.

Чотириголові м'язи заливали OCT, робили зрізи товщиною 12 мкм та поміщали у гістологічне середовище на позитивно заряджених стеклах. Зрізи фарбували Н & Е (гематоксилін, 3 хвил., а потім еозин, 30 сек). Залиті стекла візуалізували за допомогою мікроскопу Zeiss Axiovert 200M, обладнаного камерою для кольорової зйомки Zeiss MRC5. Для вимірювання діаметру м'язового волокна вимірювали найменшу відстань поперек ~ 100 м'язових волокон на тварину, застосовуючи програмне забезпечення ImageJ, як описано [113]. Критерій Колмогорова-Смирнова використовували для оцінки статистичної значущості відмінностей між отриманими розподілами.

Статистична обробка

Excel використовували для проведення загального статистичного аналізу (середні значення, С.О., t-критерії і т.д.). Програмне забезпечення R для статистичних розрахунків (64-бітна версія 3.3.2) використовували для однофакторного дисперсійного аналізу з апостеріорним критерієм множинних порівнянь Т'юкі. Для узгодженості порівнянь значимість на всіх фігурах позначена, як описано далі: *P<0,05, **P<0,01. Розміри вибірок вибирали на основі попереднього досвіду та раніше опублікованих експериментів, у яких спостерігали відмінності. Не використовували статистичний тест, щоб заздалегідь визначити розмір вибірки. Жоден зразок не був виключений. Усі спроби реплікації були успішними. Не було знахідок, які б не повторювалися або були б не відтворювані. Природа та кількості аналізованих зразків (позначені n) у кожному експерименті перераховані на підписах до фігур. Кількість незалежних експериментів також перераховано на підписах до фігур. При кількісному аналізі результатів вимірювання імуофлуоресценції дослідники були засліплені. Поля зору або зрізи тканин для кількісного

аналізу вибирали довільно та оцінювали, застосуючи методи, зазначені для окремих експериментів. При оцінці гломерулосклерозу та діаметру м'язових волокон дослідники були також засліплені. Для експериментів із секвенування РНК та експериментів з панелями ПЛР статистична обробка описана внизу зазначених розділів (вище).

5 ПРИКЛАД 1 АКТИВАЦІЯ L1 ТА ІНТЕРФЕРОНУ ПРИ СТАРІННІ КЛІТИН

Активність RTE може викликати аберантну транскрипцію, альтернативний сплайсинг, інсерційний мутагенез, ушкодження ДНК та нестабільність геному. [114] Послідовності, що походять з RTE, складають дві треті геному людини, [115] хоча значна більшість була активна мільйони років тому та більше не інтактні. Єдиним RTE людини, здатним до автономної ретротранспозиції, є довгий диспергований елемент-1 (LINE-1, або L1). Проте, генеративна активність L1 є основним джерелом структурного поліморфізму у людини. [116] Усе більше фактів вказує на активацію RTE у деяких типах раку, у головному мозку дорослого та у процесі старіння. [117,118,119,120] Механізми клітинного захисту включають гетерохроматинізацію даних елементів, шляху невеликих РНК, які націлені на зазначені транскрипти, та механізми протівірусного вродженого імунітету. [121] Соматична активація RTE з віком консервативна у дріжджів та *Drosophila*, та зниження активності RTE робить корисну дію. [122]

На фіг. 1a та фіг. 6a-e показано, що транскрипція L1 активувалася експоненціально у процесі реплікативного старіння (PeC) фібробластів людини, зростаючи у 4-5 разів до 16 тижнів після припинення проліферації, що називали пізнім старінням клітин. Множина праймерів для ЗТ-кПЛР була розроблена, щоб детектувати еволюційно нещодавні елементи L1 (L1HS-L1PA5; фіг. 1b, фіг. 6h). Рівні полі(A)+ РНК L1 зростали у 4-5 разів у клітинах на стадії пізнього старіння (PeC) у смисловому, але не у антисмисловому напрямку протягом усього елемента (фіг. 1c). Амплікони, отримані у результаті ЗТ-ПЛР довгих фрагментів (фіг. 1b), секвенували за Сенгером, виявив 224 елементи, дисперговані по всьому геному; одна третина (75, 33,5 %) являла собою L1HS, з яких 19 (25,3 %, 8,5 % від загальної кількості) були інтактними (тобто анотованими як такі, що не містять інактивуючих BP3 мутацій; фіг. 6f, g). Також проводили 5'RACE з тими ж праймерами та виявили, що більша частина транскриптів L1 з підвищеною експресією у старих клітинах ініціювалась всередині або поряд з 5'-НТО (фіг. 7).

Елементи L1 можуть стимулювати відповідь IFN-I. [123] На фіг. 1d та фіг. 6i показано, що інтерферони IFN- α та IFN- β 1 індукувалися до високих рівнів у клітинах на стадії пізнього старіння. Старіння клітин проходить через ранню фазу відповіді на ушкодження ДНК, за якою слідує відповідь SASP. [124] У отриманих результатах у даній заявці задокументована третя та ще більш пізня фаза, що характеризується підвищенням експресії L1 та відповіді IFN-I (фіг. 1e), яка раніше не була описана, можливо, тому що у більшості досліджень зосереджувалися на більш ранніх моментах часу. Аналіз повного транскриптому RNA-seq підтвердив, що SASP та відповіді IFN-I розділені у часі (фіг. 8). Пізню фазу активації L1 та індукції IFN-I також спостерігали при викликаному онкогеном старінні клітин (BOC) та викликаному стресом передчасному старінні клітин (BCPC) (фіг. 1e, фіг. 1j, k).

ПРИКЛАД 2 МЕХАНІЗМИ АКТИВАЦІЇ L1

Для того щоб досліджувати, як механізм нагляду не справляється у процесі старіння клітин, досліджували три фактори: TREX1, RB1 та FOXA1. TREX1 являє собою 3'-екзонуклеазу, яка руйнує чужорідні ДНК, що вторгаються, та його втрата була асоційована з накопиченням цитоплазматичної кДНК L1. [125] На фіг. 9a показано, що експресія TREX1 значно знижувалася у старих клітинах. Було показано, що RB1 зв'язується з повторюваними елементами, включаючи L1, та викликає їх гетерохроматинізацію. [126] На фіг. 2a показано, що експресія RB1 сильно знижувалася у старих клітинах (PeC); тоді як експресія інших представників сімейства RB (RBL1, RBL2) не змінювалася (фіг. 9b). Збагачення RB1 5'-НТО елементів L1 було видно у проліферуючих клітинах, знижувалося при ранньому старінні клітин та ставало недетектованим у більш пізній час (фіг. 2a). Це збігалось зі зменшенням кількості міток H3K9me3 та H3K27me3 у даних областях (фіг. 9c).

Для того щоб визначити нові фактори, які взаємодіють з 5'-НТО L1, ми досліджували базу даних ENCODE ChIP-seq та виявили, що провідний фактор транскрипції FOXA1 зв'язується з даною областю у декількох лініях клітин (фіг. 9d). Експресія FOXA1 підвищена у старих клітинах. [127] На фіг. 2b показано, що FOXA1 пов'язаний з центральною областю 5'-НТО L1. Використовуючи репортери транскрипції, ми виявили, що делеція сайту зв'язування FOXA1 знижувала як смислову, так і антисмислову транскрипцію з 5'-НТО L1 [128] (фіг. 9e). Отже, спостережувана неправильна регуляція даних трьох факторів у старих клітинах може викликати активацію L1 за допомогою трьох додаткових механізмів: втрата RB1 у результаті зниження репресії гетерохроматину, підвищення рівнів FOXA1 у результаті активації промотору L1 та втрата TREX1 у результаті порушення видалення кДНК L1.

Отже, вплив дії на експресію RB1, FOXA1 або TREX1 у повністю старих клітинах досліджували, застосовуючи лентивірусні вектори (фіг. 10a, b). Ектопічна експресія RB1 пригнічувала підвищену експресію L1, IFN- α та IFN- β 1 у старих клітинах, тоді як його нокдаун додатково збільшував їх експресію (фіг. 2d). Надекспресія RB1 також відновлювала його присутність у 5'-НТО L1 (фіг. 2c). Та навпаки, нокдаун FOXA1 зменшував його зв'язування з 5'-НТО L1 (фіг. 9f) та знижував експресію L1, IFN- α та IFN- β 1, тоді як надекспресія FOXA1 підвищувала рівні L1, IFN- α та IFN- β 1 (фіг. 2e). Відповідні результати також отримали шляхом впливу на TREX1 (фіг. 2g). Отже, кожен з даних факторів робив значимий ефект на регуляцію L1 та відповіді IFN-I у старих клітинах.

Одиночні або подвійні втручання, націлені на дані фактори, викликали лише невеликі зміни експресії L1 та IFN-I у зростаючих клітинах раннього пасажу. Хоча деякі з даних ефектів були статистично значущими, їх затьмарювало потрійне втручання (3X) шляхом комбінування нокдаунів RB1 та TREX1 з надекспресією FOXA1, що призводило до масштабної індукції L1 та експресії IFN-I (фіг. 2f, фіг. 9g-i та фіг. 10c). Отже, у нормальних здорових клітинах у всіх трьох ефекторах повинні бути відхилення, щоб ефективно вивільнити L1.

ПРИКЛАД 3 НАСЛІДКИ АКТИВАЦІЇ L1

Для того щоб більш детально оцінити активацію IFN-I за допомогою L1, ми досліджували експресію 84 генів у даному шляху, використовуючи панелі ПЛР. Ми спостерігали розгорнуту відповідь, причому експресія більшості генів була підвищена (фіг. 2h, фіг. 9j, k): у 68 % (57/84) експресія була значно підвищена у старих клітинах та у 52 % (44/84) експресія була підвищена у клітинах 3X. Отримані результати підтверджують та додатково уточнюють транскриптомний аналіз RNA-seq (фіг. 8).

Виявили, що деякі HI3T, розроблені проти ВІЛ, також інгібують активність 3T L1. [129] Ми також розробили кшРНК проти L1, дві з яких знижували рівні транскрипції на 40-50 % та 70-90 % у глибоко старих клітинах та клітинах 3X, відповідно (фіг. 10g). Рівні білку BP31 були відповідно знижені у глибоко старих клітинах (фіг. 5h). Нарешті, зазначені кшРНК також зменшували ретротранспозицію рекомбінантних конструкцій репортеру L1 (фіг. 10k).

У клітинах, позбавлених TREX1, виявляють цитоплазматичну ДНК L1, накопичення якої можна інгібувати за допомогою HI3T. [130] Хоча відсутність включення BrdU є канонічною властивістю старих клітин (фіг. 6b), тривале мічення виявило ДНК, яка була переважно цитоплазматичною та високо збагаченою послідовностями L1 (фіг. 11a, b). Синтез цитоплазматичної ДНК L1 можна було майже повністю блокувати за допомогою HI3T ламівудину (ЗТС) або кшРНК до L1 (фіг. 3a, c). За допомогою антитіла проти гібридів ДНК:РНК виявили цитоплазматичний сигнал у старих клітинах, який у значній мірі колокалізувався з білком BP31 та перетворювався у сигнал оДНК після розщеплення РНКазою (фіг. 11c). Аналіз мічених BrdU послідовностей L1 у старих клітинах показав, що вони локалізовані по всьому елементу L1 (фіг. 11d, e). Відносно збільшення кількості послідовностей L1HS у загальній клітинній ДНК також можна виявити за допомогою аналізу методом кількісної ПЛР 6,16. [131,132] ЗТС у діапазоні 7,5-10 мкМ повністю блокував таке збільшення у старих клітинах і також гасив активність репортеру ретротранспозиції L1 (фіг. 10d, e).

Нокдаун L1 за допомогою кшРНК або обробка клітин за допомогою ЗТС значно знижували рівні інтерферону, а також більш широко зменшували відповідь IFN-I як у клітинах на стадії пізнього старіння, так і у клітинах 3X (фіг. 3b, фіг. 12a). ЗТС у діапазоні 7,5-10 мкМ оптимально інгібував відповідь IFN-I та був найбільш ефективним з 4 досліджених HI3T (фіг. 10f, j). Відносні ефективності HI3T узгоджуються з їх здатністю інгібувати L1 людини RT15. ЗТС також протидіяв відповіді IFN-I при інших формах старіння клітин - BOC та ВСПС (фіг. 3e).

Клітини пересівали за постійної присутності ЗТС з проліферативної фази до глибокої старості клітин. ЗТС значно не впливав на час входження у стан старіння клітин, індукцію p21 або p16, або ранню відповідь SASP, таку як підвищення експресії IL- β (фіг. 3f, фіг. 12b). Проте, масштаб пізньої відповіді SASP (такої як індукція CCL2, IL-6 та MMP3) значно зменшувався. Обробка кшРНК L1 також знижувала рівні експресії IL-6 та MMP3 у клітинах на стадії пізнього старіння (фіг. 11f). Отже, хоча активація L1 та наступна відповідь IFN-I наступали відносно пізно, вони вносять важливий внесок у зрілий SASP та прозапальний фенотип старих клітин.

ЗТС не впливав на рівні транскрипту L1 (фіг. 10i), дозволяючи припустити, що відповідь INF-I запускається кДНК L1. Як прогнозує дана модель, нокдаун компонентів шляху визначення цитозольної ДНК, cGAS або STING, [133] інгібував відповідь IFN-I як у клітинах на стадії пізнього старіння, так і у клітинах 3X (фіг. 10i та фіг. 12c, d), а також негативно регулював відповідь SASP у клітинах на стадії пізнього старіння (фіг. 12e).

HI3T, модифіковані алкілом у положенні 5'-рибози, не можуть бути фосфорильовані та, отже, не інгібують ферменти 3T. Проте, вони мають природну протизапальну активність,

пригнічуючи опосередковані P2×7 події, які активують шлях інфламасоми NLRP3. [134] Три-метокси-ЗТС (К-9) при концентрації 10 мкМ або 100 мкМ не інгібував відповідь IFN-I ні у клітинах на стадії пізнього старіння, ні у клітинах 3X (фіг. 12f). Отже, для дії ЗТС на шлях IFN-I потрібно інгібування ЗТ. При високих концентраціях (100 мкМ) К-9 виявляв деяку інгібувальну активність щодо маркерів запалення (фіг. 12g).

Для перевірки ролі передачі сигналів інтерферону у SASP, рецептори IFN- α/β (IFNAR1 та 2) були інактивовані за допомогою CRISPR/Cas9. Ефективна зупинка передачі сигналів IFN-I досягалася як у клітинах раннього пасажу, так і у клітинах у стані глибокого старіння (фіг. 10m). Як при реплікативній, так і при ВСПС формах старіння клітин, втрата передачі сигналів інтерферону антагонізувала пізні (CCL2, IL-6, MMP3), але не ранні (IL-1 β) маркери SASP (фіг. 3d). Цей результат додатково демонструє, що передача сигналів IFN-I сприяє встановленню повної та зрілої відповіді SASP у старих клітинах.

ПРИКЛАД 4 АКТИВАЦІЯ L1 У ТКАНИНАХ ЛЮДИНИ ТА МИШІ

Активацію експресії L1 при раку у людини детектували за допомогою антитіла BP31. [135] Той же реагент показав розповсюджену експресію BP31 як у старих клітинах, так і у клітинах 3X (фіг. 8a, c, f). У біоптатах шкіри нормальних людей похилого віку ми виявили, що 10,7 % дермальних фібробластів були позитивні по маркеру старіння клітин p16, що знаходиться у межах діапазону, задокументованого при старінні приматів [136] (фіг. 13b, d, f, h). Деякі з позитивних по p16 дермальних фібробластів були також позитивні по BP31 (10,3 %). Варто відмітити, що ми ніколи не спостерігали BP31 за відсутності експресії p16. Ми також виявили, на рівні окремих клітин, присутність фосфорильованого STAT1, що узгоджується з наявністю передачі сигналів інтерферону у мікрооточенні тканини [137] (фіг. 13b, e, g). Отже, у фракції старих клітин у нормальних людей спостерігається активація L1, що узгоджується з накопиченням даних подій під час прогресування старіння клітин.

Потім ми досліджували мишей та виявили, що експресія мРНК L1 поступово підвищувалася з віком у деяких тканинах (фіг. 15g). Виявлені послідовності РНК L1 переважно являли собою смисловий ланцюг, представлений повсюди у елементі, та виявлялись усі три активні сімейства L1 (фіг. 11g, h). На рівні білку, зустрічальність позитивних по BP31 L1 клітин підвищувалась у тканинах з віком (фіг. 4a). Області забарвлення BP31 колокалізувались з активністю асоційованою зі старінням клітин β -галактозидази (SA- β -Gal) (фіг. 4b). Експресія декількох генів відповіді IFN-I (Ifn- α , Irf7, Oas1), а також прозапальних маркерів та маркерів SASP (Il-6, Mmp3, Rai1, також відомий як Serpine1) підвищувалась у тканинах старих мишей (фіг. 4c, фіг. 14). Підвищення експресії L1 та генів відповіді IFN-I (Ifn- α , Oas1) також спостерігали у моделі викликаного експериментально старіння клітин (молоді тварини, піддані опроміненню сублетальними дозами; фіг. 4d).

Старих тварин (26 місяців) лікували впродовж двох тижнів ЗТС (вводили у воді у терапевтичних для людини дозах). Ми виявили велику та значну знижувальну регуляцію відповіді IFN-I та полегшення прозапального стану SASP (фіг. 4c; весь набір даних див. на фіг. 14 та у таблиці 7). Експресія мРНК L1 та p16 незначно знижувалася, у більшості випадків не досягаючи статистичної значущості. К-9 не впливав ні на відповідь IFN-I, ні на відповідь SASP. Імунофлуоресцентний аналіз зрізів тканини підтвердив, що у старих клітинах спостерігався SASP, та у експресуючих BP31 клітинах спостерігалася активована передача сигналів IFN-I (фіг. 15a-c). Лікування ЗТС значно знижувало як IFN-I, так і SASP, але не експресію L1 або присутність старих клітин. Отже, HI3T можна категоризувати як "сеностатичні" агенти, щоб відрізнити їх від "сенолітичної" терапії, яка видаляє старі клітини з тканин. [138,139]

Знижений адипогенез [140] та термогенез [141] властиві природному старінню, та обидва були підвищені у старих тварин через 2 тижні лікування ЗТС (фіг. 15d-f). На фіг. 4e показано, що більш тривале лікування (у віці від 20 до 26 місяців) ефективно боролось з декількома відомими фенотипами старіння: (i) інфільтрацією макрофагами тканин - відмітною ознакою хронічного запалення, [142,143] (ii) гломерулосклерозом нирки [144] та (iii) атрофією скелетних м'язів. [145] Найбільшу відповідь спостерігали для інфільтрації макрофагами білої жирової тканини, яка поверталася до юнацьких (5 місяців) рівнів всього лише після 2 тижнів лікування ЗТС.

Активація ендогенних елементів L1 та настання стійкої активації відповіді IFN-I є новим фенотипом старих клітин, включаючи старі клітини, що зустрічаються у природі, у тканинах. Даний фенотип поступово розвивається у процесі відповіді старінням клітин та, схоже, є важливим, але досі недооціненим компонентом SASP. Ми показали, що експресія трьох регуляторних факторів RB1, FOXA1 та TREX1 змінюється під час старіння клітин, та що дані зміни як достатні, так і необхідні, щоб дозволити активацію транскрипції елементів L1 (фіг. 4g). Отже, множина механізмів нагляду повинна бути порушена, щоб вивільнити L1, що підкреслює важливість збереження даних елементів у репресованому вигляді у соматичних клітинах.

Активация передачи сигналов врожденного иммунитета у відповідь на активацию L1 під час старіння клітин та старіння організму відбувається шляхом стимулюючого інтерферон шляху ДНК (СІД). Цитоплазматична ДНК може походити з декількох джерел, таких як мтДНК, вивільнена з мітохондрій, які знаходяться у стресових умовах, [146] або цитоплазматичні фрагменти хроматину (ЦФХ), вивільнені з пошкоджених ядер. [147,148] Результати даного винаходу дозволяють припустити, що кДНК L1 є важливим індуктором IFN-I у старих клітинах. Примітно, що лікування H3T ефективно протидіяло не тільки відповіді IFN-I, але також, більш широко, зменшувало пов'язане з віком хронічне запалення у множині тканин.

Стерильне запалення, також відоме як запальне старіння, є відмітною ознакою старіння організму та фактором, що сприяє множині пов'язаних з віком захворювань. [149,150] Результати даного винаходу свідчать про те, що активация елементів L1 (та необов'язково інших RTE) викликає запальне старіння, та що ЗТ L1 є підходящою мішенню для лікування пов'язаного з віком запалення та розладів.

ПРИКЛАД 5 ВПЛИВ АДЕФОВІРУ ТА ЛАМІВУДИНУ НА ВИКЛИКАНЕ СТАРІННЯМ КЛІТИН ПІДВИЩЕННЯ ПОШИРНОСТІ ПОСЛІДОВНОСТЕЙ L1, ЕКСПРЕСІЇ ГЕНІВ ІНТЕРФЕРОНУ ТА ЕКСПРЕСІЇ ГЕНІВ SASP

Вплив адефовіру та ламівудину на викликане старінням клітин підвищення поширеності послідовностей L1, експресію генів інтерферону та експресію генів SASP оцінювали у лініях фібробластів людини.

Поширеність послідовності L1 (число копій) оцінювали у трьох різних лініях фібробластів людини: LF1, IMR90, WI38, - застосовуючи аналіз методом кількісної ПЛР. Результати аналізу нормувати на поширеність 5S рДНК. Контроль (КТРЛ) являв собою необроблені проліферуючі клітини раннього пасажу. Лікарські засоби вводили безперервно у середовищі, починаючи з декількох пасажів до старіння клітин, при старінні клітин, а потім до пізнього старіння клітин. "Старі" зразки збирали через чотири місяці після початку старіння клітин. Обидва лікарські засоби додавали у середовище при концентрації 5 мкМ. Червоний стовпчик в умовах "старі": культури без лікарських засобів через 4 місяці у стані старіння клітин. На фіг. 17a показано, що число копій L1 підвищувалося при старінні клітин у всіх трьох лініях клітин, та обидва лікарські засоби значно запобігали даному підвищенню, причому адефовір був дещо ефективнішим, ніж ламівудин.

Вплив 5 мкМ адефовіру та ламівудину на експресію генів інтерферону оцінювали у двох лініях клітин (LF1 та IMR90) та на двох генах інтерферону (IFN- α та IFN- β 1), як описано на фіг. 17a, за виключенням того, що експресію зазначених генів вимірювали за допомогою ЗТ-кПЛР. На фіг. 17b показано, що висока експресія генів інтерферону у старих клітинах значно знижувалася у всіх випадках під впливом обох лікарських засобів, та знову адефовір був дещо більш ефективним, ніж ламівудин. Червоні стовбці являють собою культури без лікарських засобів через 4 місяці старіння клітин.

Вплив 5 мкМ адефовіру та ламівудину на експресію генів SASP оцінювали у одній лінії клітин (LF1), використовуючи два гени SASP (IL-6 та MMP3). КТРЛ являв собою експресію у нормальних, до старіння, необроблених клітинах. На фіг. 17c показано, що спостерігали підвищення експресії зі старінням клітин (червоні стовпчики), та у обох випадках експресія генів SASP значно знижувалася після обробки лікарськими засобами, причому адефовір був дещо більш ефективнішим, ніж ламівудин.

Нарешті, вплив високих концентрацій ламівудину та емтрицитабіну (10 мкМ та 50 мкМ) на експресію генів інтерферону (IFN- α та IFN- β 1) оцінювали у лінії клітин LF1. Це здійснювали шляхом пасирування клітин LF1 до стану старіння, підтримки їх у стані старіння клітин впродовж трьох місяців, додавання лікарських засобів, витримування клітин у присутності лікарських засобів впродовж 1 місяця, потім збору через 4 місяці. Експресію генів інтерферону оцінювали за допомогою ЗТ-кПЛР. КТРЛ являв собою клітини, оброблені, як описано вище, але без лікарських засобів. На фіг. 17d показано, що при концентрації 10 мкМ ламівудин знижував індукцію IFN-I та був дещо ефективнішим, ніж емтрицитабін. При концентрації 50 мкМ ламівудин насправді викликав підвищення експресії інтерферонів, навіть перевершуючи рівні, що спостерігаються у необробленій клітині. Вважають, що таке підвищення було викликане токсичністю лікарського засобу на даних високих рівнях. Навпаки, емтрицитабін при концентрації 50 мкМ знижував експресію інтерферонів, навіть до нижчого рівня, ніж зниження, що спостерігається при 10 мкМ.

Відповідно, при високих дозах токсичність ІЗТ може погіршувати їх здатність зупиняти або блокувати шкідливий вплив старих клітин та їх здатність попереджати або обертати пов'язане з віком запалення та розлади.

ПРИКЛАД 6 ПОРІВНЯЛЬНА ОЦІНКА ДЕКИЛЬКОХ ІЗТ У АНАЛІЗІ ДОЗА-ВІДПОВІДЬ

ІНГІБУВАННЯ АКТИВНОСТІ L1 У КЛІТИНАХ МИШІ ТА ЛЮДИНИ

Оцінювали здатність восьми сполук ІЗТ інгібувати активність LINE-1 (L1) у аналізі ретротранспозиції L1 миші: ламівудину (ЗТС); ставудину; емтрицитабін; априцитабін; тенофовіру дизопроксилу; ценсавудину; ельвудитабін та тенофовіру. Три сполуки ІЗТ оцінювали у аналізі ретротранспозиції L1 людини: ламівудин (ЗТС); ценсавудин та ельвудитабін.

Аналіз ретротранспозиції LINE-1 миші

Кодуюча подвійну люциферазу плазміда рYX016, що містить елемент L1 миші, була описана у Xie та інш., 2011. [151] Ламівудин (ЗТС), ставудин (d4T), емтрицитабін, априцитабін, тенофовіру дизопроксил та тенофовір придбавали у AK Science. Ельвудитабін отримували за допомогою синтезу на замовлення. Ценсавудин синтезували у Oncolys BioPharma. Клітини раку шийки матки HeLa культивували при 37 °C у термостаті з вологістю 5 % CO₂ у модифікованому за способом Дульбекко середовищі Ігла (DMEM) з високим вмістом глюкози (4500 мг/л глюкози), L-глутаміном, піруватом натрію та бікарбонатом натрію (Sigma), доповненому 10 % термоінактивованою фетальною бичачою сироваткою (Thermo Fisher).

Аналізи проводили, як описано у Xie та ін., 2011, [151] з декількома модифікаціями. Репортерний аналіз проводили у 96-лункових білих планшетах з оптичним дном. 6000 клітин HeLa висували у кожен лунку за 24 години до трансфекції та обробки сполуками. Усі сполуки ресуспендували у ДМСО. Концентрації вихідного розчину змінювалися від 50 мМ до 1,25 мМ в залежності від розчинності сполуки. Отримували серійні розведення (1:3) у ДМСО. Десять різних концентрацій кожної сполуки досліджували у трьох повторях. Середовище, що містить різні концентрації сполук, отримували шляхом додавання 2 мкл розведення сполуки у 1 мл культурального середовища. Кінцева концентрація ДМСО у середовищі становила 0,2 %. Реагент для трансфекції FuGENE® HD (Promega) використовували для трансфекції плазмідом рYX016 клітин. Суміш для трансфекції отримували у OriMEM (Thermo Fisher), використовуючи співвідношення реагенту та ДНК 3,5:1, слідуючи інструкціям виробника. Культуральне середовище видаляли з клітин та відкидали. Суміш для трансфекції (5 мкл) змішували з середовищем, що містить сполуку (100 мкл/лунку), та цю суміш додавали до клітин кожної лунки. Клітини інкубували впродовж 48 год. при 37 °C / 5 % CO₂.

Проводили кількісний аналіз активності люциферазного репортеру за допомогою системи для репортерного аналізу Dual-Luciferase® (Promega), слідуючи інструкціям виробника для багатолункових планшетів з наступною модифікацією: Клітини лізували безпосередньо у багатолунковому планшеті за допомогою 30 мкл пасивного лізуючого буферу (PLB) впродовж 20 хвил. при кімнатній температурі при плавному струшуванні, щоб гарантувати повний лізис клітин (замість 20 мкл PLB впродовж 15 хвил.). Вимірювали сигнали люциферази Firefly та Renilla, застосовуючи багатомодовий спектрофотометр для прочитання мікропланшетів SpectraMax i3x. Для вимірювання сигналів Firefly та Renilla використовували час накопичення сигналу 100 мс та 10 мс, відповідно. Відносну активність L1 розраховували як Firefly/Renilla * 10000. Результати інгібування доза-відповідь апроксимували чотирипараметричним логістичним рівнянням, використовуючи нелінійну регресію (застосовуючи Graphpad Prism 8), щоб визначити значення IC₅₀ для кожного інгібітору. Експеримент проводили двічі, незалежно.

Результати

Криві інгібування доза-відповідь для восьми сполук ІЗТ у двох незалежних експериментах представлені на фіг. 18А та фіг. 18В, відповідно. Значення IC₅₀ коротко представлені у таблиці 10. Неочікувано, для двох сполук ІЗТ - ценсавудину та ельвудитабін – виявили набагато більш низькі значення IC₅₀ (приблизно 100 нМ), ніж для інших сполук ІЗТ, таким чином, вони проявили неочікувану інгібувальну активність у відношенні L1 миші.

Аналіз ретротранспозиції LINE-1 людини

З огляду на їх несподівану здатність пригнічувати активність L1 миші, досліджували здатність ценсавудину та ельвудитабін пригнічувати активність L1 людини. Ламівудин також досліджували для порівняння.

Дослідження L1 людини проводили дуже подібним чином з такими для миші. рYX017, що кодує послідовність LINE-1 людини, ¹⁵¹ використовували замість рYX016. Так як людська конструкція давала менший сигнал, сполуки інкубували з клітинами впродовж 72 годин замість 48 годин та клітини висівали при щільності 2000/лунку замість 6000/лунку. Крім того, співвідношення реагенту для трансфекції та ДНК становило 2: 1 замість 3,5: 1.

Результати

Криві інгібування доза-відповідь для трьох сполук ІЗТ представлені на фіг. 19А-В та значення IC₅₀ коротко представлені у таблиці 11. Знову, ценсавудин та ельвудитабін проявили неочікувану інгібувальну активність у відношенні L1 людини (IC₅₀ приблизно 100 нМ) у

порівнянні з ламівудином (IC_{50} більше 800 нМ).

Аналіз життєздатності клітин

5 Вище описано, що токсичність ІЗТ може порушити їх здатність зупиняти або блокувати шкідливий вплив старих клітин та їх здатність запобігати або обертати пов'язане з віком запалення та розлади. Потенційну токсичність ламівудину (ЗТС); ставудину; емтрицитабіну; априцитабіну; тенофовіру дизопроксилу; ценсавудину; ельвуцитабіну та тенофовіру оцінювали у аналізі життєздатності клітин у дозах, що використовуються для отримання кривих доза-відповідь інгібування L1.

10 Клітини HeLa обробляли різними концентраціями восьми сполук ІЗТ впродовж 48 годин. Життєздатність клітин вимірювали за допомогою люмінесцентного аналізу життєздатності клітин CellTiter-Glo® (Promega®) та представляли у вигляді відсотку життєздатних клітин у порівнянні з необробленими клітинами. Стауроспорин, який, як відомо, викликає загибель клітин, використовували у якості контролю.

Результати

15 На фіг. 20 показано, що вісім сполук ІЗТ не приводили до яких-небудь значимих рівнів загибелі клітин у протилежність контролю - стауроспорину.

На закінчення, обидва ценсавудин та ельвуцитабін проявили несподівану здатність пригнічувати активність L1 миші та людини (IC_{50} приблизно 100 нМ), не викликаючи токсичність у аналізі життєздатності клітин при дозах до 2 мкМ.

20 Таблиці, описані у даному описі, представлені нижче.

Таблица 1

Перелік праймерів, використовуваних у аналізі ПЛР

Номер	Позначення	Послідовність	Примітки
Набір праймерів 1	MDL15UTRPR AF MDL15UTRPR AR Амплікон A, фіг. 1b	GCCAAGATGGCCGAATAGGA AAATCACCCGTCTTCTGCGT	5'-НТО LINE-1, положення 12-31, смислова орієнтація ² . 5'-НТО LINE-1, положення 64-83, антисмислова орієнтація ² . Використовували у експериментах 3Т-кПЛР для оцінки експресії РНК L1H. Використовували у експериментах ChIP.
Набір праймерів 2	MDL15UTRBF MDL15UTRBR Амплікон B, фіг. 1b	CGAGATCAAAGTCAAGGCG CCGGCCGCTTTGTTTACCTA	5'-НТО LINE-1, положення 402-421, смислова орієнтація ² . 5'-НТО LINE-1, положення 454-473, антисмислова орієнтація ² . Використовували у експериментах 3Т-кПЛР для оцінки експресії РНК L1H. Використовували у експериментах ChIP.
Набір праймерів 3	MDL15UTRCF MDL15UTRCR Амплікон C, фіг. 1b	TAAACAAAGCGGCCGGGAA AGAGGTGGAGCCTACAGAGG	5'-НТО LINE-1, положення 474-492, смислова орієнтація ² . 5'-НТО LINE-1, положення 530-549, антисмислова орієнтація ² . Використовували у експериментах 3Т-кПЛР для оцінки експресії РНК L1H. Використовували у експериментах ChIP.
Набір праймерів 4	MDL15UTRDF MDL15UTRDR Амплікон D, фіг. 1b	AGAGAGCAGTGGTTCTCCCA CAGTCTGCCCCGTTCTCAGAT	5'-НТО LINE-1, положення 619-638, смислова орієнтація ² . 5'-НТО LINE-1, положення 647-666, антисмислова орієнтація ² . Використовували у експериментах 3Т-кПЛР для оцінки експресії РНК L1H. Використовували у експериментах ChIP.
Набір праймерів 5	MDL1ORF1F MDL1ORF1R Амплікон E, фіг. 1b	ACCTGAAAGTGACGGGGAGA CCTGCCTTGCTAGATTGGGG	BP31 LINE-1, положення 1395-1414, смислова орієнтація ² . BP31 LINE-1, положення 1508-1527, антисмислова орієнтація ² . Використовували у експериментах 3Т-кПЛР для оцінки експресії РНК L1H. Використовували у експериментах ChIP.
Набір праймерів 6	ORF2F ORF2R Зонд ORF2 Амплікон F, фіг. 1b	CAAACACCGCATATTCTCACTC A CTTCCTGTGTCCATGTGATCTC A AGGTGGGAATTGAAC-VIC	BP32 LINE-1, положення 5731-5753, смислова орієнтація ² . BP32 LINE-1, положення 5772-5794, антисмислова орієнтація ² . Зонд для експериментів TaqMan. ORF2F та ORF2R використовували у експериментах 3Т-кПЛР SYBR Green для оцінки експресії РНК L1H, та разом з зондом ORF2 використовували у експериментах кПЛР TaqMan на геномній ДНК, щоб визначити відносне число копій елементів L1H. Праймери розробили та перевірили, як описано ³ .

Набір прайме рів 7	5SF 5SR 5S зонд	CTCGTCTGATCTCGGAAGCTA AG GCGGTCTCCCATCCAAGTAC AGGGTCGGGCCTGG-6FAM	Ген рибосомної 5S РНК, смислова орієнтація. Ген рибосомної 5S РНК, антисмислова орієнтація. Зонд для експериментів TaqMan. Використовували для внутрішнього нормування, разом з набором праймерів 3, у експериментах кПЛР TaqMan на геномній ДНК, щоб визначити відносне число копій елементів L1H. Праймери розробили та перевірили, як описано3.
Набір прайме рів 8	GAPDHF W GAPDHRV	TTGAGGTCAATGAAGGGGTC GAAGGTGAAGGTCTGGAGTCA	GAPDH, смислова орієнтація. GAPDH, антисмислова орієнтація. Використовували для 3Т-кПЛР мРНК гену GAPDH (NM_001256799). Праймери захоплюють інтрон. Використовували у якості внутрішнього нормалізатору у експериментах щодо експресії генів.
Набір прайме рів 9	GAPDHINT4F GAPDHINT4R	CCAGGAGTGAGTGGAAGACA G CTAGTTGCCTCCCCAAAGCA	Інтрон 4 GAPDH, смислова орієнтація. Інтрон 4 GAPDH, антисмислова орієнтація. Використовували у якості негативного контролю у експериментах ChIP.
Набір прайме рів 10	ACP1IFNAFW ACP1IFNARV1 ACP1IFNARV2	TTGATGGCAACCAGTTCCAG TCATCCCAAGCAGCAGATGA TGTTCCCAAGCAGCAGATGA	Консенсус інтерферону альфа, смислова орієнтація. Консенсус інтерферону альфа, антисмислова орієнтація. Консенсус інтерферону альфа, антисмислова орієнтація. Використовували у експериментах 3Т-кПЛР для оцінки сукупної експресії генів інтерферону альфа людини. Усі 3 праймери використовували у одній реакції.
Набір прайме рів 11	MDIFNB1FW MDIFNB1RV	ACGCCGCATTGACCATCTAT GTCTCATTCCAGCCAGTGCT	IFNB1, смислова орієнтація. IFNB1, антисмислова орієнтація. Використовували для 3Т-кПЛР мРНК гену IFNB1 (NM_002176).
Набір прайме рів 12	MDHSRB1AF MDHSRB1AR	ACTCTCACCTCCCATGTTGC ATCCGTGCACTCCTGTTCTG	RB1, смислова орієнтація. RB1, антисмислова орієнтація. Використовували для 3Т-кПЛР мРНК гену RB1 (NM_000321). Праймери захоплюють інтрон.
Набір прайме рів 13	MDHSP107AF MDHSP107AR	CCAAGAAGCGCTCTGCTGTA GCAGGGGATTCTGCATCACTA	RBL1, смислова орієнтація. RBL1, антисмислова орієнтація. Використовували для 3Т-кПЛР мРНК гену RBL1 (NM_0028955). Праймери захоплюють інтрон.
Набір прайме рів 14	MDHSP130F MDHSP130R	AGTCGCCCCACCCCTCAGAT TTCCCTCCAGCGTGTAGCTT	RBL2, смислова орієнтація. RBL2, антисмислова орієнтація. Використовували для 3Т-кПЛР мРНК гену RBL2 (NM_005611). Праймери захоплюють інтрон.
Набір прайме рів 15	MDTREX1CDS F MDTREX1CDS R	TCCCCTTCGGATCTTAACAC CGAAAAAGATGAGGGTCTGC	TREX1, смислова орієнтація. TREX1, антисмислова орієнтація. Використовували для 3Т-кПЛР мРНК гену TREX1 (NM_007248). Праймери

			захоплюють інтрон.
Набір прайме рів 16	MDHSFOXA1F MDHSFOXA1R	GGAAGACCGGCCAGCTAGAG TGAAGGAGTAGTGGGGGTCC	FOXA1, смислова орієнтація. FOXA1, антисмислова орієнтація. Використовували для 3Т-кПЛР мРНК гену FOXA1 (NM_004496). Праймери захоплюють інтрон.
Набір прайме рів 17	JJMMP1FW JJMMP1RV	AGCCTTCCAACCTCTGGAGTAA TGT CCGATGATCTCCCCTGACAA	MMP1, смислова орієнтація. MMP1, антисмислова орієнтація. Використовували для 3Т-кПЛР мРНК гену MMP1 (NM_001145938). Праймери захоплюють інтрон.
Набір прайме рів 18	JJMMP3FW JJMMP3RV	CCCACCTTACATACAGGATTG TGA CCCAGACTTTCAGAGCTTTCT CA	MMP3, смислова орієнтація. MMP3, антисмислова орієнтація. Використовували для 3Т-кПЛР мРНК гену MMP3 (NM_002422). Праймери захоплюють інтрон.
Набір прайме рів 19	JJIL6FW JJIL6RV	CACTGGCAGAAAACAACCTGA A ACCAGGCAAGTCTCCTCATTG A	IL6, смислова орієнтація. IL6, антисмислова орієнтація. Використовували для 3Т-кПЛР мРНК гену IL6 (NM_000600). Праймери захоплюють інтрон.
Набір прайме рів 20	JJIL8FW JJIL8RV	GTTTTTGAAGAGGGCTGAGAA TTC CCCTACAACAGACCCACACAA TAC	CXCL8 (IL8), смислова орієнтація. CXCL8 (IL8), антисмислова орієнтація. Використовували для 3Т-кПЛР мРНК гену CXCL8 (NM_000584). Праймери захоплюють інтрон.
Набір прайме рів 21	JJCCL2FW JJCCL2RV	AAGACCATTGTGGCCAAGGA TTCGGAGTTTGGGTTTGCT	CCL2, смислова орієнтація. CCL2, антисмислова орієнтація. Використовували для 3Т-кПЛР мРНК гену CCL2 (NM_002982). Праймери захоплюють інтрон.
Набір прайме рів 22	JJCXCL2FW JJCXCL2RV	AGAATGGGCAGAAAGCTTGTCT T CCTTCTGGTCAGTTGGATTG C	CXCL2, смислова орієнтація. CXCL2, антисмислова орієнтація. Використовували для 3Т-кПЛР мРНК гену CXCL2 (NM_002089). Праймери захоплюють інтрон.
Набір прайме рів 23	IL1BETA FW IL1BETA RV	CGCCAGTGAAATGATGGCTTA T CTGGAAGGAGCACTTCATCTG T	IL-1 β , смислова орієнтація. IL-1 β , антисмислова орієнтація. Використовували для 3Т-кПЛР мРНК гену IL1B (NM_000576). Праймери захоплюють інтрон.
Набір прайме рів 24	MDIRF9FW MDIRF9RV	CAACTGAGGCCCCCTTTCAA CGCCCGTTGTAGATGAAGGT	IRF9, смислова орієнтація. IRF9, антисмислова орієнтація. Використовували для 3Т-кПЛР мРНК гену IRF9 (NM_006084). Праймери захоплюють інтрон.
Набір прайме рів 25	MDIRF7FW MDIRF7RV	GGCTGGAAAACCAACTTCCG GTTATCCCGCAGCATCACGA	IRF7, смислова орієнтація. IRF7, антисмислова орієнтація. Використовували для 3Т-кПЛР мРНК гену IRF7 (NM_001572). Праймери захоплюють інтрон.
Набір прайме рів 26	MDHSOAS1AF MDHSOAS1AR	TGGAGACCCAAAGGGTTGGA AGGAAGCAGGAGGTCTCACC	OAS1, смислова орієнтація. OAS1, антисмислова орієнтація. Використовували для 3Т-кПЛР мРНК гену OAS1 (NM_016816). Праймери захоплюють інтрон.
Набір прайме рів 27	HSCGASFW HSCGASRV	ACGTGCTGTGAAAACAAAGAA G GTCCCACTGACTGTCTTGAGG	cGAS, смислова орієнтація. cGAS, антисмислова орієнтація. Використовували для 3Т-кПЛР мРНК

			гену MB21D1 (NM_138441). Праймери захоплюють інтрон
Набір праймерів 28	HSSTING1FW HSSTING1RV	ATATCTGCGGCTGATCCTGC GGTCTGCTGGGGCAGTTTAT	STING, смислова орієнтація. STING, антисмислова орієнтація. Використовували для 3Т-кПЛР мРНК гену TMEM173 (NM_198282). Праймери захоплюють інтрон
Набір праймерів 29	TICDKN1AFW TICDKN1ARV	GAGACTCTCAGGGTCGAAAAC G TTCCTGTGGGCGGATTAGG	CDKN1A, смислова орієнтація. CDKN1A, антисмислова орієнтація. Використовували для 3Т-кПЛР мРНК гену CDKN1A (NM_000389). Праймери захоплюють інтрон
Набір праймерів 30	TICDKN2AFW TICDKN2ARV	CGGAAGGTCCCTCAGACATC CCCTGTAGGACCTTCGGTGA	CDKN2A (p16), смислова орієнтація. CDKN2A (p16), антисмислова орієнтація. Використовували для 3Т-кПЛР мРНК гену CDKN2A (NM_000077). Праймери захоплюють інтрон
Набір праймерів 31	MGAPDHF MGAPDHR	CGGCCGCATCTTCTTG GTGACCAGGCGCCCAATA	Gapdh, смислова орієнтація. Gapdh, антисмислова орієнтація. Використовували для 3Т-кПЛР мРНК гена GAPDH (NM_008084.3). Праймери захоплюють інтрон. Використовували у якості внутрішнього нормалізатору у експериментах щодо експресії генів.
Набір праймерів 32	MMHSP90AB1 F MMHSP90AB1 R	CCACCACCCTGCTCTGTA CTA CCTCTCCATGGTGC ACTTCC	Hsp90ab1, смислова орієнтація. Hsp90ab1, антисмислова орієнтація. Використовували для 3Т-кПЛР мРНК гену Hsp90ab1 (NM_008302). Праймери захоплюють інтрон. Використовували у якості другого нормалізатору у експериментах щодо експресії генів.
Набір праймерів 33	MMGUSBFW MMGUSBRV	CGTGACCTTTGTGAGCAAC G CTGCTCCATACTCGCTCTGG	Gusb, смислова орієнтація. Gusb, антисмислова орієнтація. Використовували для 3Т-кПЛР мРНК гена Gusb (NM_010368). Праймери захоплюють інтрон. Використовували у якості другого нормалізатору у експериментах щодо експресії генів.
Набір праймерів 34	GBCONIFNAF GBCONIFNAR	TCTGATGCAGCAGGTGGG AGGGCTCTCCAGACTTCTGCT CTG	Консенсус інтерферону альфа, смислова орієнтація. Консенсус інтерферону альфа, антисмислова орієнтація. Використовували у експериментах 3Т-кПЛР для оцінки сукупної експресії генів інтерферону альфа миші. Праймери розробили та перевірили, як описано ⁴ .
Набір праймерів 35	GBIRF7FW GBIRF7RV	CTCCTGAGCGCAGCCTTG GTTCTTACTGCTGGGGCCAT	Irf7, смислова орієнтація. Irf7, антисмислова орієнтація. Використовували для 3Т-кПЛР мРНК гену Irf7 (NM_016850). Праймери захоплюють інтрон.
Набір праймерів 36	MMOAS1BF MMOAS1BR	TCTGCTTTATGGGGCTTCGG TCGACTCCATACTCCCAGG	Oas1, смислова орієнтація. Oas1, антисмислова орієнтація. Використовували для 3Т-кПЛР мРНК гена Irf9 (NM_001083925). Праймери захоплюють інтрон.

Набір праймерів 37	JKLINE1FW JKLINE1RV Амплікон W, додат. дані, фіг. 6f.	CTGCCTTGCAAGAAGAGAGC AGTGCTGCGTTCTGATGATG	5'-НТО LINE-1 миші, положення 392-412, смислова орієнтація. 5'-НТО LINE-1 миші, 596-616, антисмислова орієнтація. Використовували у експериментах ЗТ-кПЛР для оцінки експресії РНК L1 миші.
Набір праймерів 38	P16MouseF P16MouseR	CCAGGGCCGTGTGCAT TACGTGAACGTTGCCCATCA	Cdkn2a, смислова орієнтація. Cdkn2a, антисмислова орієнтація. Використовували для ЗТ-кПЛР мРНК гену Cdkn2a (NM_009877). Праймери захоплюють інтрон.
Набір праймерів 39	GBMMP3FW GBMMP3RV	GACTCAAGGGTGGATGCTGT CCAACTGCGAAGATCCACTG	Mmp3, смислова орієнтація. Mmp3, антисмислова орієнтація. Використовували для ЗТ-кПЛР мРНК гену Mmp3 (NM_0108209). Праймери захоплюють інтрон.
Набір праймерів 40	GBIL6FW GBIL6RV	CGGAGAGGAGACTTCACAGAG GA TTTCCACGATTTCCCAGAGAA CA	Il-6, смислова орієнтація. Il-6, антисмислова орієнтація. Використовували для ЗТ-кПЛР мРНК гену Il6 (NM_031168). Праймери захоплюють інтрон.
Набір праймерів 41	MMPAI1FW MMPAI1RV	GGAAGGGCAACATGACCAGG AGCTGCTCTTGGTCGGAAG	Pai1, смислова орієнтація. Pai1, антисмислова орієнтація. Використовували для ЗТ-кПЛР мРНК гену Pai1 (NM_008871). Праймери захоплюють інтрон.
Набір праймерів 42	APACACAF APACACAR	CTGGCTGCATCCATTATGTCA TGGTAGACTGCCCCGTGTGAA	Asasa, смислова орієнтація. Asasa, антисмислова орієнтація. Використовували для ЗТ-кПЛР мРНК гену Asasa (NM_133360). Праймери захоплюють інтрон.
Набір праймерів 43	APFASNF APFASNR	CTGCGTGGCTATGATTATGG AGGTTGCTGTCTGTCTAGT	Fasn, смислова орієнтація. Fasn, антисмислова орієнтація. Використовували для ЗТ-кПЛР мРНК гену Fasn (NM_007988). Праймери захоплюють інтрон.
Набір праймерів 44	APSREBF1F APSREBF1R	ACTTTTCCTTAACGTGGGCCT CATCTCGGCCAGTGTCTGTT	Srebf1, смислова орієнтація. Srebf1, антисмислова орієнтація. Використовували для ЗТ-кПЛР мРНК гену Srebf1 (NM_011480). Праймери захоплюють інтрон.
Набір праймерів 45	APCEBPAF APCEBPAR	TTCGGGTCGCTGGATCTCTA TCAAGGAGAAACCACCACGG	C/EBPα, смислова орієнтація. C/EBPα, антисмислова орієнтація. Використовували для ЗТ-кПЛР мРНК гену C/EBPα (NM_007678).
Набір праймерів 46	APACACBF APACACBR	AGAAGCGAGCACTGCAAGGTT G GGAAGATGGACTCCACCTGGT T	Asacb, смислова орієнтація. Asacb, антисмислова орієнтація. Використовували для ЗТ-кПЛР мРНК гену Asacb (NM_133904). Праймери захоплюють інтрон.
Набір праймерів 47	APPPARGF APPPARGR	TTCGCTGATGCACTGCCTAT GGAATGCGAGTGGTCTTCCA	Pparg, смислова орієнтація. Pparg, антисмислова орієнтація. Використовували для ЗТ-кПЛР мРНК гену Pparg (NM_011146). Праймери захоплюють інтрон.
Набір праймерів 48	MDMML1ORF1 FMDMML1ORF 1Амплікон X, додат. дані,	ATCTGTCTCCCAGGTCTGCT TCCTCCGTTTACCTTTGCGC	BP31 LINE-1 миші, положення 1341-1360, смислова орієнтація. BP31 LINE-1 миші, положення 1460-1441, антисмислова орієнтація.

	фіг. 6f.		Використовували у експериментах 3Т-кПЛР для оцінки експресії РНК L1 миші.
Набір праймерів 49	MDMML1ORF2 FMDMML1ORF2 Рамплікон Y, додат. дані, фіг. 6f.	GCTTCGGTGAAGTAGCTGGA TTCGTTAGAGTCACGCCGAG	BP32 LINE-1 миші, положення 4786-4805, смислова орієнтація. BP32 LINE-1 миші, положення 4939-4920, антисмислова орієнтація. Використовували у експериментах 3Т-кПЛР для оцінки експресії РНК L1 миші.
Набір праймерів 50	MDMML13UTR FMDMML13UTR Рамплікон Z, додат. дані, фіг. 6f.	AGCCAAATGGATGGACCTGG AAGGAGGGGCATAGTGTTCCA	3'-НТО LINE-1 миші, положення 6344-6363, смислова орієнтація. 3'-НТО LINE-1 миші, положення 6538-6519, антисмислова орієнтація. Використовували у експериментах 3Т-кПЛР для оцінки експресії РНК L1 миші.
Набір праймерів 51	MDMML1TFF MDMML1TFR	ATCCGGACCCAGAGGACAGG ATGGCGACCGCTGCTG	5'-НТО LINE-1 миші, смислова орієнтація. 5'-НТО LINE-1 миші, антисмислова орієнтація. Праймери ампліфікують один з поліморфізмів сімейств L1Tf(I-III).
Набір праймерів 52	MDMML1MDNF MDMML1MDNR	AGAGAACCGGACCCAATCCA GCTTGTGCCCCCTACTCAGAC	5'-НТО LINE-1 миші, смислова орієнтація. 5'-НТО LINE-1 миші, антисмислова орієнтація. Праймери ампліфікують один з поліморфізмів сімейств L1MdN(I).
Набір праймерів 53	MDMML1MDAF MDMML1MDAF	TCCCCACGGGATCCTAAGAC CTCTGCAGGCAAGCTCTCTT	5'-НТО LINE-1 миші, смислова орієнтація. 5'-НТО LINE-1 миші, антисмислова орієнтація. Праймери ампліфікують один з поліморфізмів сімейств L1MdA(IV-VII).

¹ Усі послідовності приведені у орієнтації 5'→3'. Набори праймерів 1-30 специфічні для перерахованих генів людини; набори праймерів 31-53 специфічні для миші.

² Усі положення LINE-1 зазначені відносно консенсусної послідовності L1Hs (Repbase, <http://www.girinst.org/repbase/>).

³ Див. Coufal, N.G. та інш. L1 retrotransposition in human neural progenitor cells. Nature 460, 1127-31 (2009).

⁴ Див. Gautier, G. та інш. A type I interferon autocrine-paracrine loop is involved in Toll-like receptor-induced interleukin-12p70 secretion by dendritic cells. J. Exp. Med. 201, 1435-46 (2005).

Таблиця 2

Перелік антитіл

Антитіло	Вид походження антитіла	Постачальник	Номер у каталозі	Застосування
GAPDH	Кролик	Cell Signaling	5174	Контроль завантаження при імуноблоттингу
GAPDH	Миша	Sigma	G8795	Контроль завантаження при імуноблоттингу
p16	Миша	Santa Cruz	sc-756	Імуноблоттинг
p16	Миша	Santa Cruz	sc-56330 (JC8)	Імунофлуоресценція
P21	Кролик	Santa Cruz	sc-397	Імуноблоттинг
RB1	Миша	BD Biosciences	554136	Імуноблоттинг, ChIP
TREX1	Кролик	Cell Signaling	12215	Імуноблоттинг
FOXA1	Кролик	Abcam	ab170933	Імуноблоттинг
FOXA1	Коза	Abcam	ab5089	ChIP
Фосфо-STAT1 (Tyr701)	Миша	Santa Cruz	SC-8394	Імунофлуоресценція
Фосфо-STAT2 (Tyr689)	Миша	Millipore	07-224	Імунофлуоресценція
STAT2	Кролик	Cell Signaling	4594S	Імуноблоттинг
IRF7	Кролик	Abcam	ab109255	Імуноблоттинг
IRF9	Кролик	Novus Bio	NBP2-16991	Імунофлуоресценція
BrdU	Миша	BD Biosciences	555627	Імунофлуоресценція
γ-H2AX	Миша	Millipore	05-636	Імунофлуоресценція
F4/80	Цур	Abcam	ab6640 (Cl:A3-1)	Імунофлуоресценція
олДНК	Миша	Enzo	MAb F7-26	Імунофлуоресценція
Гібриди ДНК-РНК	Миша	Kerafast	ENH001 (S9.6)	Імунофлуоресценція
Ламін B1	Коза	Santa Cruz	Sc-6216 (C-20)	Імунофлуоресценція
IL-6	Кролик	Cell Signaling	12912	Імунофлуоресценція
BP31 LINE-1 людини	Кролик	Подарунок від К.Н. Bums, Johns Hopkins ¹		Імунофлуоресценція
BP31 LINE-1 миші	Кролик	J.D. Boeke, abEA02 (RabMAb, клон NYU-2-1_2		Імунофлуоресценція

¹ Див. Rodic, N. Та інш. Long interspersed element-1 protein expression is a hallmark of many human cancers. Am. J. Pathol. 184, 1280-6 (2014).

Таблиця 3

Перелік експресованих елементів L1, ідентифікованих за допомогою ЗТ-ПЛР довгих фрагментів

Ідентифікатор	Хромосома	Координати (довжина елемента)	Сімейство	Кількість	Інтактний
L1-07	chr14	63115693-63121722 (6029 п.о.)	L1HS	16	Так
L1-09	chrX	11934270-11940496 (6226 п.о.)	L1HS	10	Так
L1-13	chr17	66596080-66602096 (6016 п.о.)	L1HS	9	Так
L1-20	chr14	70546288-70552339 (6051 п.о.)	L1HS	6	Так
L1-24	chr7	49679257-49685289 (6032 п.о.)	L1HS	5	Так
L1-25	chr4	21158389-21164420 (6031 п.о.)	L1HS	5	Так
L1-54	chr17	9614984-9621024 (6040 п.о.)	L1HS	3	Так
L1-55	chrX	155515003-155521032 (6029 п.о.)	L1HS	2125	Так
L1-58	chrX	47782657-47788686 (6029 п.о.)	L1HS	2125	Так
L1-59	chr1	118851349-118857375 (6026 п.о.)	L1HS	2125	Так
L1-62	chr16	9583477-9589517 (6040 п.о.)	L1HS	2125	Так
L1-76	chr2	166987450-166993486 (6036 п.о.)	L1HS	2	Так
L1-85	chr8	128451975-128458006 (6031 п.о.)	L1HS	18	Так
L1-116	chr5	104517585-104523614 (6029 п.о.)	L1HS	1	Так
L1-143	chr1	180865798-180871853 (6055 п.о.)	L1HS	1	Так
L1-171	chr10	98781926-98787958 (6032 п.о.)	L1HS	08	Так
L1-172	chr6	2416758-2422787 (6029 п.о.)	L1HS	08	Так
L1-180	chr3	159094350-159100395 (6045 п.о.)	L1HS	1	Так
L1-218	chr15	70728652-70734159 (5507 п.о.)	L1HS	1	Так
Сума: інтактний L1HS Кількість: 71,9 Окремі елементи: 19					
L1-06	chr7	70193829-70199858 (6029 п.о.)	L1HS	18	
L1-08	chr4	87346624-87352647 (6023 п.о.)	L1HS	11	
L1-17	chr4	78346978-78353011 (6033 п.о.)	L1HS	7	
L1-23	chr18	13975361-13980770 (5409 п.о.)	L1HS	5	
L1-31	chr9	110787598 – 110793630 (6032 п.о.)	L1HS	4	
L1-35	chr1	196218871 – 196224903 (6032 п.о.)	L1HS	4	
L1-37	chr3	103555522 – 103561554 (6032 п.о.)	L1HS	4	
L1-38	chr12	3498696-3504729 (6033 п.о.)	L1HS	4	
L1-40	chr16	65686512-65692528 (6016 п.о.)	L1HS	4	
L1-41	chrX	50018977-50025006 (6029 п.о.)	L1HS	4	
L1-45	chr4	136292503 – 136298555 (6052 п.о.)	L1HS	4	
L1-50	chr3	26397518-26403541 (6023 п.о.)	L1HS	3	
L1-56	chr20	23422609-23428641 (6032 п.о.)	L1HS	2125	
L1-57	chr1	125119462 – 125125488 (6026 п.о.)	L1HS	2125	
L1-60	chr20	11629280-11635312 (6032 п.о.)	L1HS	2125	
L1-61	chr13	76612324-76618354 (6030 п.о.)	L1HS	2125	
L1-64	chr2	86660186-86666388 (6202 п.о.)	L1HS	2	
L1-72	chr3	132945507 – 132951535 (6028 п.о.)	L1HS	2	
L1-80	chr5	166966282 – 166972316 (6034 п.о.)	L1HS	2	
L1-81	chr4	19077399-19083430 (6031 п.о.)	L1HS	2	
L1-86	chr7	96846151-96852181 (6030 п.о.)	L1HS	18	
L1-87	chr2	230336570 – 230342014 (5444 п.о.)	L1HS	18	
L1-88	chr4	135177641 – 135183248 (5607 п.о.)	L1HS	18	
L1-89	chr4	52534972-52540999 (6027 п.о.)	L1HS	18	
L1-90	chr5	81612591-81618619 (6028 п.о.)	L1HS	2	
L1-91	chr8	128890989-128897136(6147 п.о.)	L1HS	2	
L1-96	chr11	87339532-87345562 (6030 п.о.)	L1HS	2	
L1-97	chr5	177771244 – 177777273 (6029 п.о.)	L1HS	2	
L1-98	chr5	166140692 – 166146724 (6032 п.о.)	L1HS	2	
L1-100	chr4	62726449-62732470 (6021 п.о.)	L1HS	1	

L1-103	chr1	80942648-80948701 (6053 п.о.)	L1HS	1	
L1-114	chr10	105775021 – 105781052 (6031 п.о.)	L1HS	1	
L1-115	chr5	34144346-34150370 (6024 п.о.)	L1HS	1	
L1-133	chr7	113530583 – 113536613 (6030 п.о.)	L1HS	1	
L1-135	chr1	180330072 – 180336104 (6032 п.о.)	L1HS	1	
L1-136	chr1	118634254 – 118640283 (6029 п.о.)	L1HS	1	
L1-137	chrX	54117700-54123731 (6031 п.о.)	L1HS	1	
L1-138	chrX	147650235 – 147656268 (6033 п.о.)	L1HS	1	
L1-142	chr1	187217153 – 187223183 (6030 п.о.)	L1HS	1	
L1-144	chr12	69772911-69778942 (6031 п.о.)	L1HS	1	
L1-149	chr1	239622999 – 239629024 (6025 п.о.)	L1HS	1	
L1-150	chr1	146716693 – 146722719 (6026 п.о.)	L1HS	1	
L1-157	chr3	19495494-19501518 (6024 п.о.)	L1HS	1	
L1-169	chr5	58383173-58389205 (6032 п.о.)	L1HS	08	
L1-170	chr6	19761393-19767419 (6026 п.о.)	L1HS	08	
L1-173	chr2	36112007-36118038 (6031 п.о.)	L1HS	08	
L1-179	chr6	112700246 – 112706279 (6033 п.о.)	L1HS	1	
L1-181	chr3	108745901 – 108751932 (6031 п.о.)	L1HS	1	
L1-182	chr4	15838047-15844384 (6337 п.о.)	L1HS	1	
L1-184	chr8	135872363 – 135878417 (6054 п.о.)	L1HS	1	
L1-187	chr13	58673408-58679295 (5887 п.о.)	L1HS	1	
L1-194	chr1	85745020-85749612 (4592 п.о.)	L1HS	1	
L1-196	chr15	82882394-82888420 (6026 п.о.)	L1HS	1	
L1-197	chr15	51416717-51422747 (6030 п.о.)	L1HS	1	
L1-199	chr2	4730230-4736261 (6031 п.о.)	L1HS	1	
L1-212	chr3	54393823-54400093 (6270 п.о.)	L1HS	1	
Сума: неінтактний L1HS Кількість: 132,1 Окремі елементи: 56					
L1-05	chr3	141764155 – 141770160 (6005 п.о.)	L1PA2	24	
L1-10	chr4	164097249 – 164103279 (6030 п.о.)	L1PA2	9	
L1-12	chr17	61106730-61112789 (6059 п.о.)	L1PA2	9	
L1-18	chr22	11955882-11962029 (6147 п.о.)	L1PA2	6	
L1-22	chr12	67896709-67902725 (6016 п.о.)	L1PA2	5	
L1-27	chr3	175781211 – 175786413 (5202 п.о.)	L1PA2	5	
L1-30	chr13	73637028-73643060 (6032 п.о.)	L1PA2	5	
L1-33	chr4	98316999-98322499 (5500 п.о.)	L1PA2	4	
L1-34	chr3	178856449 – 178862480 (6031 п.о.)	L1PA2	4	
L1-39	chr1	169251062 – 169257094 (6032 п.о.)	L1PA2	4	
L1-42	chr3	119000971 – 119006991 (6020 п.о.)	L1PA2	4	
L1-53	chr5	106424883 – 106430882 (5999 п.о.)	L1PA2	3	
L1-66	chr14	86095435-86101470 (6035 п.о.)	L1PA2	2	
L1-73	chr4	65992800-65998803 (6003 п.о.)	L1PA2	2	
L1-74	chr10	99149238-99155259 (6021 п.о.)	L1PA2	2	
L1-75	chr1	72826947-72833271 (6324 п.о.)	L1PA2	2	
L1-77	chr7	32461029-32467034 (6005 п.о.)	L1PA2	2	
L1-83	chr3	67082246-67088304 (6058 п.о.)	L1PA2	2	
L1-101	chr12	102826678 – 102832665 (5987 п.о.)	L1PA2	1	
L1-105	chr20	25326450-25331184 (4734 п.о.)	L1PA2	1	
L1-107	chr13	50978555-50984571 (6016 п.о.)	L1PA2	1	
L1-108	chr4	102204431 – 102210459 (6028 п.о.)	L1PA2	1	
L1-111	chrX	113084049 – 113090072 (6023 п.о.)	L1PA2	1	
L1-118	chr21	9333222-9339374 (6152 п.о.)	L1PA2	1	
L1-123	chr2	129037643 – 129043675 (6032 п.о.)	L1PA2	1	
L1-125	chr5	85454310-85460328 (6018 п.о.)	L1PA2	1	
L1-128	chr5	4611929-4617955 (6026 п.о.)	L1PA2	1	
L1-130	chr16	48768072-48774104 (6032 п.о.)	L1PA2	1	
L1-131	chr6	162989238 – 162995263 (6025 п.о.)	L1PA2	1	
L1-132	chr8	68358979-68364479 (5500 п.о.)	L1PA2	1	
L1-134	chr5	65160518-65166549 (6031 п.о.)	L1PA2	1	

L1-140	chr4	119273614 – 119279671 (6057 п.о.)	L1PA2	1	
L1-145	chr3	24088959-24094992 (6033 п.о.)	L1PA2	1	
L1-151	chr12	108993448 – 108999474 (6026 п.о.)	L1PA2	1	
L1-164	chr17	41200368-41206401 (6033 п.о.)	L1PA2	1	
L1-167	chr3	118910744 – 118916772 (6028 п.о.)	L1PA2	1	
L1-175	chr2	197687033 – 197693062 (6029 п.о.)	L1PA2	1	
L1-177	chrX	154935536 – 154941561 (6025 п.о.)	L1PA2	1	
L1-186	chr6	83797243-83803271 (6028 п.о.)	L1PA2	1	
L1-188	chr8	87621331-87626401 (5070 п.о.)	L1PA2	1	
L1-189	chr11	100649611 – 100655672 (6061 п.о.)	L1PA2	1	
L1-198	chr15	54904988-54911051 (6063 п.о.)	L1PA2	1	
L1-202	chr2	153781069 – 153787086 (6017 п.о.)	L1PA2	1	
L1-209	chr1	85923568-85927951 (4383 п.о.)	L1PA2	1	
L1-211	chr2	156251019 – 156257086 (6067 п.о.)	L1PA2	1	
L1-215	chr4	132940946 – 132946970 (6024 п.о.)	L1PA2	1	
L1-221	chrX	50056644-50062676 (6032 п.о.)	L1PA2	1	
L1-223	chrX	113337323 – 113343354 (6031 п.о.)	L1PA2	1	
Сума: L1PA2 Кількість: 124 Окремі елементи: 48					
L1-03	chr19	42768603-42774543 (5940 п.о.)	L1PA3	31	
L1-04	chr8	55046402-55052502 (6100 п.о.)	L1PA3	28	
L1-11	chr12	118657390 – 118663531 (6141 п.о.)	L1PA3	9	
L1-15	chr1	176307883 – 176313876 (5993 п.о.)	L1PA3	7	
L1-19	chr4	175016241 – 175022252 (6011 п.о.)	L1PA3	6	
L1-26	chr18	49212269-49218417 (6148 п.о.)	L1PA3	5	
L1-29	chr11	22646426-22652446 (6020 п.о.)	L1PA3	5	
L1-36	chr2	22980654-22984410 (3756 п.о.)	L1PA3	4	
L1-44	chr10	109602039-109607567(5528 п.о.)	L1PA3	4	
L1-46	chr7	63728965-63735094 (6129 п.о.)	L1PA3	4	
L1-48	chr14	38631448-38637485 (6037 п.о.)	L1PA3	4	
L1-49	chr19	42743461-42749399 (5938 п.о.)	L1PA3	4	
L1-52	chr4	123632778 – 123638935 (6157 п.о.)	L1PA3	3	
L1-65	chr2	96375482-96381632 (6150 п.о.)	L1PA3	2	
L1-69	chr1	100662482 – 100668126 (5644 п.о.)	L1PA3	2	
L1-70	chr5	25077154-25083186 (6032 п.о.)	L1PA3	2	
L1-78	chr12	78502931-78509088 (6157 п.о.)	L1PA3	2	
L1-82	chr6	80844240-80850277 (6037 п.о.)	L1PA3	2	
L1-84	chr8	69015505-69021651 (6146 п.о.)	L1PA3	2	
L1-94	chr4	88916060-88922204 (6144 п.о.)	L1PA3	2	
L1-104	chr4	142249845 – 142255868 (6023 п.о.)	L1PA3	1	
L1-110	chr3	24276690-24282186 (5496 п.о.)	L1PA3	1	
L1-113	chr4	119061402 – 119067563 (6161 п.о.)	L1PA3	1	
L1-117	chr12	10343959-10349500 (5541 п.о.)	L1PA3	1	
L1-121	chr3	112658647 – 112664665 (6018 п.о.)	L1PA3	1	
L1-124	chr9	68274827-68280864 (6037 п.о.)	L1PA3	1	
L1-126	chr5	75792130-75798187 (6057 п.о.)	L1PA3	1	
L1-139	chr11	31540511-31546645 (6134 п.о.)	L1PA3	1	
L1-141	chr3	145924279 – 145930431 (6152 п.о.)	L1PA3	1	
L1-147	chr8	91887863-91893862 (5999 п.о.)	L1PA3	1	
L1-148	chrX	94858876-94864901 (6025 п.о.)	L1PA3	1	
L1-152	chr18	55886913-55892940 (6027 п.о.)	L1PA3	1	
L1-154	chr9	125006549 – 125012715 (6166 п.о.)	L1PA3	1	
L1-156	chr6	71826216-71832235 (6019 п.о.)	L1PA3	1	
L1-158	chr8	91191345-91197369 (6024 п.о.)	L1PA3	1	
L1-159	chr12	55586438-55592480 (6042 п.о.)	L1PA3	1	
L1-165	chr2	97521921-97528067 (6146 п.о.)	L1PA3	1	
L1-166	chr6	126670052 – 126676070 (6018 п.о.)	L1PA3	1	
L1-174	chr12	80143556-80149577 (6021 п.о.)	L1PA3	1	
L1-176	chr12	51562132-51568340 (6208 п.о.)	L1PA3	1	

L1-178	chr9	17536062-17542081 (6019 п.о.)	L1PA3	1	
L1-183	chr12	80074170-80080329 (6159 п.о.)	L1PA3	1	
L1-185	chr6	48733849-48740059 (6210 п.о.)	L1PA3	1	
L1-190	chr4	82171911-82177138 (5227 п.о.)	L1PA3	1	
L1-191	chr15	32045176-32051279 (6103 п.о.)	L1PA3	1	
L1-192	chr17	71351460-71357401 (5941 п.о.)	L1PA3	1	
L1-193	chr5	99339116-99345270 (6154 п.о.)	L1PA3	1	
L1-195	chr5	122509114 – 122515140 (6026 п.о.)	L1PA3	1	
L1-200	chr10	35855169-35861196 (6027 п.о.)	L1PA3	1	
L1-201	chr12	31159575-31165595 (6020 п.о.)	L1PA3	1	
L1-203	chr14	37766297-37772332 (6035 п.о.)	L1PA3	1	
L1-206	chr14	56013511-56019543 (6032 п.о.)	L1PA3	1	
L1-210	chr2	95866030-95872191 (6161 п.о.)	L1PA3	1	
L1-214	chr4	94835259-94841286 (6027 п.о.)	L1PA3	1	
L1-217	chr7	84049212-84055231 (6019 п.о.)	L1PA3	1	
L1-219	chr16	12069684-12075804 (6120 п.о.)	L1PA3	1	
L1-222	chrX	55680654-55686684 (6030 п.о.)	L1PA3	1	
L1-224	chrX	149432338 – 149438331 (5993 п.о.)	L1PA3	1	
Сума: L1PA3 Кількість: 166 Окремі елементи: 58					
L1-01	chr18	9165216-9171138 (5922 п.о.)	L1PA4	46	
L1-14	chr3	29978961-29984962 (6001 п.о.)	L1PA4	7	
L1-16	chr6	83330453-83336586 (6133 п.о.)	L1PA4	7	
L1-21	chr6	139217130 – 139223263 (6133 п.о.)	L1PA4	6	
L1-28	chr8	49874774-49880758 (5984 п.о.)	L1PA4	5	
L1-32	chr5	176077678 – 176083819 (6141 п.о.)	L1PA4	4	
L1-43	chr5	33095404-33101548 (6144 п.о.)	L1PA4	4	
L1-47	chr4	48864081-48870233 (6152 п.о.)	L1PA4	4	
L1-51	chr5	130779991 – 130786158 (6167 п.о.)	L1PA4	3	
L1-63	chr6	7942696-7948800 (6104 п.о.)	L1PA4	2	
L1-71	chr7	56505920-56512049 (6129 п.о.)	L1PA4	2	
L1-79	chr10	93517474-93523652 (6178 п.о.)	L1PA4	2	
L1-92	chr21	9182589-9188720 (6131 п.о.)	L1PA4	2	
L1-93	chr4	173772935 – 173779072 (6137 п.о.)	L1PA4	2	
L1-95	chr1	125011752 – 125017885 (6133 п.о.)	L1PA4	2	
L1-99	chr9	90682773-90689210 (6437 п.о.)	L1PA4	2	
L1-102	chr10	64014843-64021048 (6205 п.о.)	L1PA4	1	
L1-112	chr15	76776415-76782548 (6133 п.о.)	L1PA4	1	
L1-119	chr12	11373698-11379329 (5631 п.о.)	L1PA4	1	
L1-120	chr19	24012879-24018978 (6099 п.о.)	L1PA4	1	
L1-122	chr3	99031289-99037430 (6141 п.о.)	L1PA4	1	
L1-129	chr10	15664019-15669631 (5612 п.о.)	L1PA4	1	
L1-146	chr4	90478877-90483706 (4829 п.о.)	L1PA4	1	
L1-153	chrX	76878709-76885597 (6888 п.о.)	L1PA4	1	
L1-155	chr18	43282426-43288579 (6153 п.о.)	L1PA4	1	
L1-160	chr19	20486826-20493102 (6276 п.о.)	L1PA4	1	
L1-161	chr1	200181868 – 200188010 (6142 п.о.)	L1PA4	1	
L1-162	chr11	100034468 – 100040624 (6156 п.о.)	L1PA4	1	
L1-163	chr20	29365560-29370431 (4871 п.о.)	L1PA4	1	
L1-168	chr5	78706259-78712394 (6135 п.о.)	L1PA4	1	
L1-204	chr1	83178675-83184836 (6161 п.о.)	L1PA4	1	
L1-205	chr3	39366145-39372264 (6119 п.о.)	L1PA4	1	
L1-208	chr18	45793571-45799710 (6139 п.о.)	L1PA4	1	
L1-216	chr5	39030830-39036977 (6147 п.о.)	L1PA4	1	
Сума: L1PA4 Кількість: 118 Окремі елементи: 34					
L1-02	chr5	80840410-80845999 (5589 п.о.)	L1PA5	36	
L1-67	chr12	370113-376219 (6106 п.о.)	L1PA5	2	

L1-68	chr11	95811406-95816742 (5336 п.о.)	L1PA5	2	
L1-106	chr10	109822318 – 109828350 (6032 п.о.)	L1PA5	1	
L1-109	chrX	12102927-12109072 (6145 п.о.)	L1PA5	1	
L1-127	chr4	59474627-59479488 (4861 п.о.)	L1PA5	1	
L1-207	chr15	99827462-99833366 (5904 п.о.)	L1PA5	1	
L1-213	chr3	146434278 – 146440207 (5929 п.о.)	L1PA5	1	
L1-220	chr18	35720595-35726712 (6117 п.о.)	L1PA5	1	
Сума: L1PA5 Кількість: 46 Окремі елементи: 9					

Узагальнення	Кількість	%	Окремі елементи	%
Інтактний L1HS	71,9	10,9	19	8,5
Неінтактний L1HS	132,1	20,1	56	25,0
L1PA2	124	18,8	48	21,4
L1PA3	166	25,2	58	25,9
L1PA4	118	17,9	34	15,2
L1PA5	46	7,0	9	4,0
Сума:	658	100,0	224	100,0

Таблиця 4

Перелік генів, використовуваних у GSEA, для IFN-I (50 генів)

Позначення гену	Назва гену
ADAR	Аденозиндезаміназа, РНК-специфічна
BST2	Антиген стромальних клітин кісткового мозку 2
CASP1	Каспаза 1
CAV1	Кавеолін 1
CXCL10	Хемокінний ліганд 10 з мотивом C-X-C
DDX58	DEXD/H-бокс геліказа 58
EIF2AK2	Фактор ініціації трансляції еукаріот 2-альфа-кіназа 2
IFI16	Індукований інтерфероном гамма білок 16
IFI27	Індукований інтерфероном альфа білок 27
IFI30	IFI30, лізосомальна тіолредуктаза
IFI6	Індукований інтерфероном альфа білок 6
IFIH1	Індукований інтерфероном білок 1, що містить домен C гелікази
IFIT1	Індукований інтерфероном білок з тетракопептидними повторами 1
IFIT2	Індукований інтерфероном білок з тетракопептидними повторами 2
IFIT3	Індукований інтерфероном білок з тетракопептидними повторами 3
IFITM1	Індукований інтерфероном трансмембранний білок 1
IFITM2	Індукований інтерфероном трансмембранний білок 2
IFITM3	Індукований інтерфероном трансмембранний білок 3
IFNA1	Інтерферон альфа 1
IFNA2	Інтерферон альфа 2
IFNA4	Інтерферон альфа 4
IFNAR1	Рецептор інтерферону альфа та бета, субдиниця 1
IFNAR2	Рецептор інтерферону альфа та бета, субдиниця 2
IFNB1	Інтерферон бета 1
IFNE	Інтерферон епсилон
IFNW1	Інтерферон омега 1
IRF1	Регуляторний фактор інтерферону 1
IRF2	Регуляторний фактор інтерферону 2
IRF3	Регуляторний фактор інтерферону 3
IRF5	Регуляторний фактор інтерферону 5
IRF7	Регуляторний фактор інтерферону 7
IRF9	Регуляторний фактор інтерферону 9

ISG15	Убіквітин-подібний модифікатор ISG15
ISG20	Стимульована інтерфероном екзонуклеаза, ген 20
JAK1	Янус-кіназа 1
JAK2	Янус-кіназа 2
MAL	mal, білок диференціювання Т-клітин
MET	MET протоонкоген, рецепторна тирозинкіназа
MNDA	Ядерний антиген диференціювання мієлоїдних клітин MX1
MX	Динамін-подібна ГТФаза 1
MX2	MX динамін-подібна ГТФаза 2
MYD88	Первинна відповідь мієлоїдного диференціювання 88
NOS2	синтаза оксиду азоту 2
OAS1	2'-5'-олігоаденілатсинтетаза 1
OAS2	2'-5'-олігоаденілатсинтетаза 2
STAT1	Переносник сигналу та активатор транскрипції 1
STAT2	Переносник сигналу та активатор транскрипції 2
STAT3	Переносник сигналу та активатор транскрипції 3
TMEM173	Трансмембранний білок 173
TNFSF10	Представник 10 суперсімейства факторів некрозу пухлини

Таблиця 5

Аналіз GSEA сигнальних шляхів KEGG, що порівнює ранній пасаж з раннім старінням клітин
Експресія підвищилася з раннього пасажу (РП) до раннього старіння клітин (СТАР-Р)

Назва шляху	Розмір	ПО	НПЗ	Ном, р-знач	FDR, р-знач
KEGG_ASTHMA	28	0,7237	1,7864	<1,00E-03	<1,00E-02
KEGG_GRAFT_VERSUS_HOST_DISEASE	35	0,6852	1,7654	<1,00E-03	<1,00E-02
KEGG_CELL_ADHESION_MOLECULES_CAMS	127	0,5578	1,7538	<1,00E-03	<1,00E-02
KEGG_OLFACTORY_TRANSDUCTION	367	0,4965	1,7468	<1,00E-03	<1,00E-02
KEGG_TYPE_I_DIABETES_MELLITUS	41	0,6457	1,714	<1,00E-03	<1,00E-02
KEGG_LYSOSOME	119	0,5388	1,6878	<1,00E-03	<1,00E-02
KEGG_COMPLEMENT_AND_COAGULATION_CASCADES	67	0,5786	1,6854	<1,00E-03	<1,00E-02
KEGG_ECM_RECEPTOR_INTERACTION	84	0,5123	1,5487	<1,00E-03	<1,00E-02
KEGG_LEISHMANIA_INFECTION	68	0,5688	1,6559	1,79E-03	1,51E-02
CUSTOM_SASP	85	0,5471	1,6517	1,80E-03	1,51E-02
KEGG_PRION_DISEASES	34	0,6326	1,6397	1,84E-03	1,51E-02
KEGG_CYTOKINE_CYTOKINE_RECEPTOR_INTERACTION	254	0,4561	1,5705	1,62E-03	1,51E-02
KEGG_TOLL_LIKE_RECEPTOR_SIGNALING_PATHWAY	99	0,4868	1,492	1,73E-03	1,51E-02
KEGG_AUTOIMMUNE_THYROID_DISEASE	48	0,5605	1,5336	3,77E-03	2,66E-02
KEGG_ENDOCYTOSIS	174	0,4365	1,4427	5,21E-03	3,49E-02
KEGG_VIRAL_MYOCARDITIS	68	0,5313	1,5277	8,68E-03	5,47E-02
KEGG_RIG_I_LIKE_RECEPTOR_SIGNALING_PATHWAY	67	0,5169	1,4977	9,06E-03	5,47E-02
KEGG_INTESTINAL_IMMUNE_NETWORK_FOR_IGA_PRODUCTION	45	0,5848	1,567	1,08E-02	6,11E-02
KEGG_HYPERTROPHIC_CARDIOMYOPATHY_HCM	83	0,4814	1,4387	1,08E-02	6,11E-02
KEGG_NEUROACTIVE_LIGAND_RECEPTOR_INTERACTION	270	0,3779	1,2928	1,12E-02	6,14E-02
KEGG_ANTIGEN_PROCESSING_AND_PRESENTATION	73	0,5096	1,4914	1,28E-02	6,81E-02
KEGG_EPITHELIAL_CELL_SIGNALING_IN_Helicobacter_Pylori_INFECTION	67	0,5106	1,5038	1,64E-02	8,00E-02
KEGG_STARCH_AND_SUCROSE_METABOLISM	45	0,5382	1,4727	1,68E-02	8,00E-02
KEGG_MAPK_SIGNALING_PATHWAY	268	0,3751	1,2821	1,64E-02	8,00E-02
KEGG_ASCORBATE_AND_ALDARATE_METABOLISM	21	0,6766	1,5631	2,06E-02	9,32E-02
KEGG_NOD_LIKE_RECEPTOR_SIGNALING_PATHWAY	60	0,5046	1,437	2,16E-02	9,54E-02
KEGG_ABC_TRANSPORTERS	44	0,544	1,4685	2,51E-02	1,08E-01
KEGG_CYTOSOLIC_DNA_SENSING_PATHWAY	52	0,5357	1,4752	2,64E-02	1,11E-01
KEGG_NATURAL_KILLER_CELL_MEDIATED_CYTOTOXICITY	123	0,4218	1,3254	2,83E-02	1,16E-01
KEGG_OTHER_GLYCAN_DEGRADATION	16	0,6967	1,5277	3,13E-02	1,24E-01
KEGG_ALANINE_ASPARTATE_AND_GLUTAMATE_METABOLISM	32	0,5745	1,4414	3,22E-02	1,24E-01
KEGG_HEMATOPOIETIC_CELL_LINEAGE	85	0,4547	1,3563	3,42E-02	1,27E-01
KEGG_GLYCOSAMINOGLYCAN_BIOSYNTHESIS_CHONDROITIN_SULFATE	22	0,6172	1,4675	3,59E-02	1,27E-01
KEGG_ARRHYTHMOGENIC_RIGHT_VENTRICULAR_CARDIOMYOPATHY_ARVC	74	0,4733	1,3664	3,54E-02	1,27E-01
KEGG_DILATED_CARDIOMYOPATHY	90	0,4453	1,348	3,55E-02	1,27E-01
KEGG_ALLOGRAFT_REJECTION	35	0,5607	1,4452	3,92E-02	1,36E-01
KEGG_CALCIIUM_SIGNALING_PATHWAY	173	0,3956	1,2886	4,46E-02	1,52E-01

KEGG_REGULATION_OF_ACTIN_CYTOSKELETON	210	0,3708	1,2426	4,93E-02	1,62E-01
KEGG_STEROID_HORMONE_BIOSYNTHESIS	49	0,4982	1,3661	5,14E-02	1,66E-01
KEGG_LINOLEIC_ACID_METABOLISM	29	0,5664	1,3972	5,98E-02	1,90E-01
KEGG_FOCAL_ADHESION	197	0,3646	1,2184	6,69E-02	2,09E-01
KEGG_LEUKOCYTE_TRANSENDOTHELIAL_MIGRATION	115	0,4016	1,2474	7,64E-02	2,34E-01
KEGG_RETINOL_METABOLISM	56	0,4497	1,2695	9,09E-02	2,70E-01
KEGG_CHEMOKINE_SIGNALING_PATHWAY	183	0,3602	1,1945	9,02E-02	2,70E-01
KEGG_VASCULAR_SMOOTH_MUSCLE_CONTRACTION	112	0,3902	1,2155	9,52E-02	2,78E-01
KEGG_PATHOGENIC_ESCHERICHIA_COLI_INFECTION	53	0,4475	1,2529	1,16E-01	3,33E-01
KEGG_GLYCOSPHINGOLIPID_BIOSYNTHESIS-GANGLIO-SERIES	15	0,5941	1,2772	1,73E-01	4,70E-01
KEGG_SPHINGOLIPID_METABOLISM	36	0,471	1,2155	1,79E-01	4,70E-01
KEGG_REGULATION_OF_AUTOPHAGY	32	0,4748	1,2109	1,75E-01	4,70E-01
KEGG_ARACHIDONIC_ACID_METABOLISM	58	0,4212	1,1842	1,78E-01	4,70E-01
KEGG_MELANOMA	71	0,4044	1,182	1,76E-01	4,70E-01
KEGG_METABOLISM_OF_XENOBIOTICS_BY_CYTOCHROME_P450	62	0,4067	1,1816	1,88E-01	4,86E-01
KEGG_AXON_GUIDANCE	127	0,354	1,1188	2,01E-01	5,12E-01
KEGG_SNARE_INTERACTIONS_IN_VESICULAR_TRANSPORT	38	0,456	1,1899	2,08E-01	5,23E-01
KEGG_NICOTINATE_AND_NICOTINAMIDE_METABOLISM	22	0,5028	1,1791	2,20E-01	5,31E-01
KEGG_TASTE_TRANSDUCTION	50	0,4249	1,165	2,19E-01	5,31E-01
KEGG_NITROGEN_METABOLISM	23	0,5036	1,1769	2,24E-01	5,33E-01
KEGG_PPAR_SIGNALING_PATHWAY	69	0,3797	1,1045	2,63E-01	5,77E-01
KEGG_JAK_STAT_SIGNALING_PATHWAY	148	0,334	1,0743	2,65E-01	5,77E-01
KEGG_APOPTOSIS	86	0,3669	1,0996	2,67E-01	5,77E-01
KEGG_DRUG_METABOLISM_OTHER_ENZYMES	44	0,4154	1,1191	2,81E-01	5,98E-01
KEGG_DRUG_METABOLISM_CYTOCHROME_P450	63	0,3754	1,0737	2,93E-01	6,17E-01
KEGG_INOSITOL_PHOSPHATE_METABOLISM	54	0,3887	1,0905	3,04E-01	6,32E-01
KEGG_PHOSPHATIDYLINOSITOL_SIGNALING_SYSTEM	73	0,3662	1,0598	3,33E-01	6,77E-01
KEGG_GLYCOSPHINGOLIPID_BIOSYNTHESIS_LACTO_AND_NEOLACTO_SERIES	25	0,4434	1,0764	3,41E-01	6,86E-01
KEGG_ALZHEIMERS_DISEASE	153	0,3226	1,0359	3,57E-01	7,10E-01
CUSTOM_IFN-1	50	0,3781	1,0455	3,69E-01	7,18E-01
KEGG_FRUCTOSE_AND_MANNOSE_METABOLISM	34	0,3971	1,0438	3,81E-01	7,24E-01
KEGG_GLYCOSAMINOGLYCAN_BIOSYNTHESIS_HEPARAN_SULFATE	26	0,4256	1,0321	3,84E-01	7,24E-01
KEGG_PANTOTHENATE_AND_COA_BIOSYNTHESIS	16	0,4687	1,0325	4,21E-01	7,67E-01
KEGG_N_GLYCAN_BIOSYNTHESIS	46	0,3798	1,0231	4,32E-01	7,67E-01
KEGG_GALACTOSE_METABOLISM	26	0,4132	1,0123	4,50E-01	7,83E-01
KEGG_GLYCEROLIPID_METABOLISM	43	0,3679	0,9942	4,71E-01	8,12E-01
KEGG_LONG_TERM_POTENTIATION	66	0,3408	0,9796	4,99E-01	8,36E-01
KEGG_RENIN_ANGIOTENSIN_SYSTEM	17	0,4406	0,9772	4,95E-01	8,36E-01
KEGG_MATURITY_ONSET_DIABETES_OF_THE_YOUNG	25	0,4094	0,9773	5,17E-01	8,41E-01
KEGG_WNT_SIGNALING_PATHWAY	149	0,3005	0,9739	5,21E-01	8,41E-01
KEGG_FC_GAMMA_R_MEDIATED_PHAGOCYTOSIS	92	0,3151	0,9621	5,27E-01	8,41E-01
KEGG_TGF_BETA_SIGNALING_PATHWAY	85	0,319	0,9616	5,47E-01	8,41E-01
KEGG_BETA_ALANINE_METABOLISM	22	0,4046	0,9468	5,33E-01	8,41E-01
KEGG_ERBB_SIGNALING_PATHWAY	86	0,3133	0,9462	5,80E-01	8,41E-01
KEGG_BLADDER_CANCER	40	0,359	0,9449	5,46E-01	8,41E-01

KEGG_TRYPTOPHAN_METABOLISM	39	0,358	0,9438	5,65E-01	8,41E-01
KEGG_GLYCOSYLPHOSPHATIDYLINOSITOL_GPI_ANCHOR_BIOSYNTHESIS	25	0,3874	0,9353	5,43E-01	8,41E-01
KEGG_GLYCINE_SERINE_AND_THREONINE_METABOLISM	30	0,377	0,9349	5,68E-01	8,41E-01
KEGG_PENTOSE_AND_GLUCURONATE_INTERCONVERSIONS	23	0,3978	0,931	5,80E-01	8,41E-01
KEGG_STEROID_BIOSYNTHESIS	16	0,4313	0,9285	5,80E-01	8,41E-01
KEGG_GLYCOSAMINOGLYCAN_DEGRADATION	21	0,399	0,9236	5,81E-01	8,41E-01
KEGG_PATHWAYS_IN_CANCER	321	0,2739	0,9494	6,20E-01	8,70E-01
KEGG_FC_EPSILON_RI_SIGNALING_PATHWAY	79	0,3108	0,9249	6,15E-01	8,70E-01
KEGG_CARDIAC_MUSCLE_CONTRACTION	73	0,3058	0,8963	6,30E-01	8,77E-01
KEGG_CYSTEINE_AND_METHIONINE_METABOLISM	33	0,341	0,8707	6,63E-01	9,16E-01
KEGG_T_CELL_RECEPTOR_SIGNALING_PATHWAY	106	0,2915	0,8919	7,09E-01	9,26E-01
KEGG_GLIOMA	62	0,3116	0,8857	6,93E-01	9,26E-01
KEGG_ADHERENS_JUNCTION	68	0,3059	0,8855	6,97E-01	9,26E-01
KEGG_FATTY_ACID_METABOLISM	42	0,3279	0,8719	6,83E-01	9,26E-01
KEGG_BASAL_CELL_CARCINOMA	55	0,31	0,8612	7,21E-01	9,26E-01
KEGG_PENTOSE_PHOSPHATE_PATHWAY	26	0,3492	0,8408	7,11E-01	9,26E-01
KEGG_BIOSYNTHESIS_OF_UNSATURATED_FATTY_ACIDS	20	0,3583	0,8338	7,01E-01	9,26E-01
KEGG_RIBOFLAVIN_METABOLISM	16	0,3816	0,8159	7,21E-01	9,26E-01
KEGG_ADIPOCYTOKINE_SIGNALING_PATHWAY	67	0,3025	0,8755	7,38E-01	9,41E-01
KEGG_GAP_JUNCTION	87	0,2863	0,8629	7,78E-01	9,58E-01
KEGG_TYPE_II_DIABETES_MELLITUS	46	0,3026	0,8226	7,91E-01	9,67E-01
KEGG_GLYCEROPHOSPHOLIPID_METABOLISM	71	0,2827	0,8316	8,21E-01	9,91E-01
KEGG_VASOPRESSIN_REGULATED_WATER_REABSORPTION	44	0,2918	0,8032	8,31E-01	9,96E-01
KEGG_TIGHT_JUNCTION	128	0,2691	0,8537	8,45E-01	1,00E+00
KEGG_GNHRH_SIGNALING_PATHWAY	98	0,2748	0,8397	8,54E-01	1,00E+00
KEGG_MELANOGENESIS	98	0,2604	0,7985	9,00E-01	1,00E+00
KEGG_THYROID_CANCER	29	0,3078	0,7626	8,66E-01	1,00E+00
KEGG_DORSO_VENTRAL_AXIS_FORMATION	24	0,3171	0,7609	8,57E-01	1,00E+00
KEGG_INSULIN_SIGNALING_PATHWAY	134	0,2351	0,7496	9,91E-01	1,00E+00
KEGG_ENDOMETRIAL_CANCER	52	0,2653	0,7338	9,37E-01	1,00E+00
KEGG_PEROXISOME	78	0,2441	0,7164	9,85E-01	1,00E+00
KEGG_RENAL_CELL_CARCINOMA	66	0,243	0,7008	9,72E-01	1,00E+00
KEGG_NEUROTROPHIN_SIGNALING_PATHWAY	122	0,2183	0,6909	9,96E-01	1,00E+00
KEGG_B_CELL_RECEPTOR_SIGNALING_PATHWAY	74	0,2309	0,6826	9,98E-01	1,00E+00
KEGG_NOTCH_SIGNALING_PATHWAY	47	0,25	0,6804	9,61E-01	1,00E+00
KEGG_AMINO_SUGAR_AND_NUCLEOTIDE_SUGAR_METABOLISM	44	0,2466	0,6598	9,87E-01	1,00E+00
KEGG_VALINE_LEUCINE_AND_ISOLEUCINE_DEGRADATION	44	0,2416	0,6441	9,89E-01	1,00E+00
KEGG_MTOR_SIGNALING_PATHWAY	51	0,2221	0,6199	9,98E-01	1,00E+00
KEGG_PROANOATE_METABOLISM	32	0,2372	0,5923	9,89E-01	1,00E+00
KEGG_HUNTINGTONS_DISEASE	170	0,1817	0,5895	1,00E+00	1,00E+00
KEGG_PYRUVATE_METABOLISM	39	0,2174	0,5683	9,96E-01	1,00E+00
KEGG_SYSTEMIC_LUPUS_ERYTHEMATOSUS	123	-0,7308	-2,3625	<1,00E-03	<1,00E-02
KEGG_SPLICEOSOME	120	-0,6589	-2,1285	<1,00E-03	<1,00E-02
KEGG_DNA_REPLICATION	36	-0,7853	-2,0793	<1,00E-03	<1,00E-02
KEGG_CELL_CYCLE	124	-0,6132	-1,9829	<1,00E-03	<1,00E-02
KEGG_HOMOLOGOUS_RECOMBINATION	26	-0,7502	-1,8667	<1,00E-03	<1,00E-02
KEGG_RIBOSOME	87	-0,6122	-1,8588	<1,00E-03	<1,00E-02
KEGG_RNA_DEGRADATION	56	-0,6176	-1,7888	<1,00E-03	<1,00E-02
KEGG_OOCYTE_MEIOSIS	107	-0,5171	-1,6434	<1,00E-03	<1,00E-02
KEGG_PROGESTERONE_MEDIATED_OOCYTE_MATURATION	85	-0,5121	-1,601	<1,00E-03	<1,00E-02

KEGG_BASE_EXCISION_REPAIR	33	-0,6575	-1,7074	2,19E-03	1,39E-02
KEGG_MISMATCH_REPAIR	23	-0,7278	-1,7707	2,36E-03	1,39E-02
KEGG_PROTEASOME	43	-0,563	-1,5802	8,83E-03	5,32E-02
KEGG_NUOLEOTIDE_EXCISION_REPAIR	44	-0,5541	-1,5345	1,53E-02	7,76E-02
KEGG_PYRIMIDINE_METABOLISM	94	-0,4476	-1,3925	2,03E-02	8,83E-02
KEGG_BASAL_TRANSCRIPTION_FACTORS	35	-0,5618	-1,4699	3,23E-02	1,21E-01
KEGG_RNA_POLYMERASE	27	-0,5679	-1,4123	4,53E-02	1,51E-01
KEGG_COLORECTAL_CANCER	62	-0,4119	-1,1964	1,75E-01	4,72E-01
KEGG_PRIMARY_IMMUNODEFICIENCY	34	-0,4517	-1,1747	2,13E-01	5,24E-01
KEGG_PRIMARY_BILE_ACID_BIOSYNTHESIS	16	-0,5303	-1,1852	2,27E-01	5,34E-01
KEGG_CITRATE_CYCLE_TCA_CYCLE	30	-0,4512	-1,1431	2,36E-01	5,48E-01
KEGG_SMALL_CELL_LUNG_CANCER	84	-0,3558	-1,1053	2,44E-01	5,59E-01
KEGG_PROXIMAL_TUBULE_BICARBONATE_RECLAMATION	23	-0,4753	-1,1566	2,56E-01	5,74E-01
KEGG_PURINE_METABOLISM	152	-0,3191	-1,0691	2,68E-01	5,82E-01
KEGG_HISTIDINE_METABOLISM	27	-0,4347	-1,0768	3,10E-01	6,38E-01
KEGG_PHENYLALANINE_METABOLISM	18	-0,4584	-1,0618	3,65E-01	7,16E-01
KEGG_ALDOSTERONE_REGULATED_SODIUM_REABSORPTION	42	-0,3858	-1,0507	3,77E-01	7,16E-01
KEGG_ETHER_LIPID_METABOLISM	30	-0,405	-1,0352	4,00E-01	7,46E-01
KEGG_GLYOXYLATE_AND_DICARBOXYLATE_METABOLISM	16	-0,4608	-1,0148	4,14E-01	7,63E-01
KEGG_PROSTATE_CANCER	89	-0,3204	-0,9982	4,27E-01	7,63E-01
KEGG_HEDGEHOG_SIGNALING_PATHWAY	56	-0,354	-1,0074	4,30E-01	7,63E-01
KEGG_P53_SIGNALING_PATHWAY	66	-0,3441	-1,0082	4,49E-01	7,83E-01
KEGG_ONE_CARBON_POOL_BY_FOLATE	17	-0,4277	-0,985	4,88E-01	8,33E-01
KEGG_GLUTATHIONE_METABOLISM	48	-0,3354	0,9456	5,51E-01	8,40E-01
KEGG_TYROSINE_METABOLISM	41	-0,3461	-0,9432	5,59E-01	8,40E-01
KEGG_TERPENOID_BACKBONE_BIOSYNTHESIS	15	-0,421	0,9251	5,66E-01	8,40E-01
KEGG_NON_SMALL_CELL_LUNG_CANCER	54	-0,3267	-0,932	5,75E-01	8,40E-01
KEGG_SELENOAMINO_ACID_METABOLISM	24	-0,3674	-0,9087	5,94E-01	8,52E-01
KEGG_VIBRIO_CHOLERAЕ_INFECTION	53	-0,3177	-0,9225	5,98E-01	8,52E-01
KEGG_ALPHA_LINOLENIC_ACID_METABOLISM	19	-0,362	0,8293	7,19E-01	9,24E-01
KEGG_LONG_TERM_DEPRESSION	70	-0,2922	-0,8691	7,45E-01	9,43E-01
KEGG_ACUTE_MYELOID_LEUKEMIA	57	-0,2957	0,8524	7,58E-01	9,53E-01
KEGG_CHRONIC_MYELOID_LEUKEMIA	73	-0,2905	-0,871	7,70E-01	9,60E-01
KEGG_PANCREATIC_CANCER	69	-0,2928	0,8606	7,77E-01	9,60E-01
KEGG_AMYOTROPHIC_LATERAL_SCLEROSIS_ALS	52	-0,2946	-0,8457	8,00E-01	9,72E-01
KEGG_O_GLYCAN_BIOSYNTHESIS	27	-0,2958	-0,7509	8,78E-01	1,00E+00
KEGG_UBIQUITIN_MEDIATED_PROTEOLYSIS	131	-0,249	0,8209	9,31E-01	1,00E+00
KEGG_ARGININE_AND_PROLINE_METABOLISM	48	-0,267	-0,7389	9,36E-01	1,00E+00
KEGG_BUTANOATE_METABOLISM	34	-0,2643	0,699	9,55E-01	1,00E+00
KEGG_PROTEIN_EXPORT	22	-0,2643	-0,6293	9,74E-01	1,00E+00
KEGG_PARKINSONS_DISEASE	112	-0,2391	0,7645	9,74E-01	1,00E+00
KEGG_VEGF_SIGNALING_PATHWAY	75	-0,2379	-0,7151	9,77E-01	1,00E+00
KEGG_LYSINE_DEGRADATION	39	-0,2282	-0,6218	9,89E-01	1,00E+00
KEGG_AMINOACYL_TRNA_BIOSYNTHESIS	41	-0,2402	-0,6572	9,90E-01	1,00E+00
KEGG_GLYCOLYSIS_GLUONEOGENESIS	61	-0,227	0,6631	9,93E-01	1,00E+00
KEGG_PORPHYRIN_AND_CHLOROPHYLL_METABOLISM	37	-0,2269	-0,6034	9,96E-01	1,00E+00
KEGG_OXIDATIVE_PHOSPHORYLATION	116	-0,1799	0,579	1,00E+00	1,00E+00

Таблиця 6

Короткий опис результатів аналізу ПЛР Qiagen

	Стар (П) клітини		Клітини 3X	
	Кількість генів	Відсоток ¹	Кількість генів	Відсоток ¹
Всього генів	84	100 %	84	100 %
Гени з підвищеною експресією	77	92 %	80	95 %
Гени зі зниженою експресією	7	8 %	4	5 %
Змінені гени, що пройшли фільтри ²	58	69 %	44	52 %
Гени, що пройшли, з підвищеною експресією	57	68 %	44	52 %
Гени, що пройшли, зі зниженою експресією	1	1 %	0	0 %
Змінені гени, що не пройшли фільтри	26	31 %	40	48 %
Гени, які пройшли фільтри, унікальні ³	23	27 %	9	11 %
Гени, які пройшли фільтри, перекривання ⁴	35	42 %	35	42 %
Гени, які пройшли фільтри, всього ⁵	67	80 %	67	80 %

¹ Усі відсотки розраховані відносно загальної кількості генів (84), виявлених на панелі. Результати для всіх 84 генів, зображені за допомогою діаграм розкиду, представлені на фіг. 2h.

² Сума генів з підвищеною та зниженою експресією, які пройшли набір фільтрів значимості, визначення фільтрів див. у розділі "Методи".

³ Змінені гени, що пройшли фільтри значимості, які унікальні або для клітин СТАР (П), або для клітин 3X.

⁴ Змінені гени, які пройшли фільтри значимості, загальні для клітин СТАР (П) та для клітин 3X (виявлені у обох типах клітин).

⁵ Змінені гени, які пройшли фільтри значимості, які виявлені у клітинах СТАР (П) та/або у клітинах 3X. Представлення даного набору генів (67) у вигляді теплової карти показане у розділі Додаткові дані, фіг. 4j, k.

Таблица 7

Кратності зміни у віковій групі

	L1	P16	IFNA	IRF7	OAS1	IL6	MMP3	PAI
05міс-ДТ	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
05міс-ЗТС	1,420	0,868	1,489	0,922	2,229	2,046	0,993	1,265
26міс-ДТ	6,265	2,917	13,219	1,560	1,898	8,775	3,078	6,603
26міс-ЗТС	3,947	2,213	6,579	1,076	1,681	2,355	1,762	2,839
Т-критерій								
05 проти ЗТС	0,152	0,819	0,304	0,542	0,125	0,123	0,981	0,547
05 проти 26	0,001	0,001	0,000	0,001	0,207	0,001	0,022	0,110
26 проти ЗТС	0,068	0,129	0,016	0,070	0,786	0,001	0,090	0,194
Індивідуальні кратності зміни								
	L1	P16	IFNA	IRF7	OAS1	IL6	MMP3	PAI
05міс-ДТ	1,013	0,372	0,874	1,062	0,684	0,953	0,488	0,645
	1,249	0,342	0,982	0,868	0,769	1,059	1,011	0,916
	0,884	0,412	0,394	0,835	1,441	1,003	0,663	0,695
	1,343	3,419	1,540	0,953	0,791	0,848	1,660	1,291
	1,085	1,107	1,037	1,079	0,355	0,881	0,755	2,511
	0,755	0,552	1,886	1,397	1,799	1,352	1,971	0,314
	0,979	1,408	0,557	0,679	0,977	1,112	0,913	0,596
	0,692	0,388	0,729	1,127	1,183	0,792	0,539	1,033
05міс-ЗТС	1,458	2,881	1,821	1,040	2,867	1,455	1,587	2,291
	1,464	0,457	2,748	1,153	1,521	0,924	0,601	0,842
	0,484	0,957	2,909	1,132	6,031	5,604	1,946	2,212
	1,829	0,270	0,645	0,684	1,317	1,622	0,711	1,683
	2,537	0,104	0,465	0,565	0,037	1,920	0,635	0,180
	0,747	0,541	0,346	0,960	1,603	0,751	0,476	0,380
26міс-ДТ	10,645	2,563	17,947	1,801	5,442	17,058	6,449	0,979
	3,930	1,799	1,336	1,478	0,423	3,264	1,275	1,842
	1,688	4,441	8,010	1,439	0,531	3,254	2,541	3,243
	10,959	2,315	22,657	1,891	0,516	19,464	5,831	32,301
	13,251	4,668	24,009	1,007	4,476	10,752	6,948	5,159
	2,413	4,457	17,239	2,233	0,231	4,028	1,564	0,306
	4,278	1,361	12,879	1,461	1,699	4,075	0,764	9,405
	2,796	2,689	0,531	1,971	4,666	7,083	1,161	16,692
	6,245	3,037	13,076	1,660	2,248	8,622	3,317	1,188
	4,788	1,777	10,981	1,422	0,963	3,754	1,551	1,605
	6,397	2,575	13,747	1,240	0,598	14,603	0,982	4,307
	7,793	3,327	16,220	1,120	0,986	9,347	4,554	2,206
26міс-ЗТС	2,819	2,290	10,115	0,540	1,658	1,116	1,044	1,034
	2,160	3,653	2,941	0,506	0,643	1,553	0,972	1,056
	2,053	1,731	4,156	0,498	0,055	2,194	1,618	2,696
	1,491	1,168	1,283	0,424	0,482	0,686	1,650	0,493
	6,524	0,844	1,601	0,954	1,094	1,395	1,033	1,562
	2,863	1,243	8,335	0,831	0,695	1,291	1,166	1,675
	7,191	3,690	19,836	0,891	7,091	8,067	4,484	2,347
	5,433	2,458	3,982	3,302	3,841	0,654	0,374	0,529
	3,817	2,135	6,531	0,993	1,945	2,119	1,543	0,747
	4,409	4,053	8,332	1,155	0,636	3,177	3,656	8,508
	5,864	1,969	5,514	0,950	0,565	1,148	1,964	6,112
	2,745	1,326	6,321	1,866	1,469	4,866	1,637	7,313

НІЗТ, схвалені у якості терапевтичних засобів проти ВІЛ

Торгівельна назва	Непатентована назва	Форма	Стандартна доза для дорослого
Нуклеозидні/нуклеотидні інгібітори зворотної транскриптази (НІЗТ)			
ЗІАГЕН ^М	Абакавір	300 мг таблетка	300 мг двічі на день або 600 мг раз на день
ЕМТРИВА ^{ТМ}	Емтрицитабін	200 мг капсула	200 мг раз на день
ЕПІВІР ^{ТМ}	Ламівудин	150 та 300 мг таблетки	150 мг двічі на день або 300 мг раз на день
РЕТРОВІР ^{ТМ}	Зидовудин	100 та 250 мг капсули	100 мг 5 раз на день або 250 мг двічі на день
ВІРЕАД ^{ТМ}	Тенофовіру дизопроксил	245 мг таблетка	245 мг раз на день
Комбінації НІЗТ з фіксованою дозою			
КІВЕКСА ^{ТМ}	Абакавір/ламівудин	Таблетка містить: 600 мг абакавіру та 300 мг ламівудину	Одна таблетка раз на день
ТРИЗИВІР ^{ТМ}	Абакавір/ламівудин/зидовудин	Таблетка містить: 300 мг абакавіру, 150 мг ламівудину та 300 мг зидовудину	Одна таблетка раз на день
ТРУВАДА®	Емтрицитабін/тенофовіру дизопроксил	Таблетка містить: 200 мг емтрицитабіну та 245 мг тенофовіру дизопроксилу	Одна таблетка раз на день
ДЕСКОВІ®	Емтрицитабін/тенофовіру алафенамід	Таблетка містить: 200 мг емтрицитабіну та 10 або 25 мг тенофовіру алафенамід	Одна таблетка раз на день
КОМБІВІР ^{ТМ}	Ламівудин/зидовудин	Таблетка містить: 150 мг ламівудину та 300 мг зидовудину	Одна таблетка раз на день
АТРИПЛА®	Ефавіренц/емтрицитабін/тенофовіру дизопроксил	Таблетка містить: 600 мг ефавіренца, 200 мг емтрицитабіну та 245 мг тенофовіру дизопроксилу	Одна таблетка раз на день
ЕВІПЛЕРА ^{ТМ}	Рилпівірин/емтрицитабін/тенофовіру дизопроксил	Таблетка містить: 25 мг рилпівіріну, 200 мг емтрицитабіну та 245 мг тенофовіру дизопроксилу	Одна таблетка раз на день
ОДЕФСЕЙ®	Рилпівірин /тенофовіру алафенамід/емтрицитабін	Таблетка містить: 25 мг рилпівіріну, 25 мг тенофовіру алафенамід, та 200 мг емтрицитабіну	Одна таблетка раз на день
ГЕНВОЯ®	Елвітегравір/кобіцистат/емтрицитабін/тенофовіру алафенамід	Таблетка містить: 150 мг елвітегравіру, 150 мг кобіцистату, 200 мг емтрицитабіну, 10 мг тенофовіру алафенамід	Одна таблетка раз на день
СТРИБІЛД®	Елвітегравір /кобіцистат/емтрицитабін/тенофовіру дизопроксил	Таблетка містить: 150 мг елвітегравіру, 150 мг кобіцистату, 200 мг емтрицитабіну та 245 мг тенофовіру дизопроксилу	Одна таблетка раз на день
ТРІУМЕК®	Долутегравір/абакавір/ламівудин	Таблетка містить: 50 мг долутегравіру, 600 мг абакавіру та 300 мг ламівудину	Одна таблетка раз на день

Таблиця 9

Більш низькі дозування (50 %) НІЗТ

Торгівельна назва	Непатентована назва	Форма	Стандартна доза для дорослого
Нуклеозидні/нуклеотидні інгібітори зворотної транскриптази (НІЗТ)			
ЗІАГЕН ^М	Абакавір	150 мг таблетка	150 мг двічі на день або 300 мг раз на день
ЕМТРИВА ^{ТМ}	Емтрицитабін	100 мг капсула	100 мг раз на день
ЕПІВІР ^{ТМ}	Ламівудин	75 та 150 мг таблетки	75 мг двічі на день або 150 мг раз на день
РЕТРОВІР ^{ТМ}	Зидовудин	50 та 125 мг капсули	50 мг 5 раз на день або 125 мг двічі на день
ВІРЕАД ^{ТМ}	Тенофовіру дизопротексил	120 мг таблетка	120 мг раз на день
Комбінації НІЗТ з фіксованою дозою			
КІВЕКСА ^{ТМ}	Абакавір/ламівудин	Таблетка містить: 300 мг абакавіру та 150 мг ламівудину	Одна таблетка раз на день
ТРИЗИВІР ^{ТМ}	Абакавір/ламівудин/зидовудин	Таблетка містить: 150 мг абакавіру, 75 мг ламівудину та 150 мг зидовудину	Одна таблетка раз на день
ТРУВАДА®	Емтрицитабін/тенофовіру дизопротексил	Таблетка містить: 100 мг емтрицитабіну та 120 мг тенофовіру дизопротексилу	Одна таблетка раз на день
ДЕСКОВІ®	Емтрицитабін/тенофовіру алафенамід	Таблетка містить: 100 мг емтрицитабіну та 5 або 12 мг тенофовіру алафенаміду	Одна таблетка раз на день
КОМБІВІР ^{ТМ}	Ламівудин/зидовудин	Таблетка містить: 75 мг ламівудину та 150 мг зидовудину	Одна таблетка раз на день
АТРИПЛА®	Ефавіренц/емтрицитабін/тенофовіру дизопротексил	Таблетка містить: 300 мг ефавіренца, 100 мг емтрицитабіну та 120 мг тенофовіру дизопротексилу	Одна таблетка раз на день
ЕВІПЛЕРА ^{ТМ}	Рилпівірин/емтрицитабін/тенофовіру дизопротексил	Таблетка містить: 12 мг рилпівірину, 100 мг емтрицитабіну та 120 мг тенофовіру дизопротексилу	Одна таблетка раз на день
ОДЕФСЕЙ®	Рилпівірин / тенофовіру алафенамід/емтрицитабін	Таблетка містить: 12 мг рилпівірину, 12 мг тенофовіру алафенаміду та 100 мг емтрицитабіну	Одна таблетка раз на день
ГЕНВОЯ®	Елвітегравір/кобіцистат/емтрицитабін /тенофовіру алафенамід	Таблетка містить: 75 мг елвітегравіру, 75 мг кобіцистату, 100 мг емтрицитабіну, 10 мг тенофовіру алафенаміду	Одна таблетка раз на день
СТРИБІЛД®	Елвітегравір /кобіцистат/емтрицитабін/тенофовіру дизопротексил	Таблетка містить: 75 мг елвітегравіру, 75 мг кобіцистату, 100 мг емтрицитабіну та 120 мг тенофовіру дизопротексилу	Одна таблетка раз на день
ТРІУМЕК®	Долутегравір/абакавір/ламівудин	Таблетка містить: 25 мг долутегравіру, 300 мг абакавіру та 150 мг ламівудину	Одна таблетка раз на день

Таблиця 10

Інгібування активності L1 миші

Сполуки	IC ₅₀ (мкМ), n=2		
	Експ. 1	Експ. 2	Середнє
Ламівудин	0,958	0,780	0,869
Ставудин	1,590	1,856	1,723
Емтрицитабін	0,640	0,451	0,546
Априцитабін	4,442	3,825	4,134
Тенофовіру дизопроксил	0,157	0,151	0,154
Тенофовір	3,467	4,024	3,746
Ценсавудин	0,118	0,105	0,112
Ельвудитабін	0,116	0,106	0,111

- 5 Визначення IC₅₀ для дев'яти сполук для інгібування активності ретротранспозиції активних LINE-1 миші у клітинах HeLa. Активність ретротранспозиції визначали за допомогою подвійного люциферазного репортеру рYX016. Клітини обробляли різними концентраціями кожної сполуки та одночасно трансфікували рYX016. Люмінесценцію вимірювали через 48 год. після трансфекції. Експеримент незалежно проводили два рази.

Таблиця 11

Інгібування активності L1 людини

Сполуки	IC ₅₀ (мкМ), n=2		
	Експ. 1	Експ. 2	Середнє
Ламівудин	0,793	0,867	0,830
Ценсавудин	0,053	0,092	0,072
Ельвудитабін	0,094	н/д	н/д

- 10 Визначення IC₅₀ для трьох сполук для інгібування активності ретротранспозиції активних LINE-1 людини у клітинах HeLa. Активність ретротранспозиції визначали за допомогою подвійного люциферазного репортеру рYX017. Клітини обробляли різними концентраціями кожної сполуки та одночасно трансфікували рYX017. Люмінесценцію вимірювали через 72 год. після трансфекції. Експеримент незалежно проводили два рази.
- 15 Джерела інформації:
1. Engel, P. (2014). These Staggering Maps Show How Much The World's Population Is Aging. Business Insider, May 16, 2014.
 2. Chung H Y, et al., (2009). Molecular inflammation: underpinnings of aging and age-related diseases. Ageing Res. Rev. 8(1): 18-30
 - 3.
 4. Pawelec G, et al., (2014). Inflammation, ageing and chronic disease. Current Opinion in Immunology. 29: 23–28.
 5. Jurk, D. et al., (2014). Chronic inflammation induces telomere dysfunction and accelerates ageing in mice. Nature Communications, Vol 5, Article: 4172.
 - 25 6. Singh, T. & Newman, A.B. (2011). Inflammatory markers in population studies of aging. Ageing Res Rev. 10(3): 319–329.
 7. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fifth Edition, pp. 602-614, American Psychiatric Association Publishing, Washington, DC (2013).
 8. Schorl, C. & Sedivy, J.M. (2007). Analysis of cell cycle phases and progression in cultured mammalian cells. Methods 41, 143-50.
 - 30 9. Itahana, K., Campisi, J. & Dimri, G.P. (2007). Methods to detect biomarkers of cellular senescence: the senescence-associated beta-galactosidase assay. Methods Mol. Biol. 371, 21-31.
 10. Herbig, U. et al. (2004). Telomere shortening triggers senescence of human cells through a pathway involving ATM, p53, and p21(CIP1), but not p16(INK4a). Mol. Cell 14, 501-513.
 - 35 11. Rangwala, S.H., et al. (2009). Many LINE1 elements contribute to the transcriptome of human somatic cells. Genome Biol 10, R100.

12. Criscione, S.W., et al. (2014). Transcriptional landscape of repetitive elements in normal and cancer human cells. *BMC Genomics* 15, 583.
13. Athanikar, J.N., et al. (2004). A YY1-binding site is required for accurate human LINE-1 transcription initiation. *Nucleic Acids Res.* 32, 3846-55.
- 5 14. Xie, Y., et al. (2011). Characterization of L1 retrotransposition with high-throughput dual-luciferase assays. *Nucleic Acids Res* 39, e16.
15. An, W., et al. (2011). Characterization of a synthetic human LINE-1 retrotransposon ORFeus-Hs. *Mob DNA* 2, 2.
16. Schoenmaker, M., et al. (2006). Evidence of genetic enrichment for exceptional survival using a family approach: the Leiden Longevity Study. *Eur. J. Hum. Genet.* 14, 79-84.
- 10 17. Herbig, U., et al. (2004). Telomere shortening triggers senescence of human cells through a pathway involving ATM, p53, and p21(CIP1), but not p16(INK4a). *Mol. Cell* 14, 501-13.
18. See, e.g., Isselbacher et al. (1996) *Harrison's Principles of Internal Medicine* 13 ed., 1814-1882.
- 15 19. De Cecco, M., et al. (2013). Genomes of replicatively senescent cells undergo global epigenetic changes leading to gene silencing and activation of transposable elements. *Aging Cell* 12, 247-256.
- 20 20. De Cecco, M., et al. (2013). Transposable elements become active and mobile in the genomes of aging mammalian somatic tissues. *Aging (Albany NY)*.
21. Li, Q., et al. (2013) FOXA1 mediates p16(INK4a) activation during cellular senescence. *EMBO J* 32, 858-873.
22. Sun, X., et al. (2018). Transcription factor profiling reveals molecular choreography and key regulators of human retrotransposon expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115, E5526-E5535.
23. Montoya-Durango, D.E., et al. (2009). Epigenetic control of mammalian LINE-1 retrotransposon by retinoblastoma proteins. *Mutat Res* 665, 20-28.
- 25 24. Stetson, D.B., et al. (2008). Trex1 prevents cell-intrinsic initiation of autoimmunity. *Cell* 134, 587-598.
25. West, A.P., et al. (2015). Mitochondrial DNA stress primes the antiviral innate immune response. *Nature* 520, 553-557.
- 30 26. Ivanov, A., et al. (2013). Lysosome-mediated processing of chromatin in senescence. *J Cell Biol* 202, 129-143.
27. Dou, Z., et al. (2017). Cytoplasmic chromatin triggers inflammation in senescence and cancer. *Nature* 550, 402-406.
28. Takahashi, A., et al. (2018). Downregulation of cytoplasmic DNases is implicated in cytoplasmic DNA accumulation and SASP in senescent cells. *Nat Commun* 9, 1249.
- 35 29. Thomas, C.A., et al. (2017). Modeling of TREX1-dependent autoimmune disease using human stem cells highlights L1 accumulation as a source of neuroinflammation. *Cell Stem Cell* 21, 319-331 e318.
30. Thomas, C.A., et al. (2017). Modeling of TREX1-dependent autoimmune disease using human stem cells highlights L1 accumulation as a source of neuroinflammation. *Cell Stem Cell* 21, 319-331 e318.
- 40 31. Dou, Z., et al. (2017). Cytoplasmic chromatin triggers inflammation in senescence and cancer. *Nature* 550, 402-406.
32. Takahashi, A., et al. (2018). Downregulation of cytoplasmic DNases is implicated in cytoplasmic DNA accumulation and SASP in senescent cells. *Nat Commun* 9, 1249.
- 45 33. Dou, Z., et al. (2017). Cytoplasmic chromatin triggers inflammation in senescence and cancer. *Nature* 550, 402-406.
34. Takahashi, A., et al. (2018). Downregulation of cytoplasmic DNases is implicated in cytoplasmic DNA accumulation and SASP in senescent cells. *Nat Commun* 9, 1249.
- 50 35. Lopez-Otin, C., et al. (2013). The hallmarks of aging. *Cell* 153, 1194-1217.
36. <https://en.wikipedia.org/wiki/Senotherapy>
37. Franceschi, C. & Campisi, J. (2014). Chronic inflammation (inflammaging) and its potential contribution to age-associated diseases. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 69 Suppl. 1, S4-9.
38. Lopez-Otin, C. et al. (2013). The hallmarks of aging. *Cell* 153, 1194-217.
- 55 39. Safrin, S., (2012). Antiviral Agents (Chapter 49). In: *Basic and Clinical Pharmacology*. 12e. Katzung BG, Masters SB, Trevor AJ (Editors). McGraw-Hill / Lange. (Access-Medicine).
40. Lopez-Otin, C., et al. (2013). The hallmarks of aging. *Cell* 153, 1194-1217.
41. Bussian, T.J., et al. (2018). Clearance of senescent glial cells prevents tau-dependent pathology and cognitive decline. *Nature* 562, 578-582.

42. Childs, B.G., et al. (2016). Senescent intimal foam cells are deleterious at all stages of atherosclerosis. *Science* 354, 472-477.
43. Baker, D.J., et al. (2016). Naturally occurring p16(Ink4a)-positive cells shorten healthy lifespan. *Nature* 530, 184-189.
- 5 44. Demaria, M., et al. (2017). Cellular Senescence Promotes Adverse Effects of Chemotherapy and Cancer Relapse. *Cancer Discov* 7, 165-176.
45. Chang, J., et al. (2016). Clearance of senescent cells by ABT263 rejuvenates aged hematopoietic stem cells in mice. *Nat Med* 22, 78-83.
46. Schafer, M.J., et al. (2017). Cellular senescence mediates fibrotic pulmonary disease. *Nat Commun* 8, 14532.
- 10 47. Farr, J.N., et al. (2017). Targeting cellular senescence prevents age-related bone loss in mice. *Nat Med* 23, 1072-1079.
48. Chinta, S.J., et al. (2018). Cellular Senescence Is Induced by the Environmental Neurotoxin Paraquat and Contributes to Neuropathology Linked to Parkinson's Disease. *Cell Rep* 22, 930-940.
- 15 49. Xu, M., et al. (2018). Senolytics improve physical function and increase lifespan in old age. *Nat Med* 24, 1246-1256.
50. Schafer, M.J., et al. (2017). Cellular senescence mediates fibrotic pulmonary disease. *Nat Commun* 8, 14532.
51. Demaria, M., et al. (2014). An essential role for senescent cells in optimal wound healing through secretion of PDGF-AA. *Dev Cell* 31, 722-733.
- 20 52. See, U.S. Published Patent Application 2018/0050000.
53. See, U.S. Published Patent Application 2018/0050000.
54. Caira M., et al. (2004). Preparation and crystal characterization of a polymorph, a monohydrate, and an ethyl acetate solvate of the antifungal fluconazole. *J. Pharmaceut. Sci.*, 93(3):601-611.
- 25 55. Van Tonder E.C., et al. (2004). Preparation and Physicochemical Characterization of 5 Niclosamide Solvates and 1 Hemisolvate. *AAPS Pharm. Sci. Tech.*, 5(1): Article 12.
56. Bingham A.L., et al. (2001). Over one hundred solvates of sulfathiazole: solvates and adducts of sulfathiazole. *Chem. Commun.* 7: 603-604.
- 30 57. Brown, J.P., et al., (1997). Bypass of senescence after disruption of p21CIP1/WAF1 gene in normal diploid human fibroblasts. *Science* 277, 831-834.
58. Brown, J.P., et al., (1997). Bypass of senescence after disruption of p21CIP1/WAF1 gene in normal diploid human fibroblasts. *Science* 277, 831-834.
59. Herbig, U. et al., (2004). Telomere shortening triggers senescence of human cells through a pathway involving ATM, p53, and p21(CIP1), but not p16(INK4a). *Mol. Cell* 14, 501-513.
- 35 60. Fumagalli, M., et al., (2014). Stable cellular senescence is associated with persistent DDR activation. *PLoS One* 9, e110969.
61. www.nia.nih.gov/research/dab/aged-rodent-colonies-handbook
62. Else, L.J. et al. (2012). Pharmacokinetics of lamivudine and lamivudine-triphosphate after administration of 300 milligrams and 150 milligrams once daily to healthy volunteers: results of the ENCORE 2 study. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56, 1427-1433.
- 40 63. Le, O.N. et al. (2010). Ionizing radiation-induced long-term expression of senescence markers in mice is independent of p53 and immune status. *Aging Cell* 9, 398-409.
64. Coufal, N.G. et al. (2009). L1 retrotransposition in human neural progenitor cells. *Nature* 460, 1127-1131.
- 45 65. <http://www.girinst.org/repbase/update/browse.php>
66. <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>
67. Li, W. et al. (2015). The EMBL-EBI bioinformatics web and programmatic tools framework. *Nucleic Acids Res.* 43, W580-584.
- 50 68. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/primer-blast/>
69. Ye, J. et al. (2012). Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinf.* 13, 134.
70. <https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr>
71. Gautier, G. et al. (2005). A type I interferon autocrine-paracrine loop is involved in Toll-like receptor-induced interleukin-12p70 secretion by dendritic cells. *J. Exp. Med.* 201, 1435-1446.
- 55 72. Coufal, N.G. et al. (2009). L1 retrotransposition in human neural progenitor cells. *Nature* 460, 1127-1131.
73. Kim, D., et al. (2015). HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements. *Nat Methods* 12, 357-360.

74. Liao, Y., et al. (2014). featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics* 30, 923-930.
75. Robinson, M.D., et al. (2010). edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* 26, 139-140.
- 5 76. Reich, M. et al. (2006). GenePattern 2.0. *Nat Genet* 38, 500-501.
77. Subramanian, A. et al. (2005). Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 15545-15550.
78. Benjamini, Y. & Hochberg, Y. (1995). Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J Roy Stat Soc B* 57, 289-300.
- 10 79. <http://www.broadinstitute.org/cancer/software/GENE-E>
80. Langmead, B. (2010). Aligning short sequencing reads with Bowtie. *Curr. Protoc. Bioinformatics* Chapter 11, Unit 11.7.
81. Alexandrova, E.A. et al. (2012). Sense transcripts originated from an internal part of the human retrotransposon LINE-1 5' UTR. *Gene* 511, 46-53.
- 15 82. Olovnikov, I.A. et al. (2007). A key role of the internal region of the 5'-untranslated region in the human L1 retrotransposon transcription activity. *Mol. Biol. (Mosk)* 41, 508-514.
83. Alexandrova, E.A. et al. (2012). Sense transcripts originated from an internal part of the human retrotransposon LINE-1 5' UTR. *Gene* 511, 46-53.
84. <https://www.addgene.org/tools/protocols/plko/>
- 20 85. http://www.broad.mit.edu/genome_bio/trc/rnai.html
86. Michaud, K. et al. (2010). Pharmacologic inhibition of cyclin-dependent kinases 4 and 6 arrests the growth of glioblastoma multiforme intracranial xenografts. *Cancer Res.* 70, 3228-3238.
87. <http://www.orfeomecollaboration.org/>
88. <https://dnasu.org/DNASU/Home.do>
- 25 89. Xie, Y. et al. (2011). Characterization of L1 retrotransposition with high-throughput dual-luciferase assays. *Nucleic Acids Res* 39, e16.
90. An, W., et al. (2011). Characterization of a synthetic human LINE-1 retrotransposon ORFeus-Hs. *Mob DNA* 2, 2.
91. Penzkofer, T., et al. (2005). L1Base: from functional annotation to prediction of active LINE-1 elements. *Nucleic Acids Res* 33, D498-500.
- 30 92. <http://www.girinst.org/repbase/update/browse.php>
93. Criscione, S.W., et al. (2014). Transcriptional landscape of repetitive elements in normal and cancer human cells. *BMC Genomics* 15, 583.
94. Childs, B.G., et al. (2015). Cellular senescence in aging and age-related disease: from mechanisms to therapy. *Nat. Med.* 21, 1424-1435.
- 35 95. Katoh, K. & Standley, D.M. (2013). MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Mol Biol Evol* 30, 772-780.
96. Waterhouse, A.M. et al. (2009). Jalview Version 2--a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics* 25, 1189-1191.
- 40 97. http://genome-engineering.org/gecko/?page_id=15
98. Sanjana, N.E., et al. (2014). Improved vectors and genome-wide libraries for CRISPR screening. *Nat. Methods* 11, 783-784.
99. <http://genome-engineering.org/gecko/wp-content/uploads/2013/12/lentiCRISPRv2-and-lentiGuide-oligo-cloning-protocol.pdf>
- 45 100. Shalem, O. et al. (2014). Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells. *Science* 343, 84-87.
101. <https://dnacore.mgh.harvard.edu/>
102. Kreiling, J.A. et al. (2011). Age-associated increase in heterochromatic marks in murine and primate tissues. *Aging Cell* 10, 292-304.
- 50 103. Thomas, C.A. et al. (2017). Modeling of TREX1-dependent autoimmune disease using human stem cells highlights L1 accumulation as a source of neuroinflammation. *Cell Stem Cell* 21, 319-331 e8.
104. Kreiling, J.A. et al. (2011). Age-associated increase in heterochromatic marks in murine and primate tissues. *Aging Cell* 10, 292-304.
- 55 105. <http://www.qiagen.com/us/shop/genes-and-pathways/data-analysis-center-overview-page/>
106. Schoenmaker, M. et al. (2006). Evidence of genetic enrichment for exceptional survival using a family approach: the Leiden Longevity Study. *Eur. J. Hum. Genet.* 14, 79-84.
107. Waaijer, M.E. et al. (2012). The number of p16INK4a positive cells in human skin reflects biological age. *Aging Cell* 11, 722-725.

108. Kamentsky, L., et al. (2011). Improved structure, function and compatibility for CellProfiler: modular high-throughput image analysis software. *Bioinformatics* 27, 1179-1180.
109. <http://rsbweb.nih.gov/ij/>
110. Martinez-Santibanez, G., et al. (2014). Imaging white adipose tissue with confocal
5 microscopy. *Methods Enzymol* 537, 17-30.
111. Itahana, K., Campisi, J. & Dimri, G.P. Methods to detect biomarkers of cellular senescence: the senescence-associated beta-galactosidase assay. *Methods Mol. Biol.* 371, 21-31 (2007).
112. Baker, D.J., et al. (2016). Naturally occurring p16(Ink4a)-positive cells shorten healthy lifespan. *Nature* 530, 184-189.
113. de Koning, A.P., et al. (2011). Repetitive elements may comprise over two-thirds of the human genome. *PLoS Genet.* 7, e1002384.
114. Huang, C.R., et al. (2012). Active transposition in genomes. *Annu. Rev. Genet.* 46, 651-675.
115. de Koning, A.P., et al. (2011). Repetitive elements may comprise over two-thirds of the human genome. *PLoS Genet.* 7, e1002384.
116. Hancks, D.C. & Kazazian Jr, H.H. (2012). Active human retrotransposons: variation and
15 disease. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 22, 191-203.
117. Rodic, N., et al. (2014). Long interspersed element-1 protein expression is a hallmark of many human cancers. *Am. J. Pathol.* 184, 1280-1286.
118. Erwin, J.A., et al. (2014). Mobile DNA elements in the generation of diversity and complexity
20 in the brain. *Nat Rev. Neurosci.* 15, 497-506.
119. De Cecco, M., et al. (2013). Genomes of replicatively senescent cells undergo global epigenetic changes leading to gene silencing and activation of transposable elements. *Aging Cell* 12, 247-256.
120. Van Meter, M., et al. (2014). SIRT6 represses LINE1 retrotransposons by ribosylating KAP1
25 but this repression fails with stress and age. *Nat Commun* 5, 5011.
121. Kreiling, J.A., et al. Contribution of retrotransposable elements to aging. in *Human Retrotransposons in Health and Disease* (ed. Cristofari, G.) 297-321 (Springer International, 2017).
122. Id.
123. Volkman, H.E. & Stetson, D.B. (2014). The enemy within: endogenous retroelements and
30 autoimmune disease. *Nat. Immunol.* 15, 415-422.
124. Salama, R., et al. (2014). Cellular senescence and its effector programs. *Genes Dev* 28, 99-114.
125. Thomas, C.A., et al. (2017). Modeling of TREX1-dependent autoimmune disease using human stem cells highlights L1 accumulation as a source of neuroinflammation. *Cell Stem Cell* 21, 319-331 e8.
126. Ishak, C.A. et al. (2016). An RB-EZH2 complex mediates silencing of repetitive DNA sequences. *Mol Cell* 64, 1074-1087.
127. Volkman, H.E. & Stetson, D.B. (2014). The enemy within: endogenous retroelements and autoimmune disease. *Nat. Immunol.* 15, 415-422.
128. Volkman, H.E. & Stetson, D.B. (2014). The enemy within: endogenous retroelements and autoimmune disease. *Nat. Immunol.* 15, 415-422.
129. Dai, L., et al. (2011). Effect of reverse transcriptase inhibitors on LINE-1 and Ty1 reverse transcriptase activities and on LINE-1 retrotransposition. *BMC Biochem.* 12, 18.
130. Thomas, C.A., et al. (2017). Modeling of TREX1-dependent autoimmune disease using
45 human stem cells highlights L1 accumulation as a source of neuroinflammation. *Cell Stem Cell* 21, 319-331 e8.
131. De Cecco, M., et al. (2013). Genomes of replicatively senescent cells undergo global epigenetic changes leading to gene silencing and activation of transposable elements. *Aging Cell* 12, 247-256.
132. Coufal, N.G., et al. (2009). L1 retrotransposition in human neural progenitor cells. *Nature* 460, 1127-1131.
133. Dhanwani, R., et al. (2017). Cytosolic sensing of immuno-stimulatory DNA, the enemy within. *Curr Opin Immunol* 50, 82-87.
134. Fowler, B.J., et al. (2014). Nucleoside reverse transcriptase inhibitors possess intrinsic anti-inflammatory activity. *Science* 346, 1000-1003.
135. Rodic, N., et al. (2014). Long interspersed element-1 protein expression is a hallmark of many human cancers. *Am. J. Pathol.* 184, 1280-1286.
136. Herbig, U., et al. (2006). Cellular senescence in aging primates. *Science* 311, 1257.
137. Coppe, J.P., et al. (2010). The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of
60 tumor suppression. *Annu. Rev. Pathol.* 5, 99-118.

138. Chang, J., et al. (2016). Clearance of senescent cells by ABT263 rejuvenates aged hematopoietic stem cells in mice. *Nat Med* 22, 78-83.
139. Zhu, Y., et al. The Achilles' heel of senescent cells: from transcriptome to senolytic drugs. *Aging Cell* 14, 644-58 (2015).
- 5 140. Tchkonina, T., et al. (2010). Fat tissue, aging, and cellular senescence. *Aging Cell* 9, 667-684.
141. Mattson, M.P. (2010). Perspective: Does brown fat protect against diseases of aging? *Ageing Res Rev* 9, 69-76.
142. Tchkonina, T., et al. (2010). Fat tissue, aging, and cellular senescence. *Aging Cell* 9, 667-684.
- 10 143. Frasca, D. & Blomberg, B.B. (2016). Inflammaging decreases adaptive and innate immune responses in mice and humans. *Biogerontology* 17, 7-19.
144. Baker, D.J., et al. (2016). Naturally occurring p16(Ink4a)-positive cells shorten healthy lifespan. *Nature* 530, 184-189.
145. Baker, D.J., et al. (2011). Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders. *Nature* 479, 232-236.
- 15 146. West, A.P. & Shadel, G.S. (2017). Mitochondrial DNA in innate immune responses and inflammatory pathology. *Nat Rev Immunol* 17, 363-375.
147. Dou, Z., et al. (2017). Cytoplasmic chromatin triggers inflammation in senescence and cancer. *Nature* 550, 402-406.
148. Takahashi, A., et al. (2018). Downregulation of cytoplasmic DNases is implicated in cytoplasmic DNA accumulation and SASP in senescent cells. *Nat Commun* 9, 1249.
- 20 149. Franceschi, C., & Campisi, J. (2014). Chronic inflammation (inflammaging) and its potential contribution to age-associated diseases. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 69 Suppl 1, S4-9.
150. Lopez-Otin, C., et al. (2013). The hallmarks of aging. *Cell* 153, 1194-1217.
151. Xie Y., Rosser J.M., Thompson T.L., Boeke J.D. (2011). An W. Characterization of L1 retrotransposition with high-throughput dual-luciferase assays. *Nucleic Acids Res.* 39: e16.
- 25

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

- <110> BROWN UNIVERSITY
- 30 <120> КОМПОЗИЦІЇ ТА СПОСОБИ ЛІКУВАННЯ, ЗАПОБІГАННЯ ТА ОБЕРНЕННЯ
ПОВ'ЯЗАНОГО З ВІКОМ ЗАПАЛЕННЯ ТА РОЗЛАДІВ
- <130> 405505-571001WO
- <140> PCT/US2020/015043
- <141> 2020-01-24
- 35 <150> 62/907,251
- <151> 2019-09-27
- <150> 62/797,109
- <151> 2019-01-25
- <160> 114
- 40 <170> PatentIn версії 3.5
- <210> 1
- <211> 20
- <212> ДНК
- <213> Штучна послідовність
- 45 <220>
- <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер
- <400> 1
- aaagtttctt atggccgggc 20
- <210> 2
- 50 <211> 20
- <212> ДНК
- <213> Штучна послідовність
- <220>
- <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер
- 55 <400> 2
- gctgaacttg tggccgttta 20
- <210> 3
- <211> 21
- <212> ДНК
- 60 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний олігонуклеотид
 <400> 3
 aagacacatg cacacgtatg t 21
 5 <210> 4
 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 10 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний олігонуклеотид
 <400> 4
 aacaggagcg atgagtctgt a 21
 <210> 5
 <211> 20
 15 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний олігонуклеотид
 <400> 5
 20 gtgtatatca gcctcgtgtt 20
 <210> 6
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 25 <220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер
 <400> 6
 gccaaagatgg ccgaatagga 20
 <210> 7
 30 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер
 35 <400> 7
 aaatcacccg tcttctgcgt 20
 <210> 8
 <211> 20
 <212> ДНК
 40 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер
 <400> 8
 cgagatcaaa ctgcaaggcg 20
 45 <210> 9
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 50 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер
 <400> 9
 ccggccgctt tgtttaccta 20
 <210> 10
 <211> 19
 55 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер
 <400> 10
 60 тааасааагс ggccgggaa 19

<210> 11
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 5 <220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер
 <400> 11
 agaggtggag cctacagagg 20
 <210> 12
 10 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер
 15 <400> 12
 agagagcagt ggtctccca 20
 <210> 13
 <211> 20
 <212> ДНК
 20 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер
 <400> 13
 cagtctgccc gttctcagat 20
 25 <210> 14
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 30 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер
 <400> 14
 acctgaaagt gacggggaga 20
 <210> 15
 <211> 20
 35 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер
 <400> 15
 40 cctgccttgc tagattgggg 20
 <210> 16
 <211> 23
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 45 <220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер
 <400> 16
 caaacaccgc atatttcac tca 23
 <210> 17
 50 <211> 23
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер
 55 <400> 17
 cttcctgtgt ccatgtgatc tca 23
 <210> 18
 <211> 15
 <212> ДНК
 60 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний зонд
 <400> 18
 aggtgggaat tgaac 15
 5 <210> 19
 <211> 23
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 10 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер
 <400> 19
 ctggtctgat ctggaagct aag 23
 <210> 20
 <211> 20
 15 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер
 <400> 20
 20 gcggtctccc atccaagtac 20
 <210> 21
 <211> 14
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 25 <220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний зонд
 <400> 21
 agggtcgggc ctgg 14
 <210> 22
 30 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер
 35 <400> 22
 ttgaggtcaa tgaaggggtc 20
 <210> 23
 <211> 20
 <212> ДНК
 40 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер
 <400> 23
 gaaggtgaag gtcggagtca 20
 45 <210> 24
 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 50 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер
 <400> 24
 ccaggagtga gtggaagaca g 21
 <210> 25
 <211> 20
 55 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер
 <400> 25
 60 ctagttgcct ccccaagca 20

<210> 26
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 5 <220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер
 <400> 26
 ttgatggcaa ccagttccag 20
 <210> 27
 10 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер
 15 <400> 27
 tcatcccaag cagcagatga 20
 <210> 28
 <211> 20
 <212> ДНК
 20 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер
 <400> 28
 tgttcccaag cagcagatga 20
 25 <210> 29
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 30 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер
 <400> 29
 acgccgcatt gaccatctat 20
 <210> 30
 <211> 20
 35 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер
 <400> 30
 40 gtctcattcc agccagtgtc 20
 <210> 31
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 45 <220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер
 <400> 31
 actctcacct cccatgttgc 20
 <210> 32
 50 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер
 55 <400> 32
 atccgtgcac tcctgttctg 20
 <210> 33
 <211> 20
 <212> ДНК
 60 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер
 <400> 33
 5 ccaagaagcg ctctgctgta 20
 <210> 34
 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 10 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер
 <400> 34
 gcaggggatt ctgcatcact a 21
 <210> 35
 <211> 19
 15 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер
 <400> 35
 20 agtcgcccac ccctcagat 19
 <210> 36
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 25 <220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер
 <400> 36
 ttccctcag cgtgtagctt 20
 <210> 37
 30 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер
 35 <400> 37
 tcccctcgg atcttaacac 20
 <210> 38
 <211> 20
 <212> ДНК
 40 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер
 <400> 38
 cgaaaaagat gaggtctgc 20
 45 <210> 39
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 50 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер
 <400> 39
 ggaagaccgg ccagctagag 20
 <210> 40
 <211> 20
 55 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер
 <400> 40
 60 tgaaggagta gtgggggtcc 20

<210> 41
 <211> 24
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 5 <220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер
 <400> 41
 agccttccaa ctctggagta atgt 24
 10 <210> 42
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер
 15 <400> 42
 ccgatgatct cccctgaca 20
 <210> 43
 <211> 24
 <212> ДНК
 20 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер
 <400> 43
 cccaccttac atacaggatt gtga 24
 25 <210> 44
 <211> 23
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 30 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер
 <400> 44
 cccagacttt cagagcttcc tca 23
 <210> 45
 <211> 22
 35 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер
 <400> 45
 40 cactggcaga aaacaacctg aa 22
 <210> 46
 <211> 22
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 45 <220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер
 <400> 46
 accaggcaag tctcctcatt ga 22
 <210> 47
 50 <211> 24
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер
 55 <400> 47
 gtttttgaag agggctgaga attc 24
 <210> 48
 <211> 24
 <212> ДНК
 60 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер
 <400> 48
 5 ccctacaaca gaccsacasa atas 24
 <210> 49
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 10 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер
 <400> 49
 aagaccattg tggccaagga 20
 <210> 50
 <211> 19
 15 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер
 <400> 50
 20 ttccgagttt gggtttgct 19
 <210> 51
 <211> 22
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 25 <220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер
 <400> 51
 agaatgggca gaaagcttgt ct 22
 <210> 52
 30 <211> 22
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер
 35 <400> 52
 ccttctgggc agttggattt gc 22
 <210> 53
 <211> 22
 <212> ДНК
 40 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер
 <400> 53
 cgccagtgaa atgatggctt at 22
 45 <210> 54
 <211> 22
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 50 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер
 <400> 54
 ctggaaggag cacttcatct gt 22
 <210> 55
 <211> 20
 55 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер
 <400> 55
 60 caactgaggc ccccttcaa 20

<210> 56
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 5 <220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер
 <400> 56
 cgcccgttgt agatgaaggt 20
 <210> 57
 10 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер
 15 <400> 57
 ggctggaaaa csaacttccg 20
 <210> 58
 <211> 20
 <212> ДНК
 20 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер
 <400> 58
 gttatcccg agcatcacga 20
 25 <210> 59
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 30 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер
 <400> 59
 tggagaccsa aagggttga 20
 <210> 60
 <211> 20
 35 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер
 <400> 60
 40 aggaagcagg aggtctcacc 20
 <210> 61
 <211> 22
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 45 <220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер
 <400> 61
 acgtgctgtg aaaасааага ag 22
 <210> 62
 50 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер
 55 <400> 62
 gtcccaactga ctgtcttgag g 21
 <210> 63
 <211> 20
 <212> ДНК
 60 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер
 <400> 63
 atatctgcgg ctgacctgc 20
 5 <210> 64
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 10 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер
 <400> 64
 ggtctgctgg ggcagttat 20
 <210> 65
 <211> 22
 15 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер
 <400> 65
 20 gagactctca gggtcgaaaa cg 22
 <210> 66
 <211> 19
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 25 <220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер
 <400> 66
 ttctgtggg cggattagg 19
 <210> 67
 30 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер
 35 <400> 67
 cggaaggtcc ctgacatc 20
 <210> 68
 <211> 20
 <212> ДНК
 40 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер
 <400> 68
 ccctgtagga ccttcggtga 20
 45 <210> 69
 <211> 18
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 50 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер
 <400> 69
 cggccgcatc ttctgtg 18
 <210> 70
 <211> 18
 55 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер
 <400> 70
 60 gtgaccaggc gccaata 18

<210> 71
 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 5 <220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер
 <400> 71
 ссассасссct gctctgtact a 21
 <210> 72
 10 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер
 15 <400> 72
 cctctccatg gtgcacttcc 20
 <210> 73
 <211> 20
 <212> ДНК
 20 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер
 <400> 73
 cgtgaccttt gtgagсаасg 20
 25 <210> 74
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 30 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер
 <400> 74
 ctgctccata ctcgctctgg 20
 <210> 75
 <211> 18
 35 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер
 <400> 75
 40 tctgatgcag caggtggg 18
 <210> 76
 <211> 24
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 45 <220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер
 <400> 76
 agggctctcc agacttctgc tctg 24
 <210> 77
 50 <211> 18
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер
 55 <400> 77
 ctctgagcg cagccttg 18
 <210> 78
 <211> 20
 <212> ДНК
 60 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер
 <400> 78
 5 gttcttactg ctggggccat 20
 <210> 79
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 10 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер
 <400> 79
 tctgctttat ggggcttcgg 20
 <210> 80
 <211> 20
 15 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер
 <400> 80
 20 tcgactccca tactcccagg 20
 <210> 81
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 25 <220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер
 <400> 81
 ctgccttgca agaagagagc 20
 <210> 82
 30 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер
 35 <400> 82
 agtgctgcgt tctgatgatg 20
 <210> 83
 <211> 16
 <212> ДНК
 40 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер
 <400> 83
 ccagggccgt gtgcat 16
 45 <210> 84
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 50 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер
 <400> 84
 tacgtgaacg ttgccatca 20
 <210> 85
 <211> 20
 55 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер
 <400> 85
 60 gactcaaggg tggatgctgt 20

<210> 86
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 5 <220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер
 <400> 86
 ccaactgcga agatccactg 20
 <210> 87
 10 <211> 23
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер
 15 <400> 87
 cggaaggag acttcacaga gga 23
 <210> 88
 <211> 23
 <212> ДНК
 20 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер
 <400> 88
 ttccacgat ttccagaga aca 23
 25 <210> 89
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 30 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер
 <400> 89
 ggaagggca catgaccagg 20
 <210> 90
 <211> 20
 35 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер
 <400> 90
 40 agctgctctt ggtcggaag 20
 <210> 91
 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 45 <220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер
 <400> 91
 ctggctgcat ccattatgtc a 21
 <210> 92
 50 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер
 55 <400> 92
 tggtagactg cccgtgtgaa 20
 <210> 93
 <211> 20
 <212> ДНК
 60 <213> Штучна послідовність

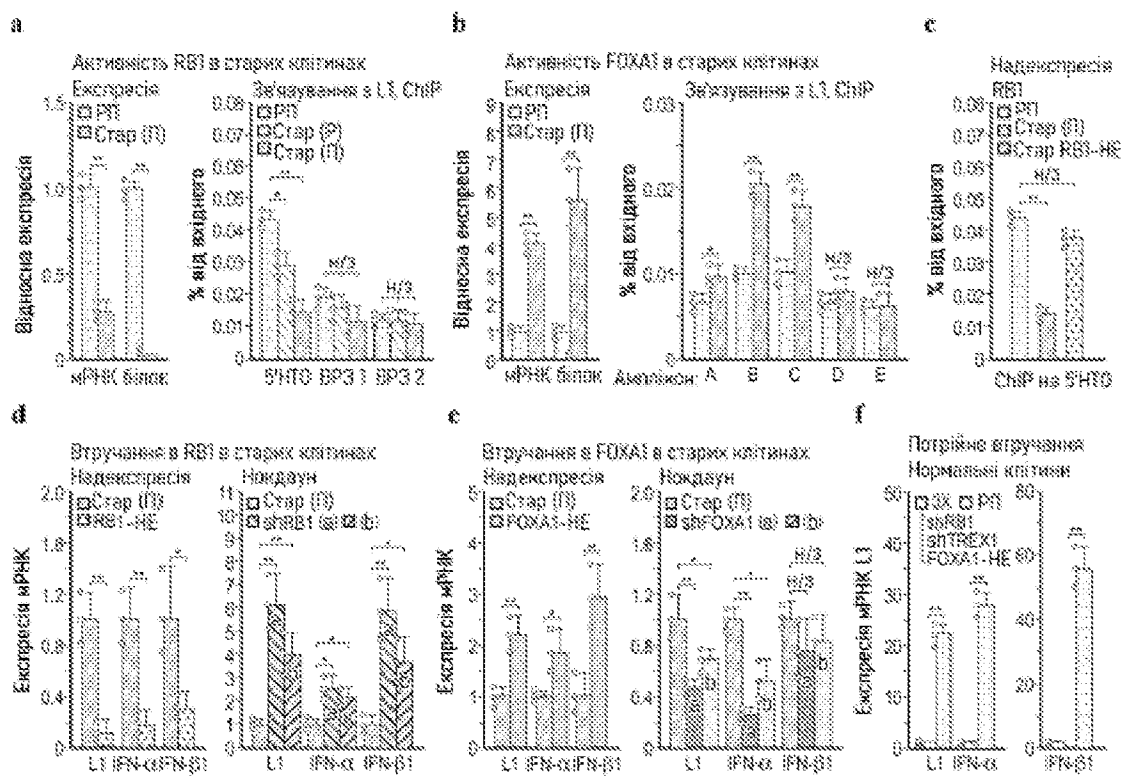
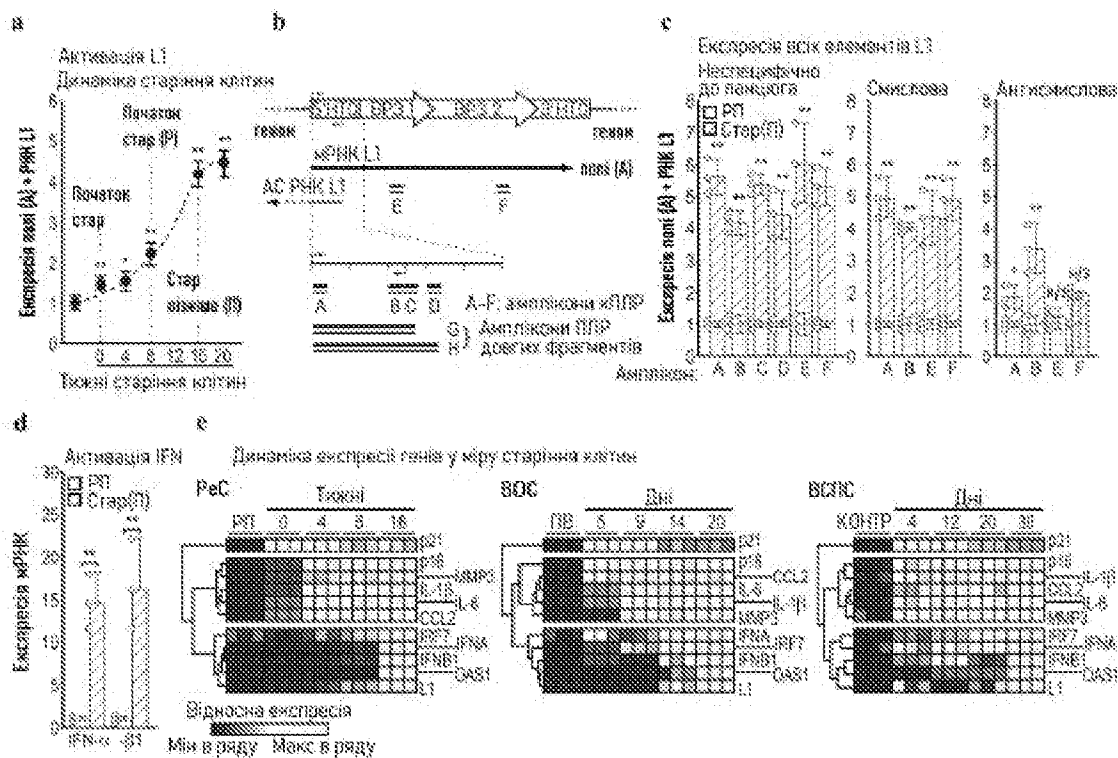
<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер
 <400> 93
 ctgctggct atgattatgg 20
 5 <210> 94
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 10 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер
 <400> 94
 aggttgctgt cgtctgtagt 20
 <210> 95
 <211> 21
 15 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер
 <400> 95
 20 acttttcctt aacgtgggsc t 21
 <210> 96
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 25 <220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер
 <400> 96
 catctcggcc agtgtctgtt 20
 <210> 97
 30 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер
 35 <400> 97
 ttcggtcgc tggatctcta 20
 <210> 98
 <211> 20
 <212> ДНК
 40 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер
 <400> 98
 tcaaggagaа ассассасgg 20
 45 <210> 99
 <211> 22
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 50 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер
 <400> 99
 agaagcgagc actgcaaggt tg 22
 <210> 100
 <211> 22
 55 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер
 <400> 100
 60 ggaagatgga ctccacctgg tt 22

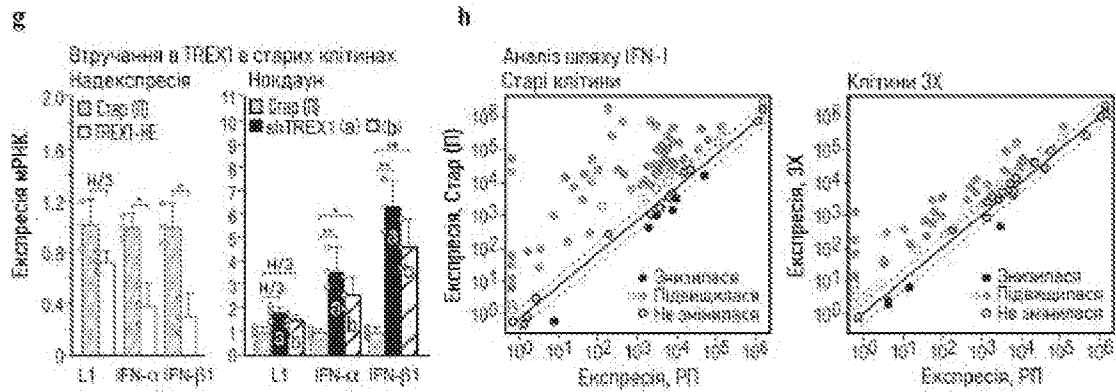
<210> 101
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 5 <220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер
 <400> 101
 ttcgctgatg cactgcctat 20
 10 <210> 102
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер
 15 <400> 102
 ggaatgcsag tggtcttcca 20
 <210> 103
 <211> 20
 <212> ДНК
 20 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер
 <400> 103
 atctgtctcc caggctctgt 20
 25 <210> 104
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 30 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер
 <400> 104
 tcctccgttt accttctgcc 20
 <210> 105
 <211> 20
 35 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер
 <400> 105
 40 gcttcggtga agtagctgga 20
 <210> 106
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 45 <220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер
 <400> 106
 ttcgtagag tcacgscgag 20
 <210> 107
 50 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер
 55 <400> 107
 agccaaatgg atggacctgg 20
 <210> 108
 <211> 20
 <212> ДНК
 60 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер
 <400> 108
 aaggaggggc atagtgtcca 20
 5 <210> 109
 <211> 19
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 10 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер
 <400> 109
 atccggacca gaggaagg 19
 <210> 110
 <211> 16
 15 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер
 <400> 110
 20 atggcgaccg ctgctg 16
 <210> 111
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 25 <220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер
 <400> 111
 agagaaccgg acccaatcca 20
 <210> 112
 30 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер
 35 <400> 112
 gcttggtccc ctactcagac 20
 <210> 113
 <211> 20
 <212> ДНК
 40 <213> Штучна послідовність
 <220>
 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер
 <400> 113
 tccccacggg atcctaagac 20
 45 <210> 114
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність
 <220>
 50 <223> Опис штучної послідовності: Синтетичний праймер
 <400> 114
 ctctgcaggc aagctctctt 20

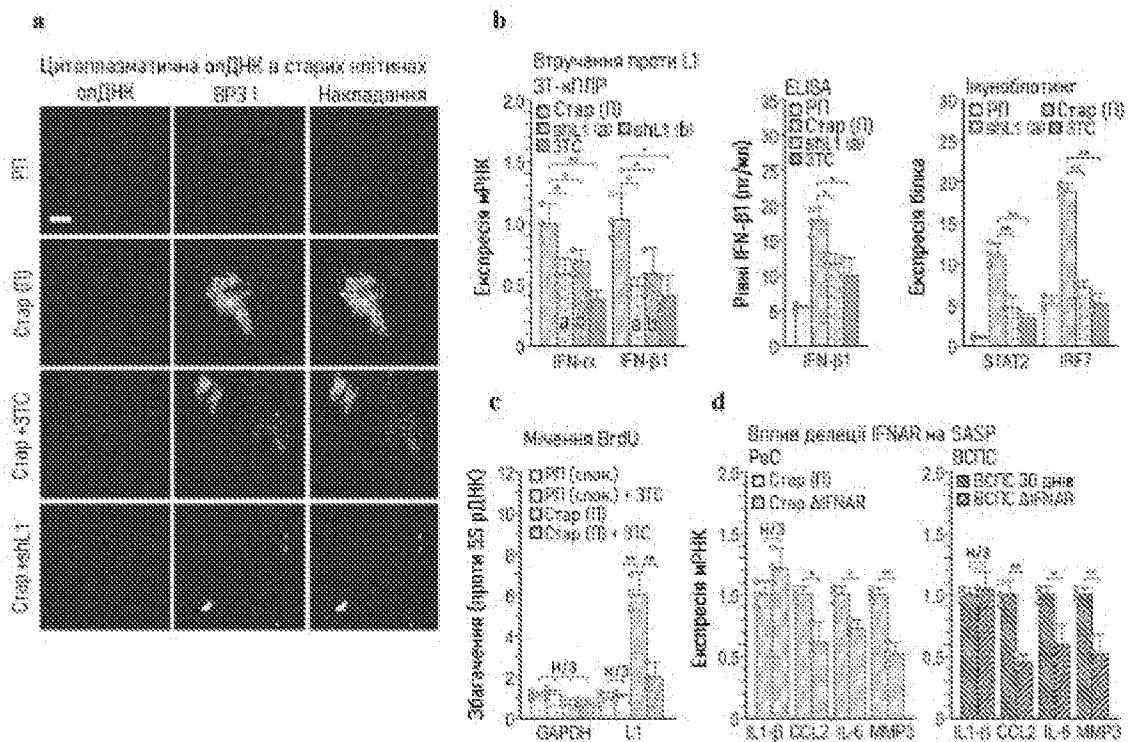
ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Спосіб лікування пов'язаного з віком запалення у пацієнта, який цього потребує, який включає введення терапевтично ефективної кількості інгібітора зворотної транскриптази (ІЗТ) пацієнту, причому зазначений ІЗТ включає 4'-етиніл-2'-фтор-2'-дезоксіденозин, ценсавудин або ельвудитабін, у якому пов'язане з віком запалення пов'язане з підвищенням експресії довгого диспергованого елемента-1 (L1), накопиченням цитоплазматичної кДНК довгого диспергованого елемента-1 (L1), активацією відповіді інтерферону I типу (IFN-I) або посиленням прозапального стану асоційованого зі старінням клітин секреторного фенотипу (SASP); та пов'язане з віком запалення спостерігають у пацієнта, що страждає на захворювання або розлад, вибрані з групи, що складається з: хвороби Альцгеймера, бічного аміотрофічного склерозу (БАС), хвороби Паркінсона, хвороби Гентінгтона, втрати зору, втрати слуху, дисфункції серцево-судинної системи, лобно-скроневої деменції (ЛСД), розсіяного склерозу (РС), синдрому Айкарді-Гут'єрес, прогресуючого над'ядерного паралічу (ПНП), остеоартриту, атеросклерозу, остеопорозу та фіброзу легенів.
2. Спосіб за п. 1, у якому пов'язане з віком запалення присутнє у пацієнта, у якого є хвороба Альцгеймера.
3. Спосіб за п. 1, у якому пов'язане з віком запалення присутнє у пацієнта, у якого є БАС.
4. Спосіб за п. 1, у якому пов'язане з віком запалення присутнє у пацієнта з хворобою Паркінсона.
5. Спосіб за п. 1, у якому пов'язане з віком запалення присутнє у пацієнта з хворобою Гентінгтона.
6. Спосіб за п. 1, у якому пов'язане з віком запалення присутнє у пацієнта з ЛСД.
7. Спосіб за п. 1, у якому пов'язане з віком запалення присутнє у пацієнта з РС.
8. Спосіб за п. 1, у якому пов'язане з віком запалення присутнє у пацієнта із синдромом Айкарді-Гут'єрес.
9. Спосіб за п. 1, у якому пов'язане з віком запалення присутнє у пацієнта з ПНП.
10. Спосіб за п. 1, у якому пов'язане з віком запалення присутнє у пацієнта з остеоартритом.
11. Спосіб за п. 1, у якому пацієнт страждає на хворобу Альцгеймера або БАС та відчуває ослаблення одного або більше симптомів хвороби Альцгеймера або БАС у порівнянні з такими перед першим введенням пацієнту.
12. Спосіб за п. 11, у якому пацієнт страждає на хворобу Альцгеймера, та один або більше симптомів включають втрату пам'яті, розміщення предметів не на тих місцях, забування назв місць або об'єктів, повторення питань, меншу пристосованість до нових обставин, замішання, дезорієнтацію, обсесивну поведінку, компульсивну поведінку, марення, афазію, порушення сну, перепади настрою, депресію, тривогу, фрустрацію, збуджений стан, труднощі при виконанні просторових завдань, агнозію, труднощі при пересуванні, втрату маси, втрату здатності говорити, втрату короткочасної пам'яті або втрату довготривалої пам'яті.
13. Спосіб за п. 1, у якому пацієнт страждає на хворобу Альцгеймера, та зменшення одного або більше симптомів оцінюють згідно з DSM-5.
14. Спосіб за п. 1, у якому пацієнт страждає на хворобу Альцгеймера, та зменшення симптомів визначають, використовуючи когнітивну субшкалу шкали оцінювання важкості хвороби Альцгеймера (ADAS-cog).
15. Спосіб за п. 1, у якому пацієнт страждає на хворобу Альцгеймера, та зменшення симптомів визначають, використовуючи шкалу оцінювання змін клініцистом на підставі опитування (CIBIC-plus).
16. Спосіб за п. 1, у якому пацієнт страждає на хворобу Альцгеймера, та зменшення симптомів визначають із застосуванням шкали оцінки повсякденної діяльності (ADL).
17. Спосіб за будь-яким з пп. 1-16, який додатково включає введення щонайменше одного другого терапевтичного агента пацієнту.
18. Спосіб за п. 17, у якому пацієнт страждає на хворобу Альцгеймера, та щонайменше один другий терапевтичний агент є корисним для лікування симптомів хвороби Альцгеймера.
19. Спосіб за п. 17, у якому пацієнт страждає на БАС, та щонайменше один другий терапевтичний агент є корисним для лікування БАС.

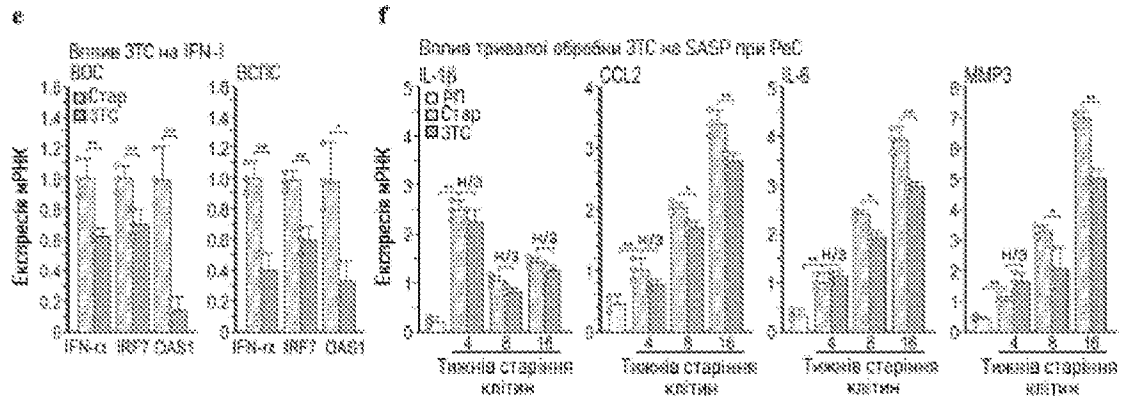




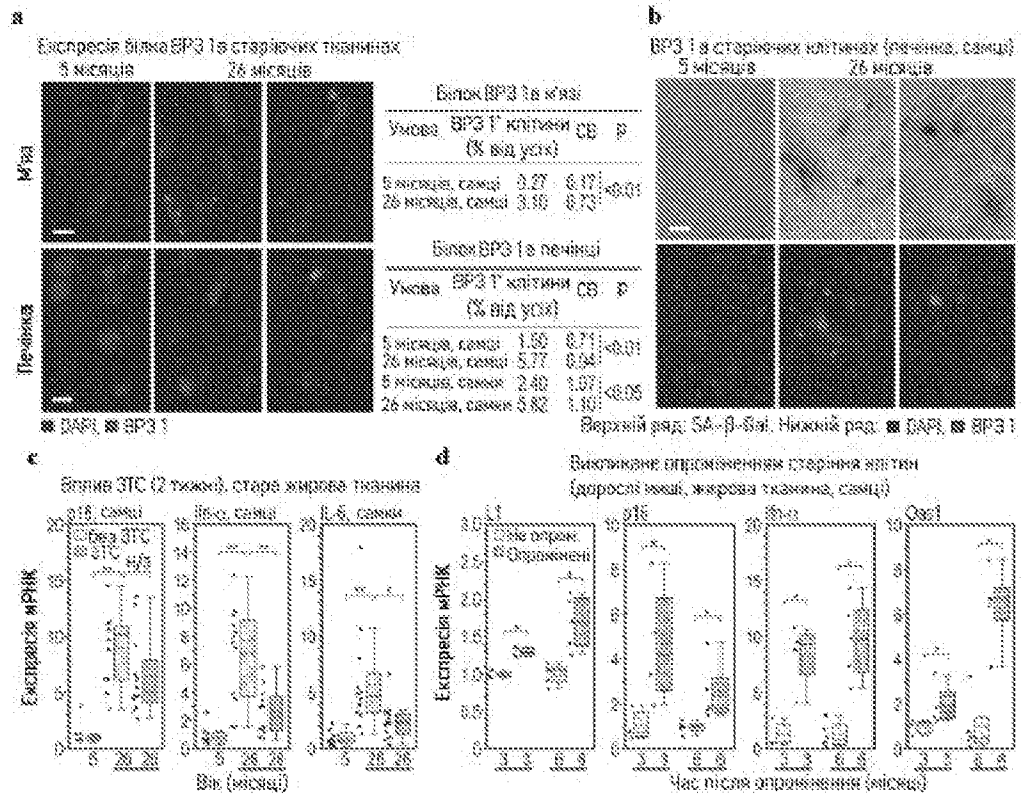
Фіг. 2 (продовження)



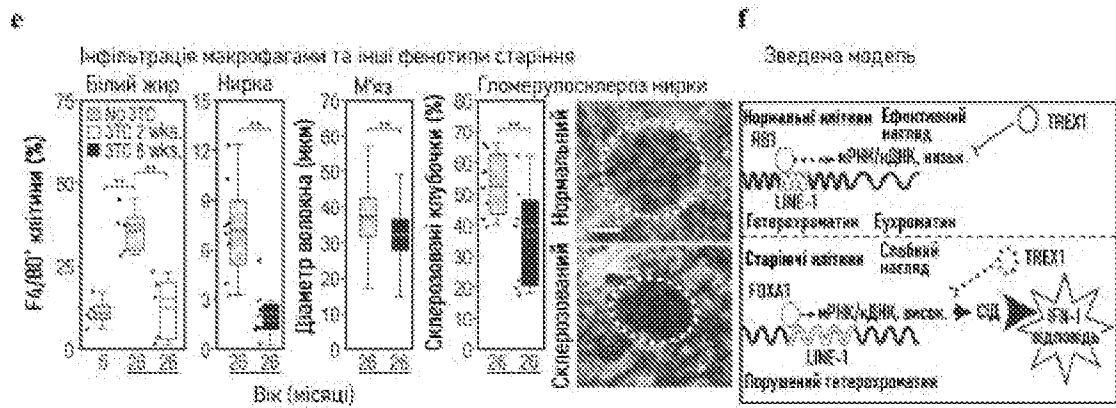
Фіг. 3



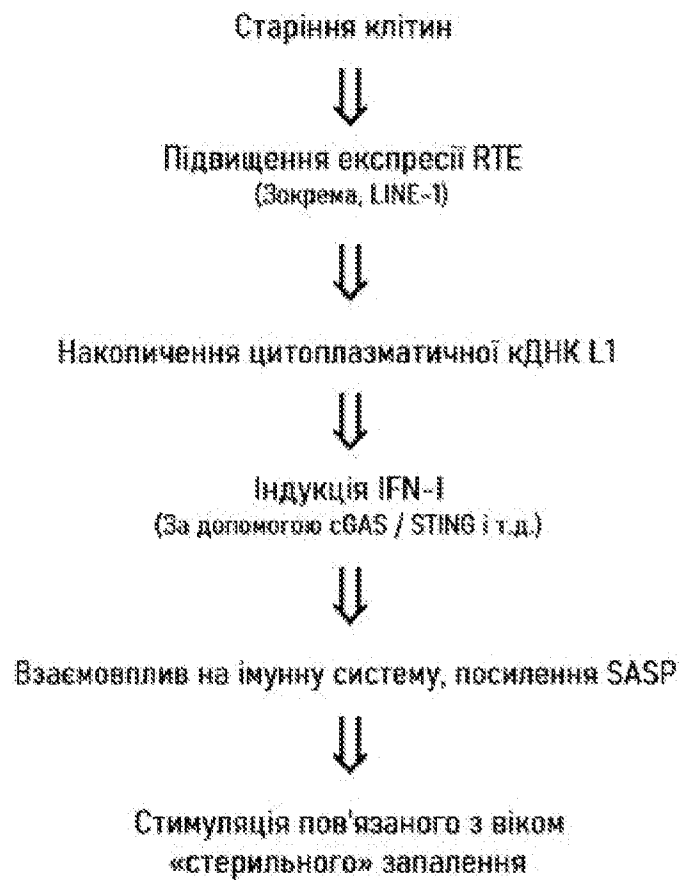
Фіг. 3 (продовження)



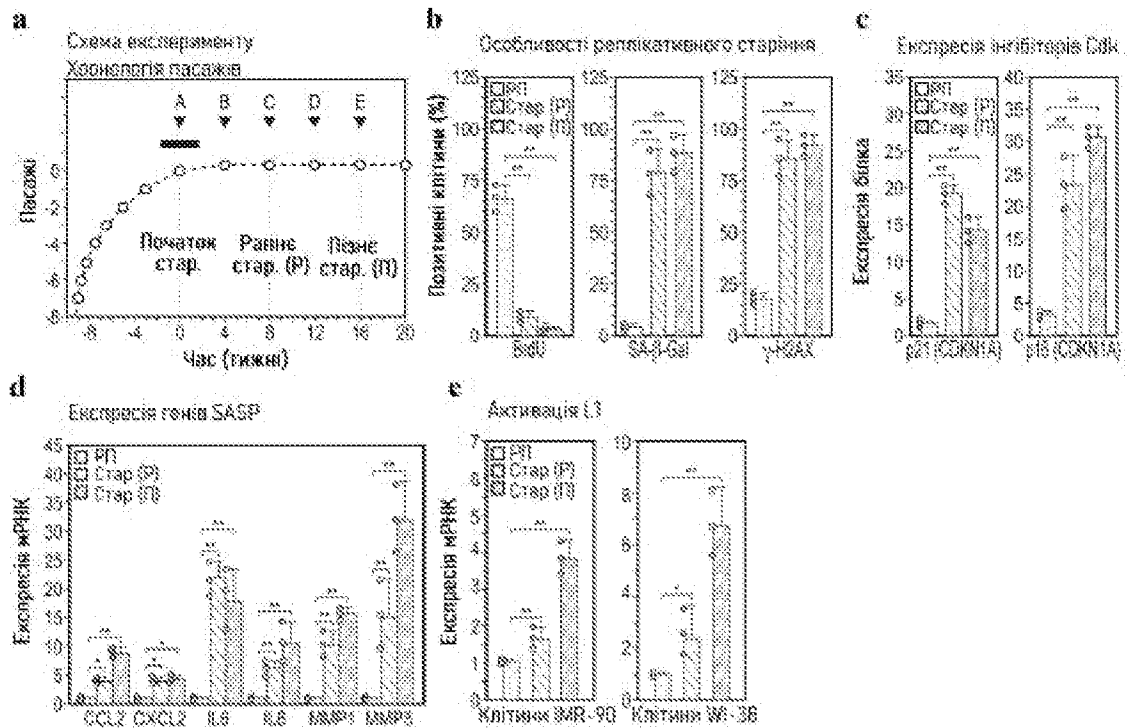
Фіг. 4



РОЛЬ СТАРІННЯ КЛІТИН В ПОВ'ЯЗАНОМУ З ВІКОМ ЗАПАЛЕННІ



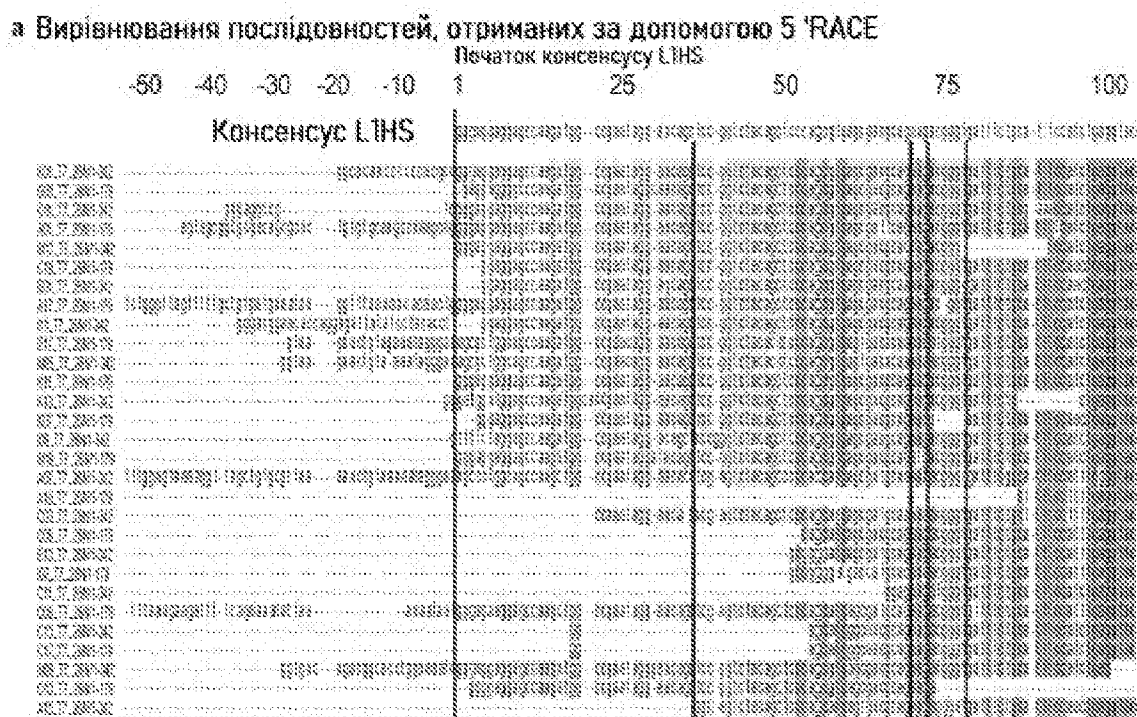
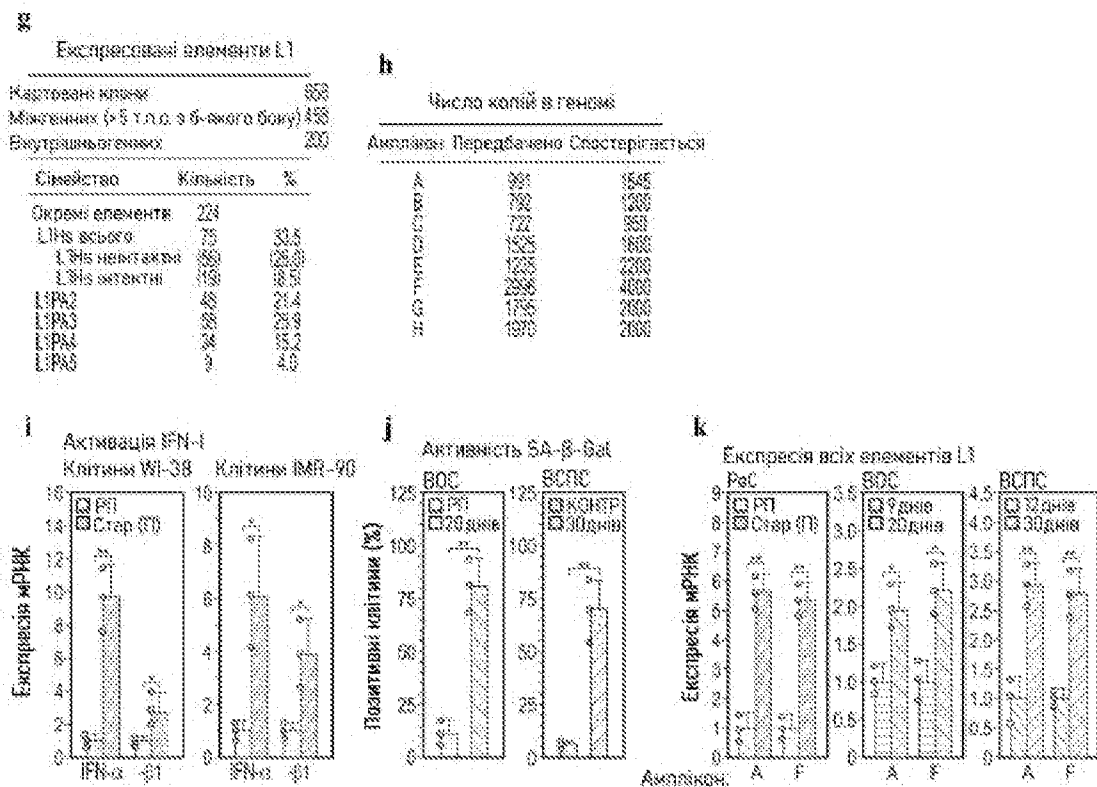
Фіг. 5

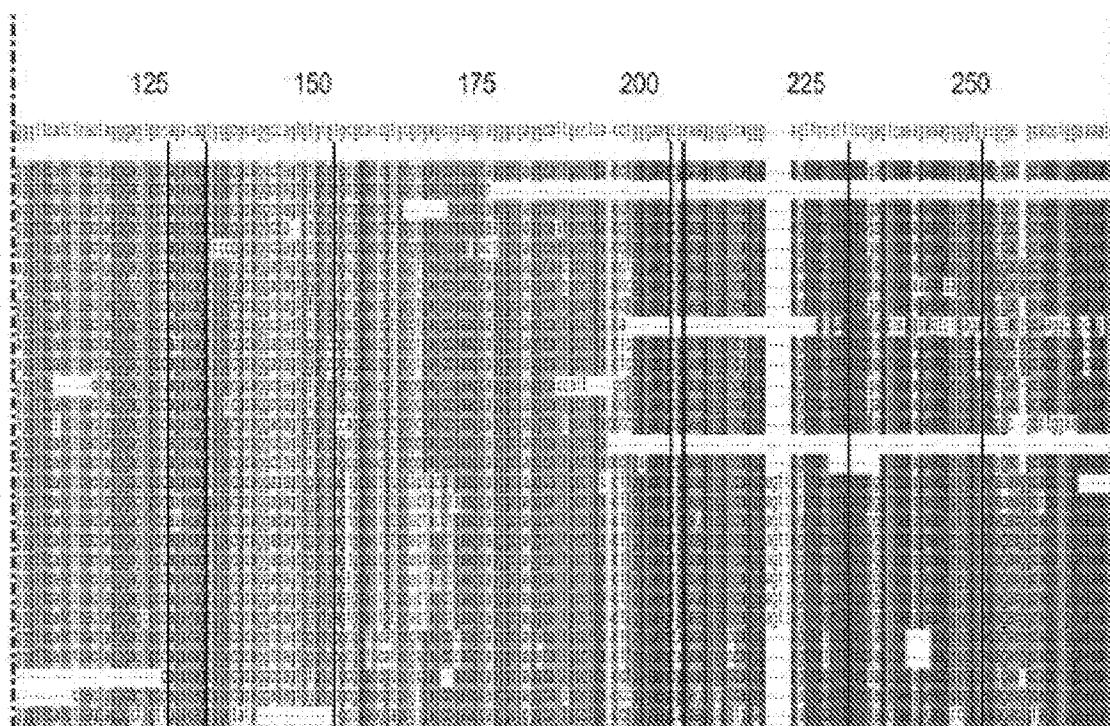


Фіг. 6

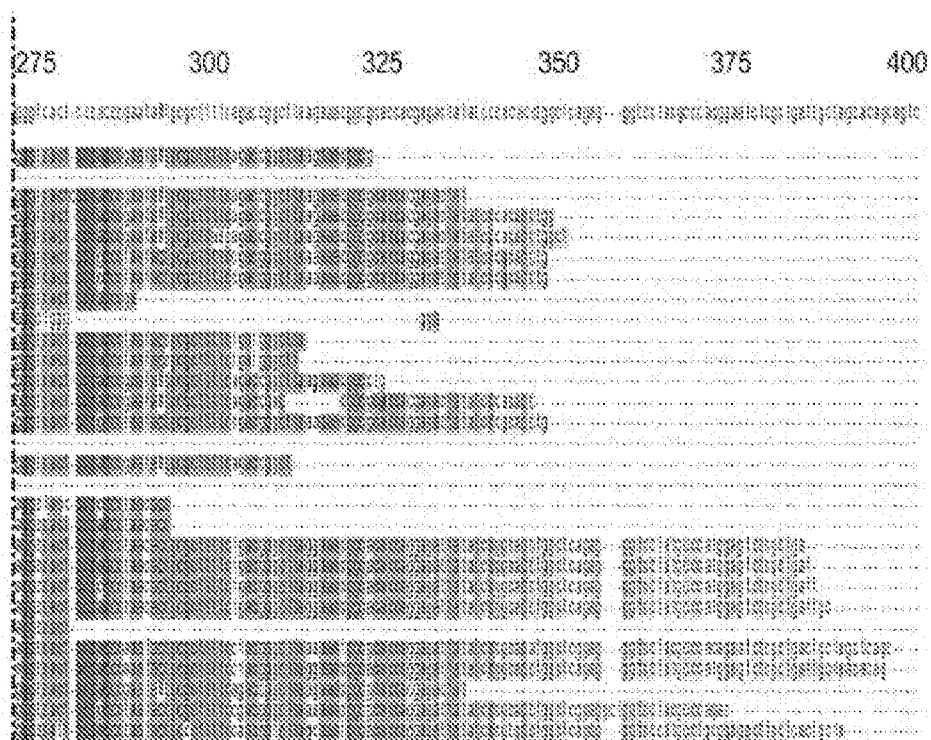


Фіг. 6 (продовження)

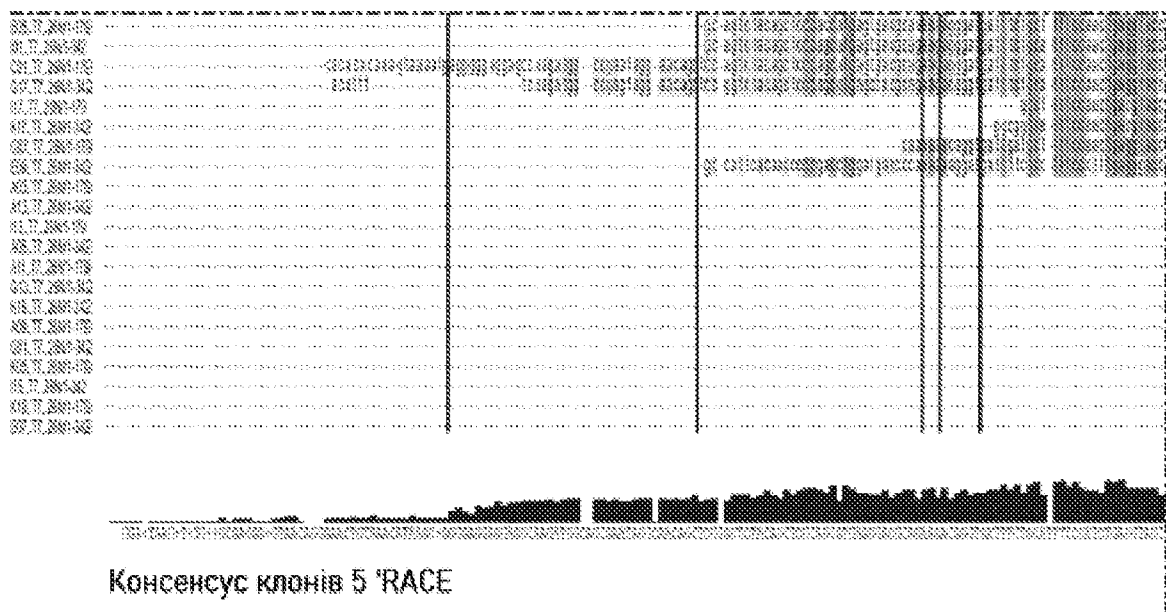




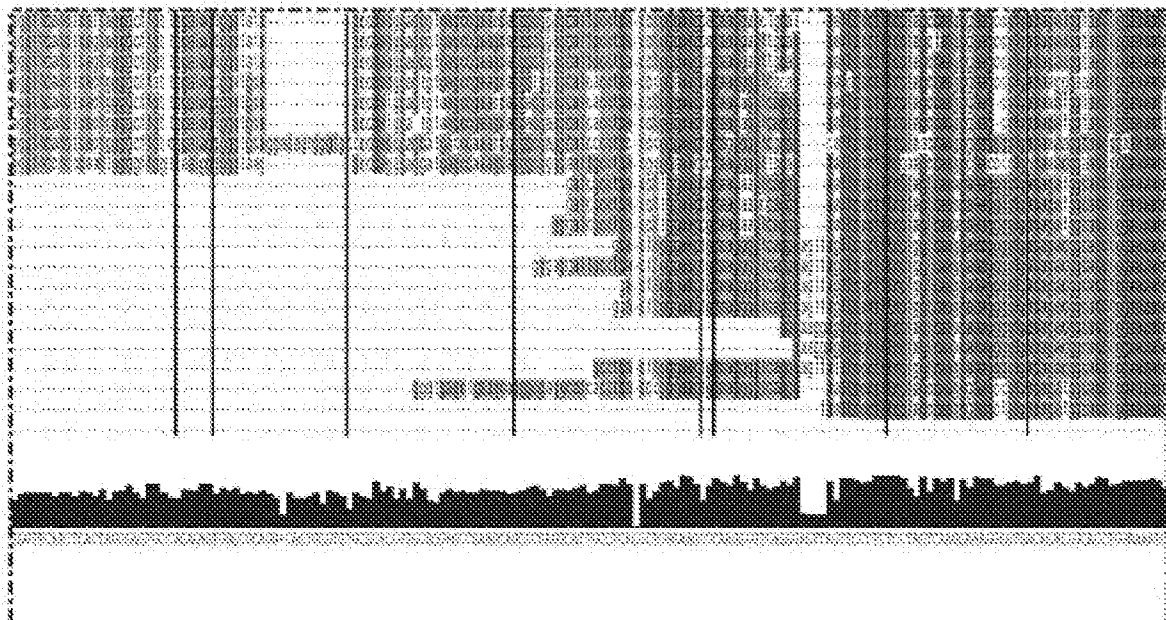
Фіг. 7 (продовження)

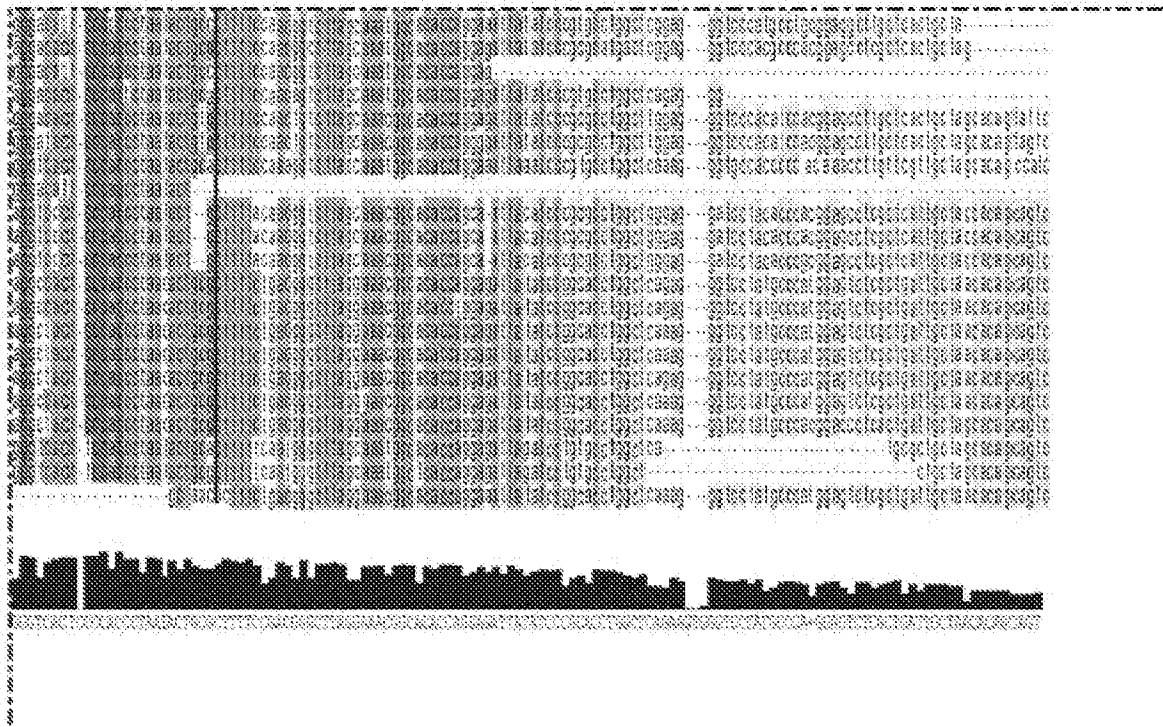


Фіг. 7 (продовження)



Фіг. 7 (продовження)





Фіг. 7 (продовження)

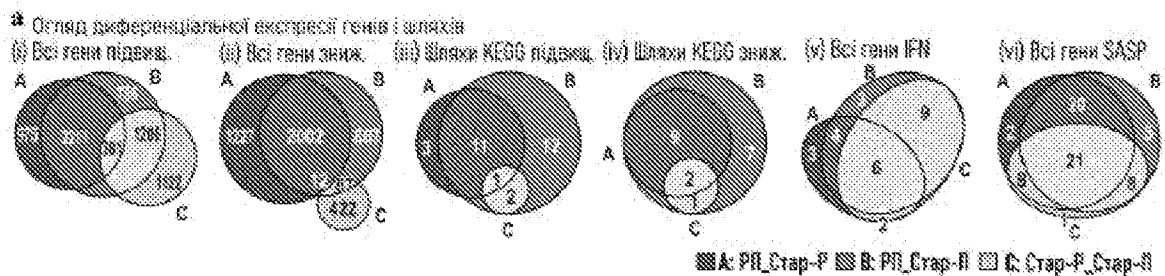
b

Зведені дані з RACE

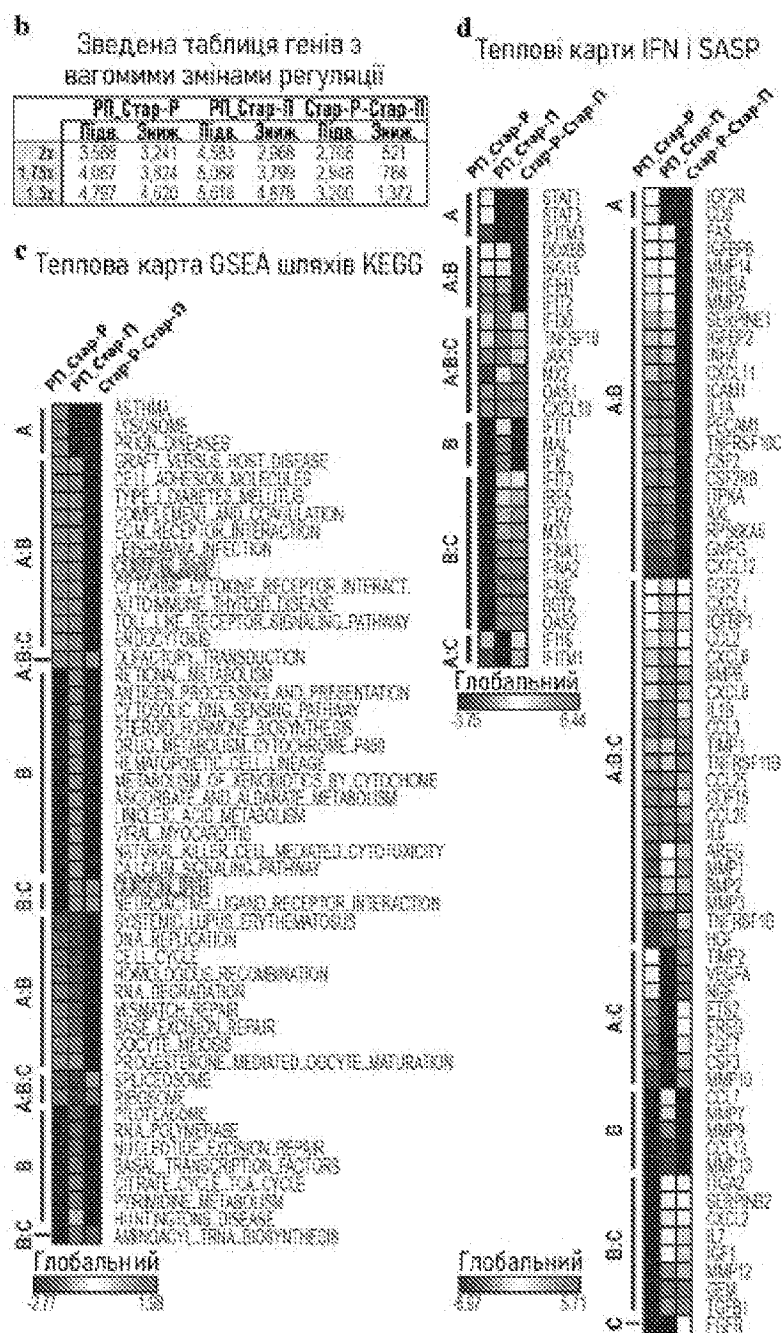
Секвеновані клони	59
Початок: <-40 п.о.	4
від -25 п.о. до +25 п.о.	28
від +25 п.о. до +100 п.о.	8
> +100 п.о.	12

Сім'яство	Кількість	%
L3H5	8	16
L3PA2	9	18
L3PA3	11	22
L3PA4	7	14
L3PA5	6	16
L3PA7	2	4
L3P1	5	10

Фіг. 7 (продовження)



Фіг. 8



Фіг. 8 (продовження)

е Аналіз GSEA всіх шляхів KEGG

Підвищення експресії між раннім пасажем і раннім старінням клітин (P0_Стар-P_Підв.)

Назва шляху	Розмір HPO	p-знач.Ном	p-знач.FDR
ASTHMA	28	1.7864	<1.00E-03
GRAFT VERSUS HOST DISEASE	35	1.7654	<1.00E-03
CELL ADHESION MOLECULES CAMS	127	1.7638	<1.00E-03
OLFACTORY TRANSDUCTION	367	1.7468	<1.00E-03
TYPE 1 DIABETES MELLITUS	41	1.7340	<1.00E-03
LYSOSOME	119	1.6878	<1.00E-03
COMPLEMENT AND COAG. CASCADES	67	1.6859	<1.00E-03
ECM RECEPTOR INTERACTION	84	1.5487	<1.00E-03
LEISHMANIA INFECTION	56	1.6559	1.70E-03
CUSTOM SASP	35	1.6517	1.80E-03
PRION DISEASES	34	1.6397	1.84E-03
CYTOKINE CYTOKINE RECEPTOR INTERACT	254	1.5705	1.62E-03
TOLL LIKE RECEPTOR SIGNALING PATHWAY	99	1.4920	1.73E-03
AUTOMMUNE THYROID DISEASE	48	1.5335	3.77E-03
ENDOCYTOSIS	174	1.4427	5.21E-03

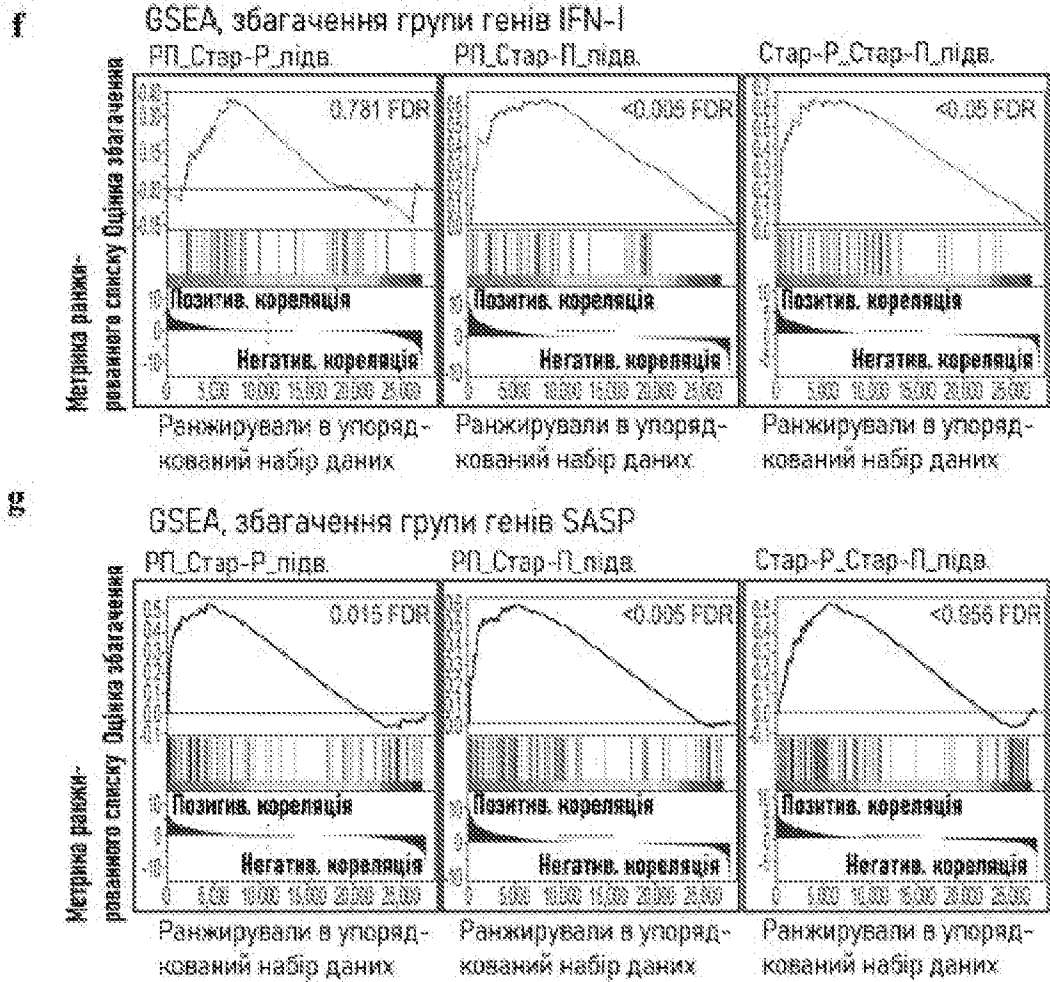
Підвищення експресії між раннім пасажем і пізнім старінням клітин (P0_Стар-P_Підв.)

Назва шляху	Розмір HPO	p-знач.Ном	p-знач.FDR
OLFACTORY TRANSDUCTION	367	1.9818	<1.00E-03
TYPE 1 DIABETES MELLITUS	41	1.7591	<1.00E-03
GRAFT VERSUS HOST DISEASE	35	1.7098	<1.00E-03
CELL ADHESION MOLECULES CAMS	127	1.6868	<1.00E-03
RETINOL METABOLISM	56	1.6689	<1.00E-03
CUSTOM SASP	35	1.6282	<1.00E-03
LEISHMANIA INFECTION	56	1.6760	<1.00E-03
CUSTOM FEN1	35	1.6248	<1.00E-03
COMPLEMENT AND COAG. CASCADES	67	1.6009	<1.00E-03
TOLL LIKE RECEPTOR SIGNALING PATHWAY	99	1.5759	<1.00E-03
NEUROACTIVE LIGAND RECEPTOR INTERACT	270	1.6349	<1.00E-03
CYTOKINE CYTOKINE RECEPTOR INTERACT	254	1.5008	<1.00E-03
HEMATOPOIETIC CELL LINEAGE	65	1.5269	1.07E-03
DRUG METABOLISM CYTOCHROME P450	63	1.5743	1.12E-03
ANTIGEN PROCESSING AND PRESENTATION	73	1.6286	1.08E-03
XENOBOTIC METAB. BY CYTOCHROME P450	62	1.5245	3.36E-03
NEUROACTIVE LIGAND RECEPTOR INTERACT	270	1.5816	3.42E-03
NEUROACTIVE LIGAND RECEPTOR INTERACT	270	1.5816	3.42E-03
ASCORBATE AND ALDARATE METABOLISM	21	1.5205	6.20E-03
CELLULAR CELL DEATH	123	1.5739	7.27E-03
STEROID HORMONE BIOSYNTHESIS	48	1.5533	7.94E-03
CALCIUM SIGNALING PATHWAY	173	1.3408	9.14E-03
LIPOLIC ACID METABOLISM	29	1.4904	1.00E-02
AUTOMMUNE THYROID DISEASE	48	1.5072	1.04E-02
ECM RECEPTOR INTERACTION	84	1.4315	1.09E-02

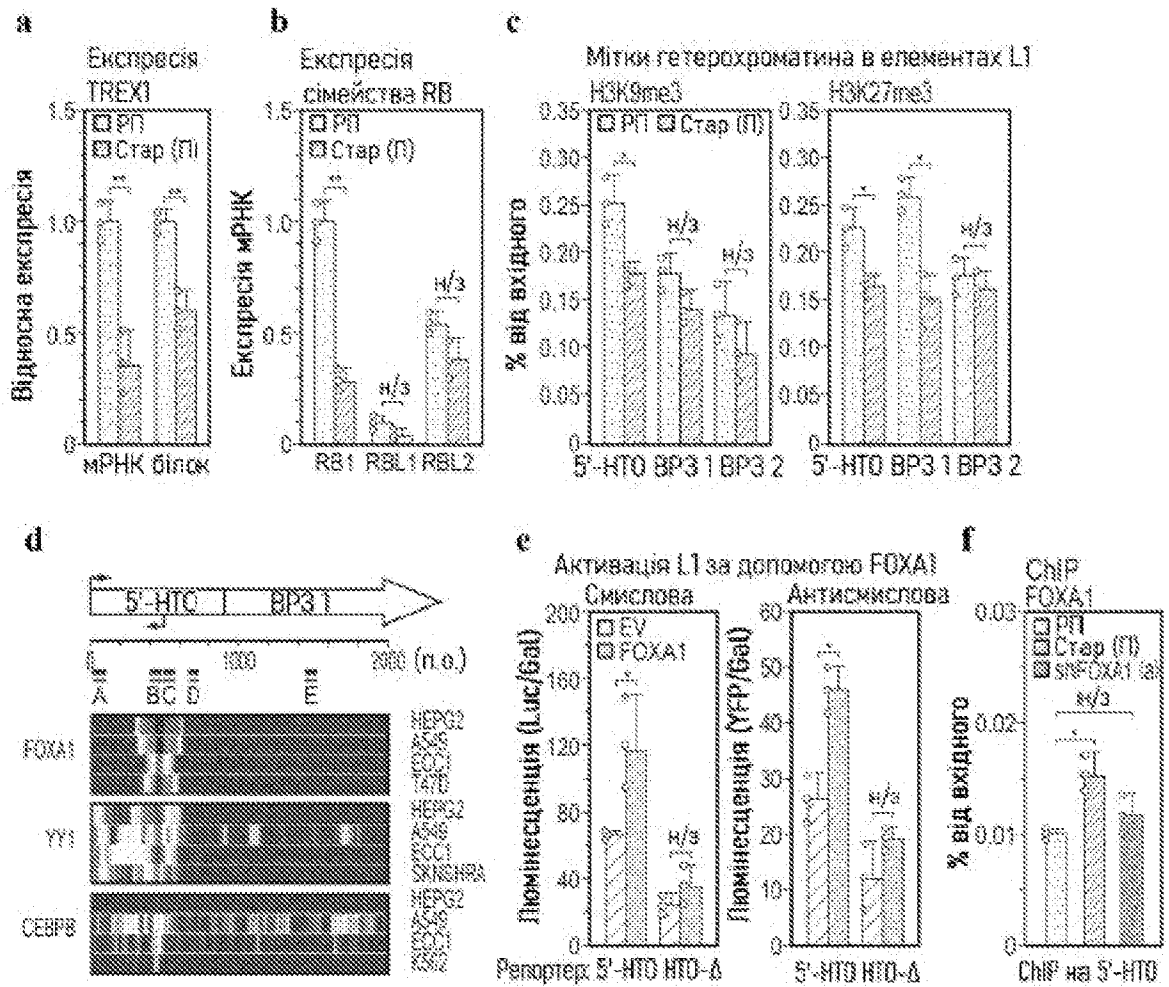
Підвищення експресії між раннім старінням клітин і пізнім старінням клітин (Стар-P_Стар-П_Підв.)

Назва шляху	Розмір HPO	p-знач.Ном	p-знач.FDR
OLFACTORY TRANSDUCTION	367	1.6009	<1.00E-03
CUSTOM FEN1	35	1.4722	<1.00E-03
NEUROACTIVE LIGAND RECEPTOR INTERACT	270	1.3253	<1.00E-03

Фіг. 8 (продовження)

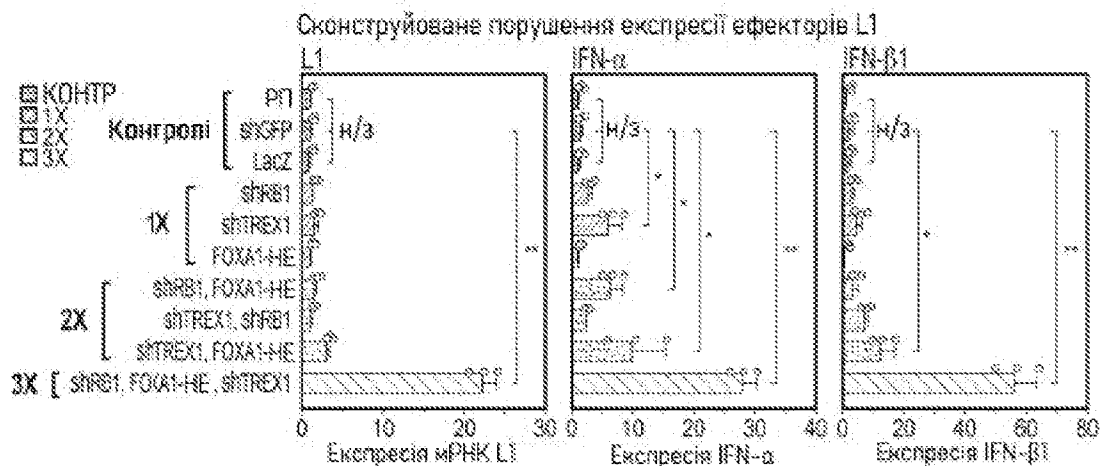


Фіг. 8 (продовження)

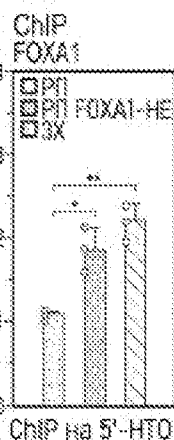
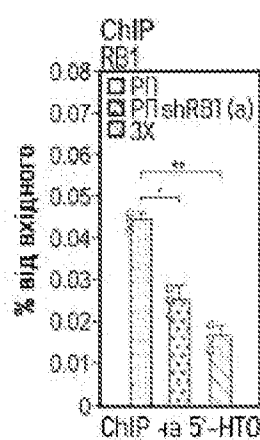


Фиг. 9

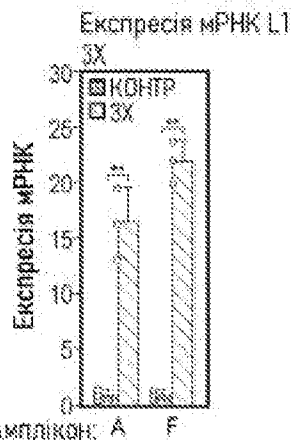
гг



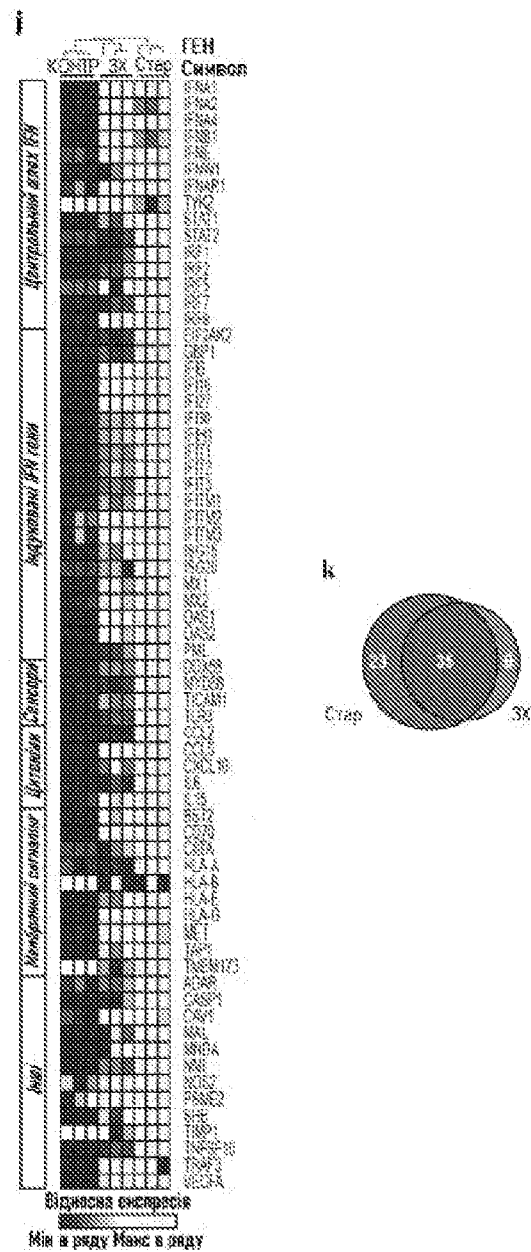
h



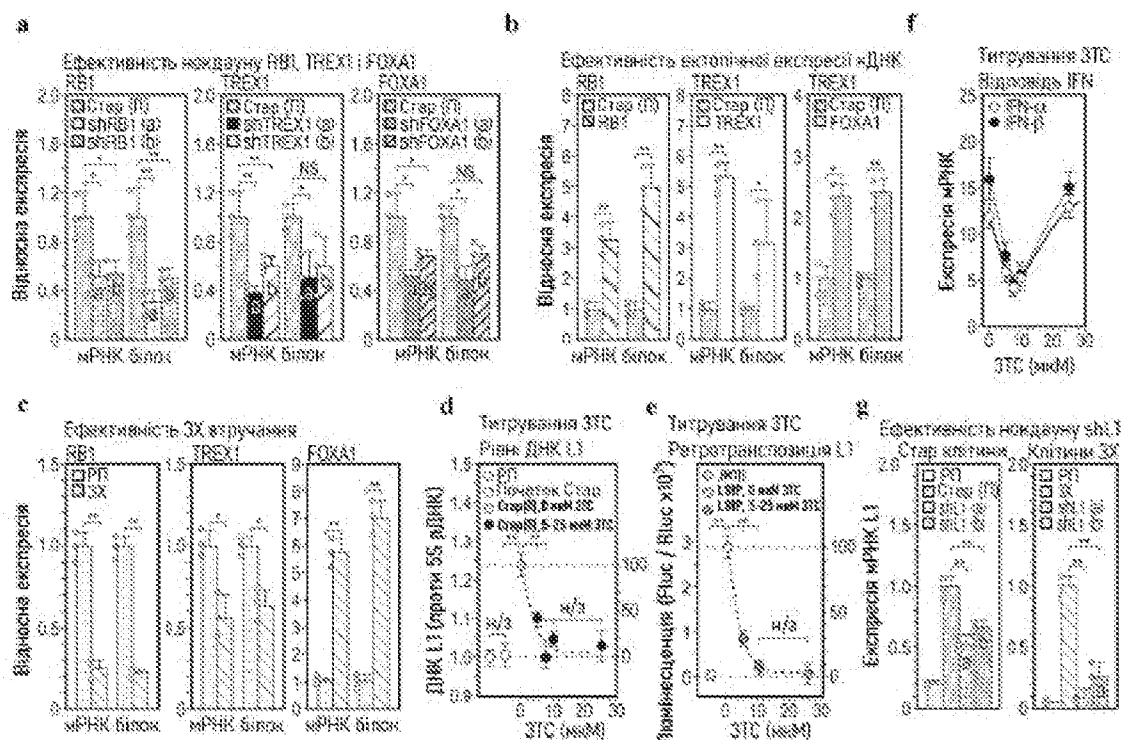
i



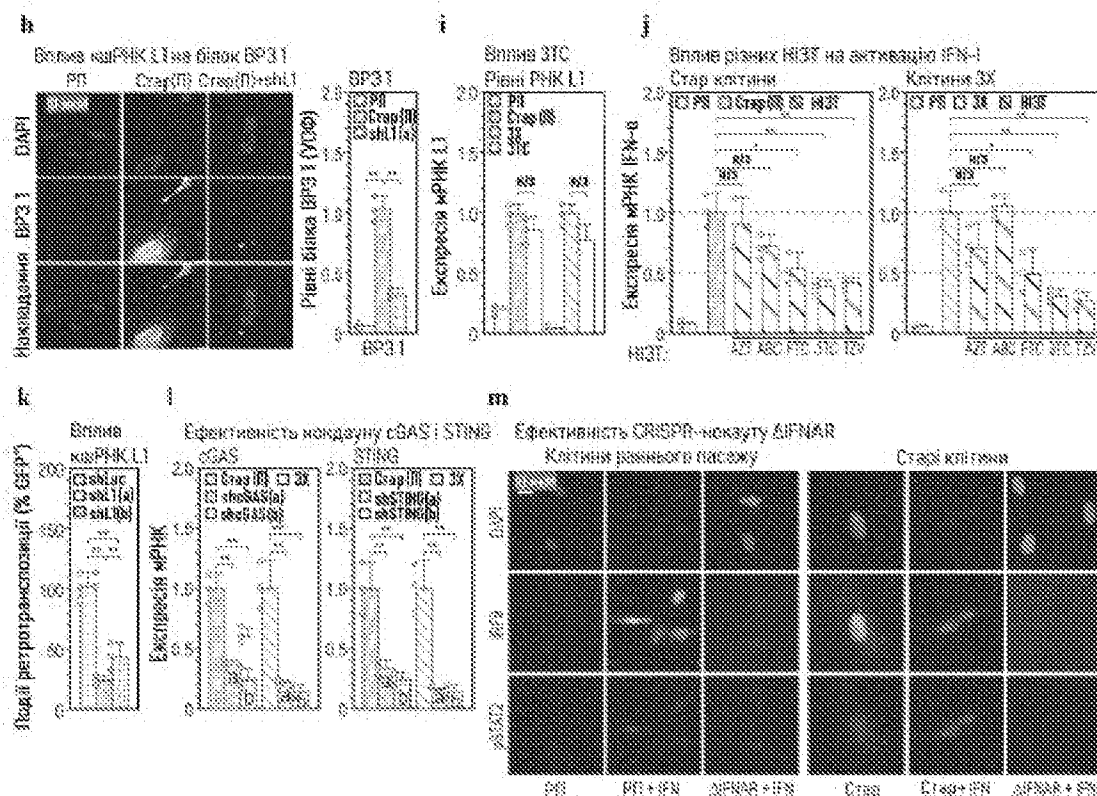
Фіг. 9 (продовження)



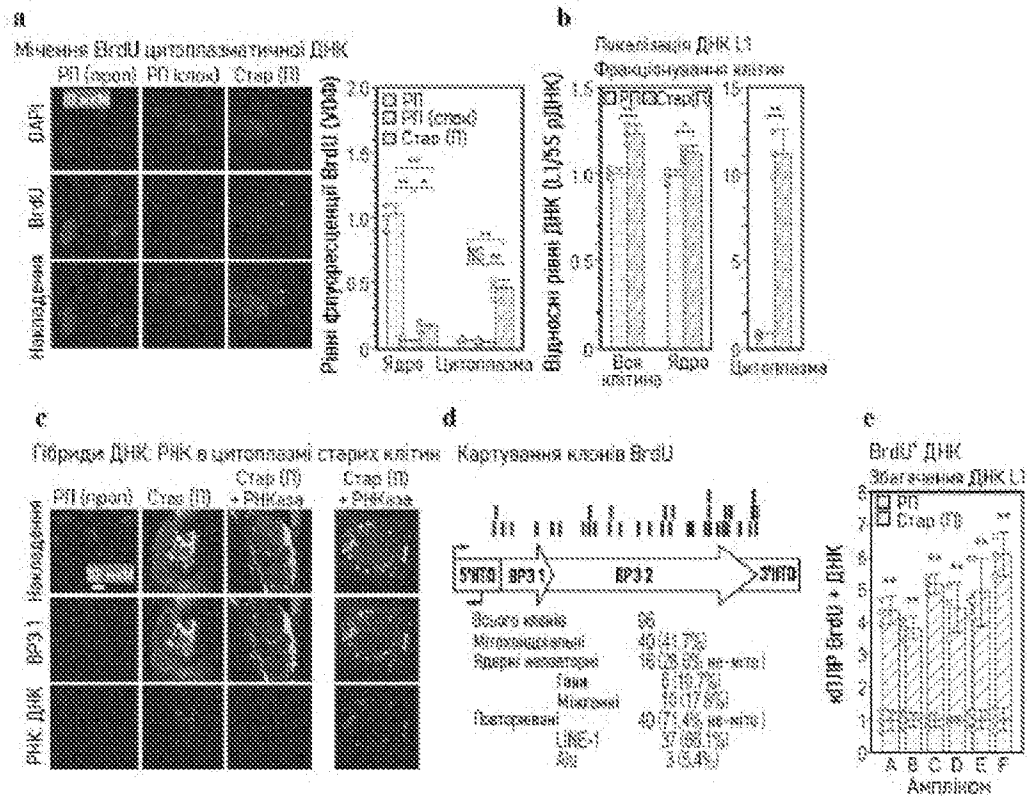
Фіг. 9 (продовження)



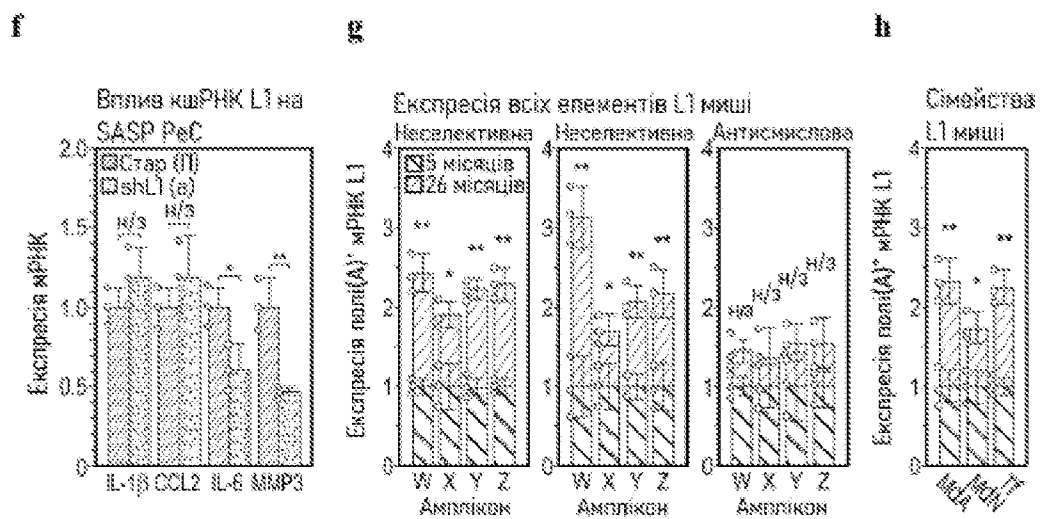
Фіг. 10



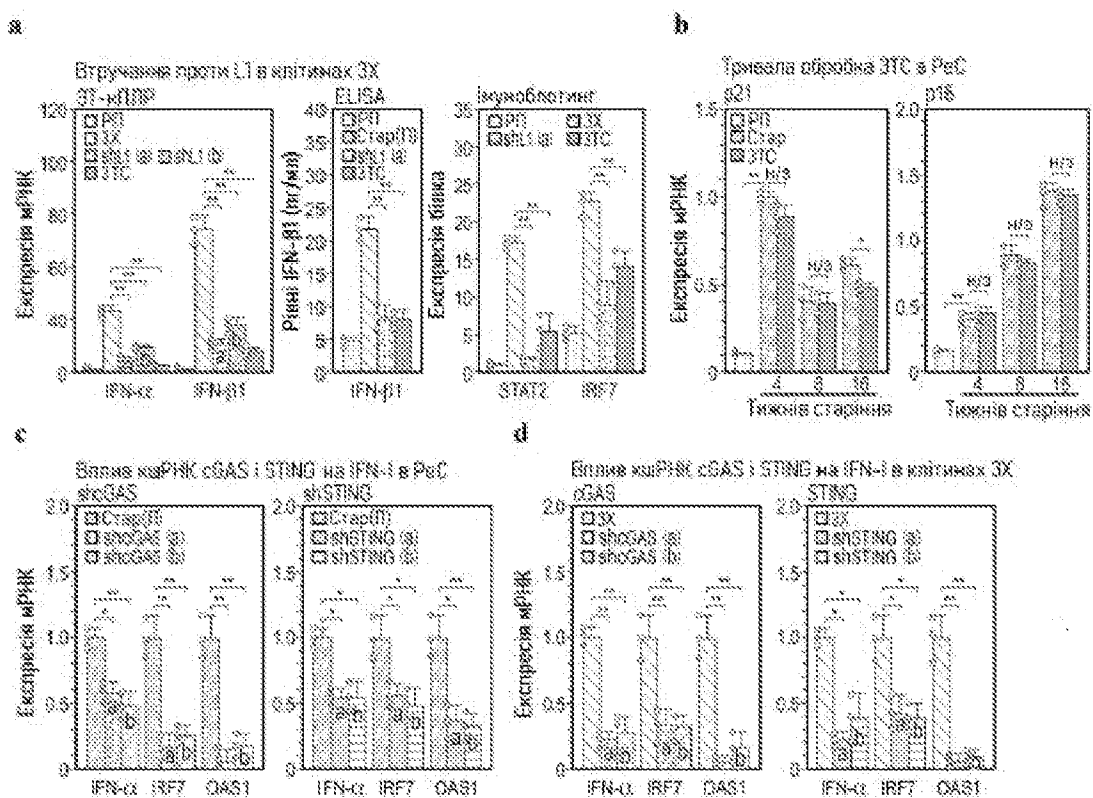
Фіг. 10 (продовження)



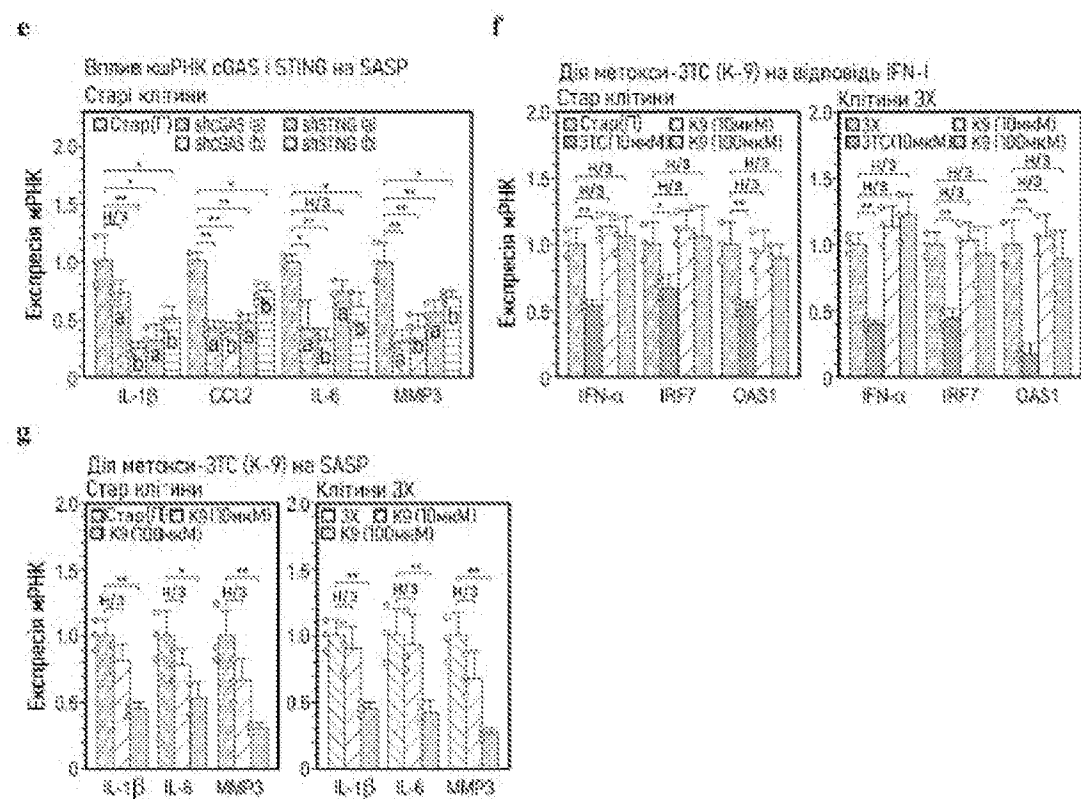
Фіг. 11



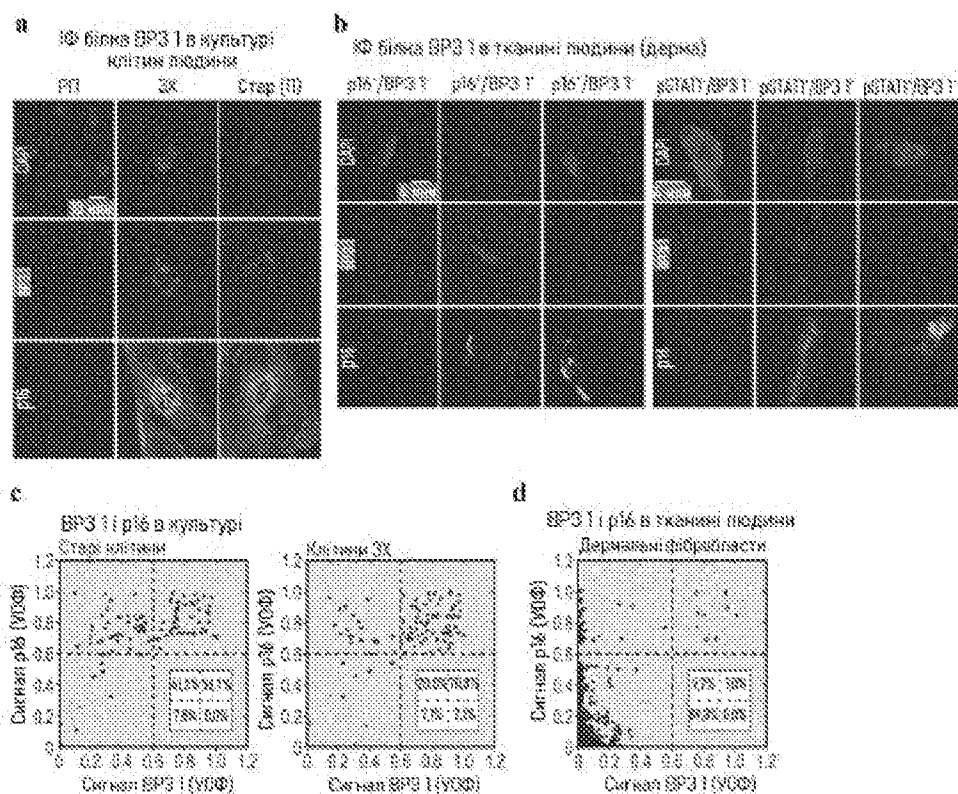
Фіг. 11 (продовження)



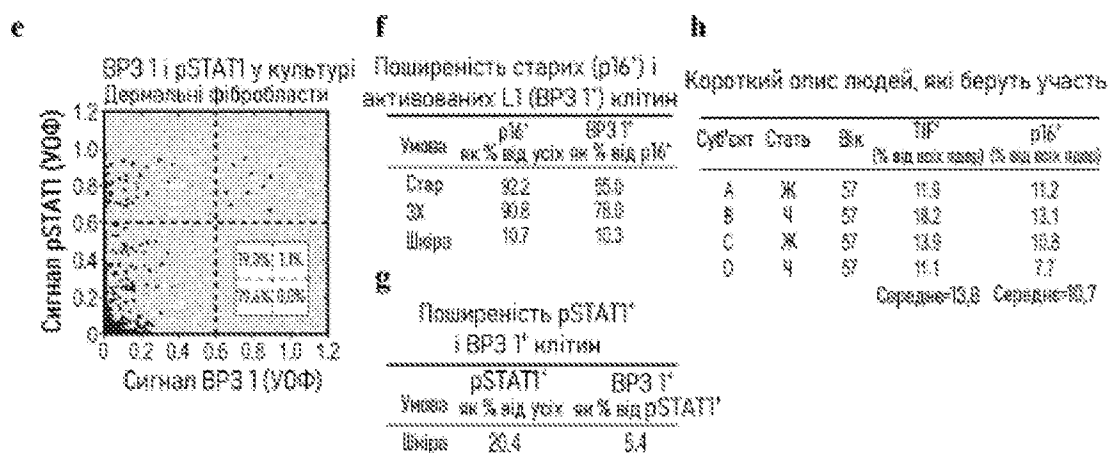
Фіг. 12



Фіг. 12 (продовження)

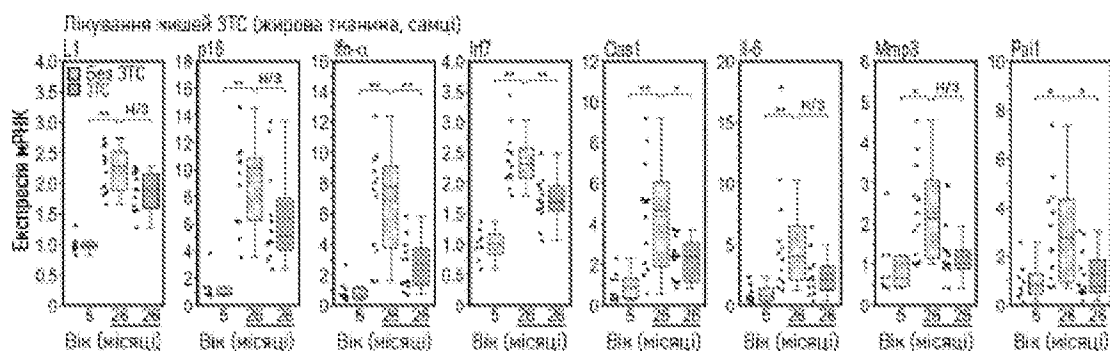


Фіг. 13

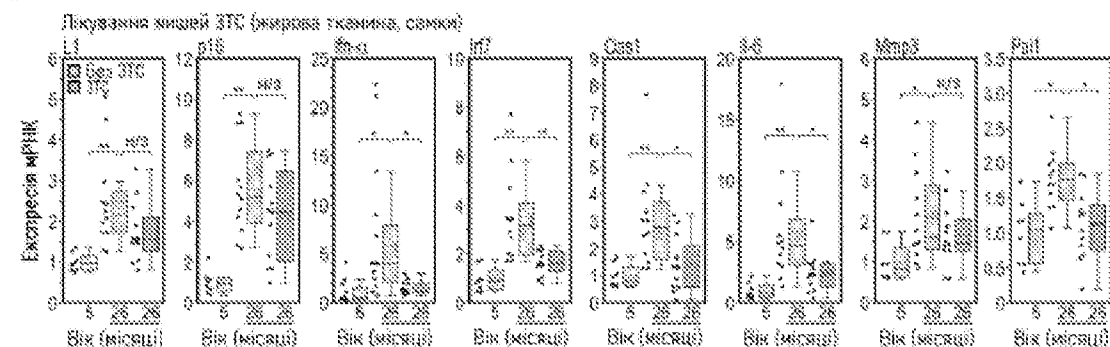


Фіг. 13 (продовження)

а

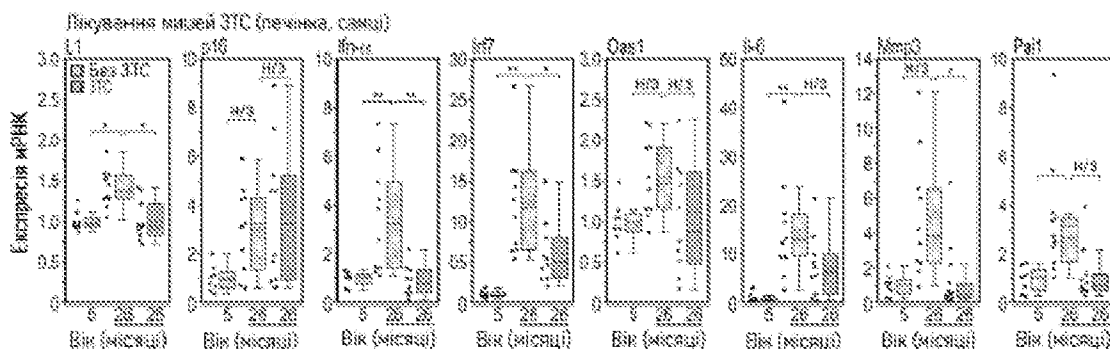


б

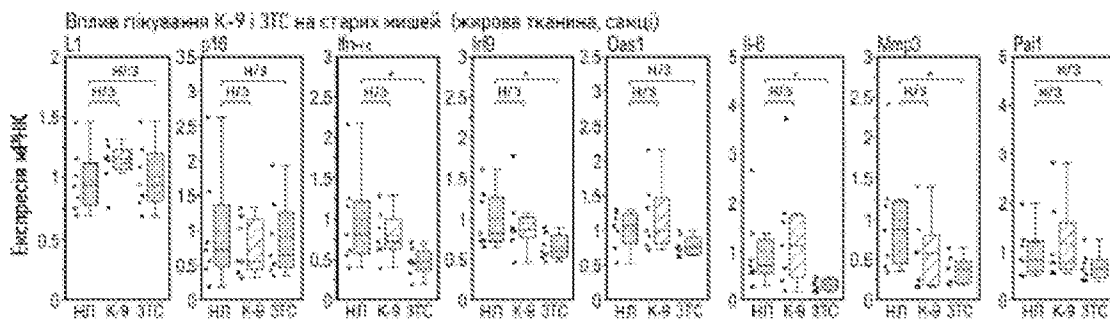


Фіг. 14

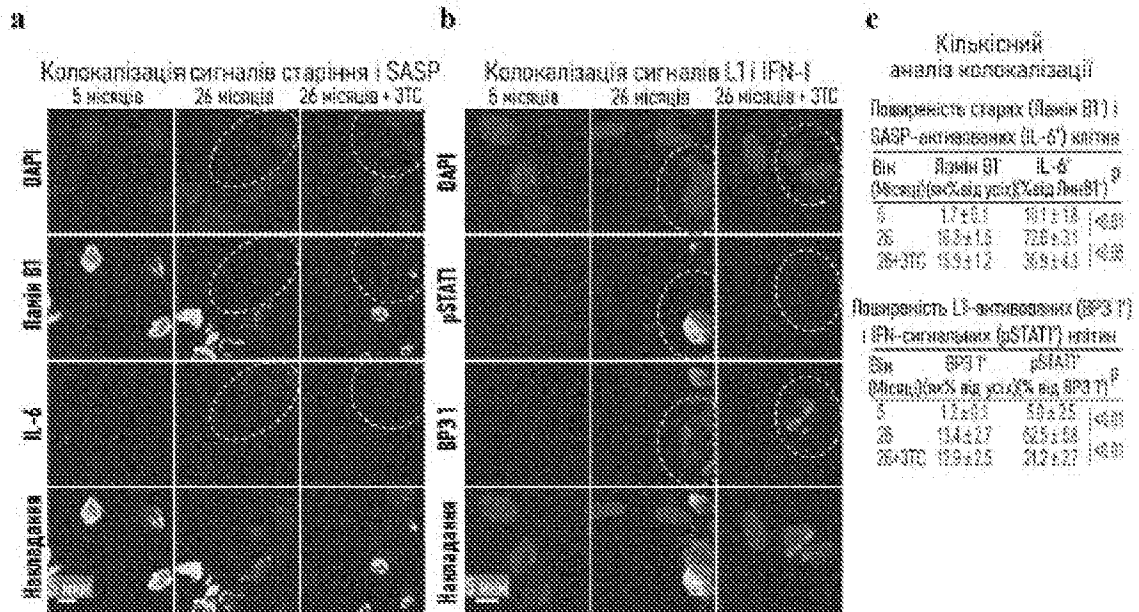
в



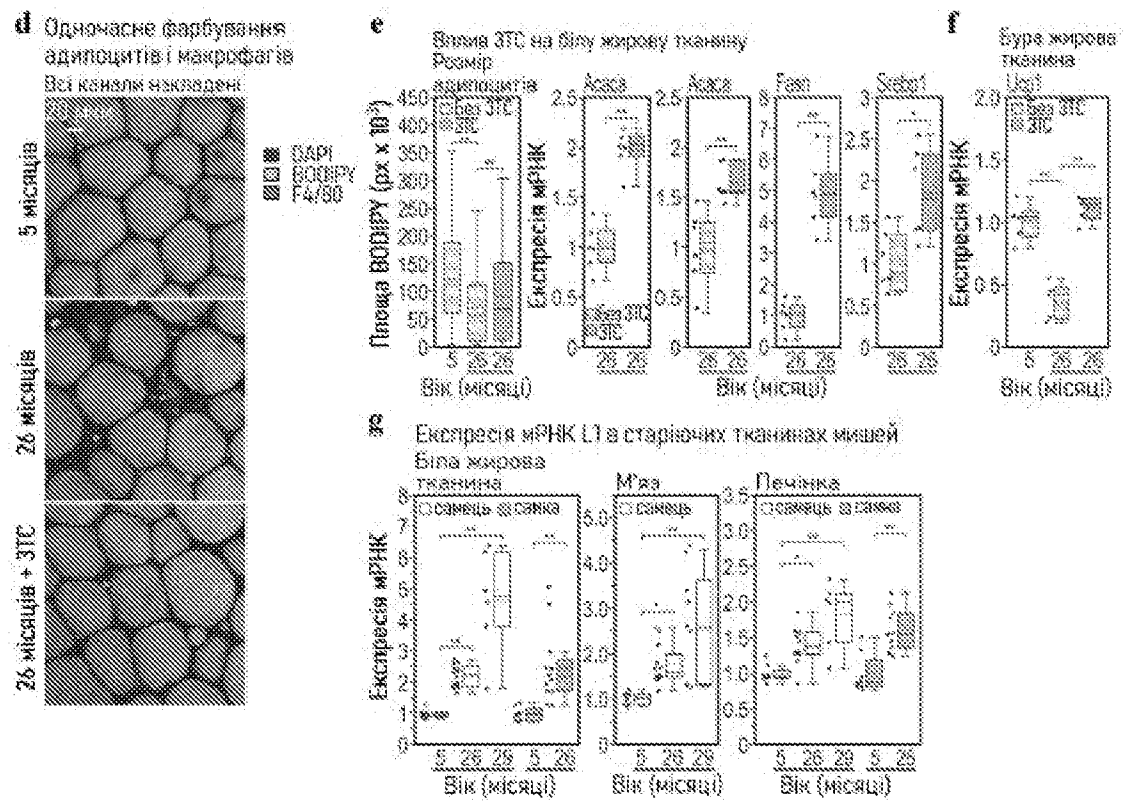
д



Фіг. 14 (продовження)



Фіг. 15



Фіг. 15 (продовження)

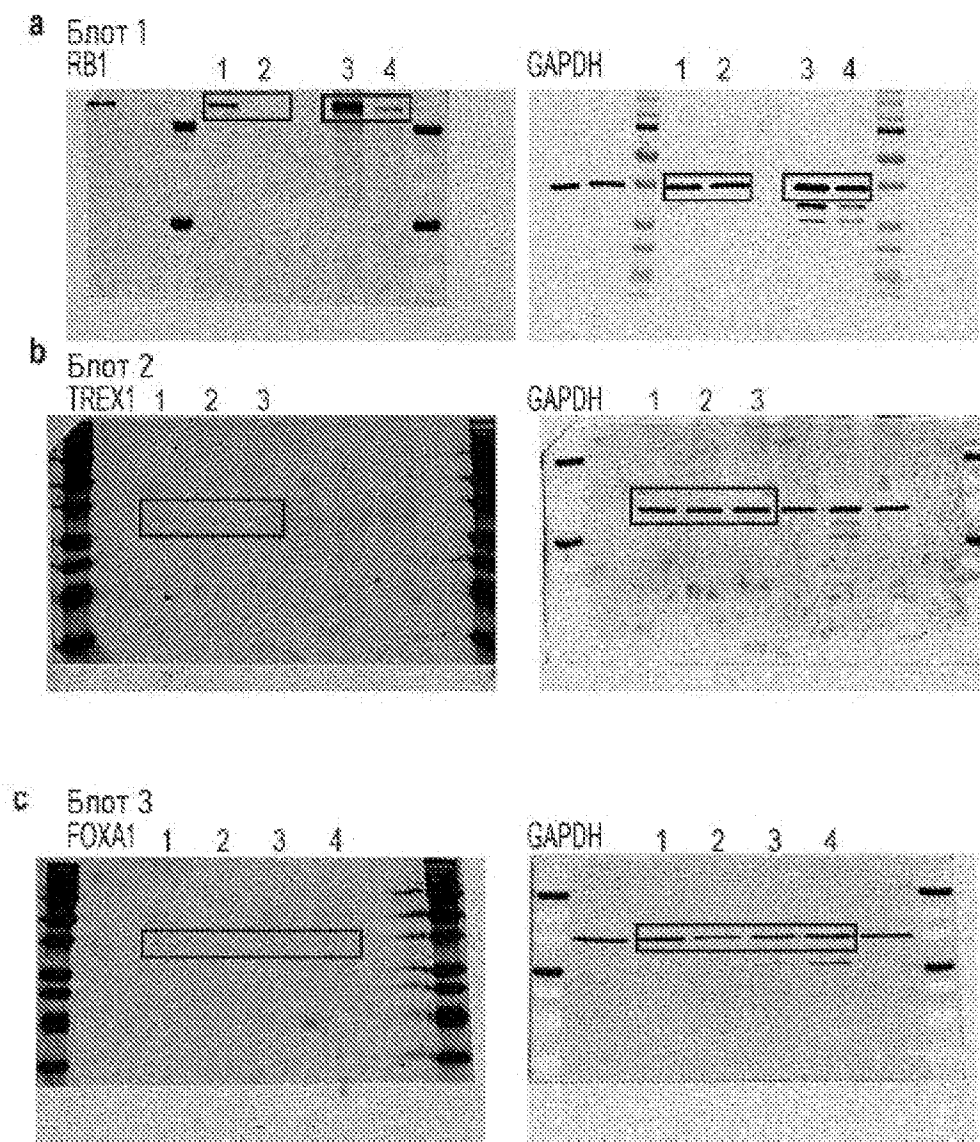
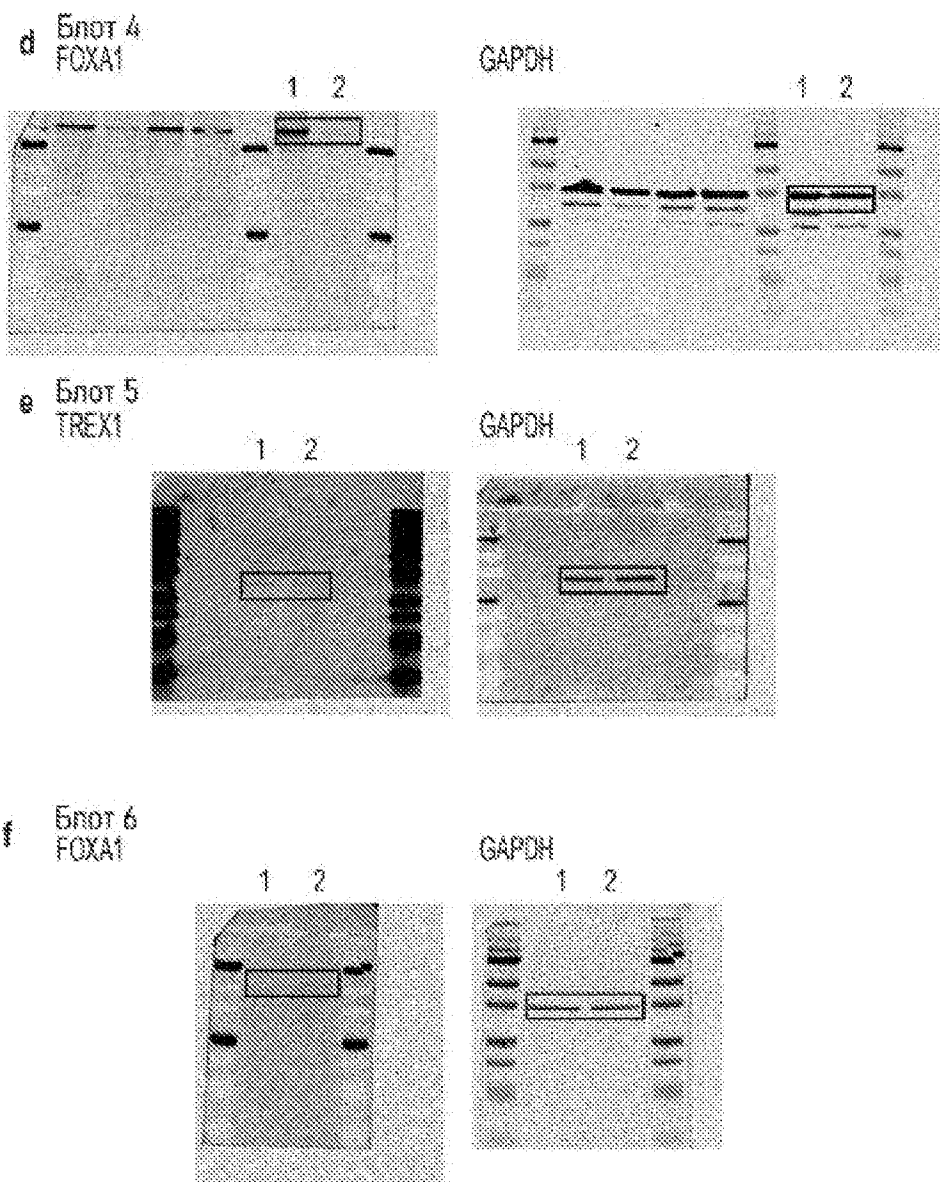


Fig. 16A



Фиг. 16В

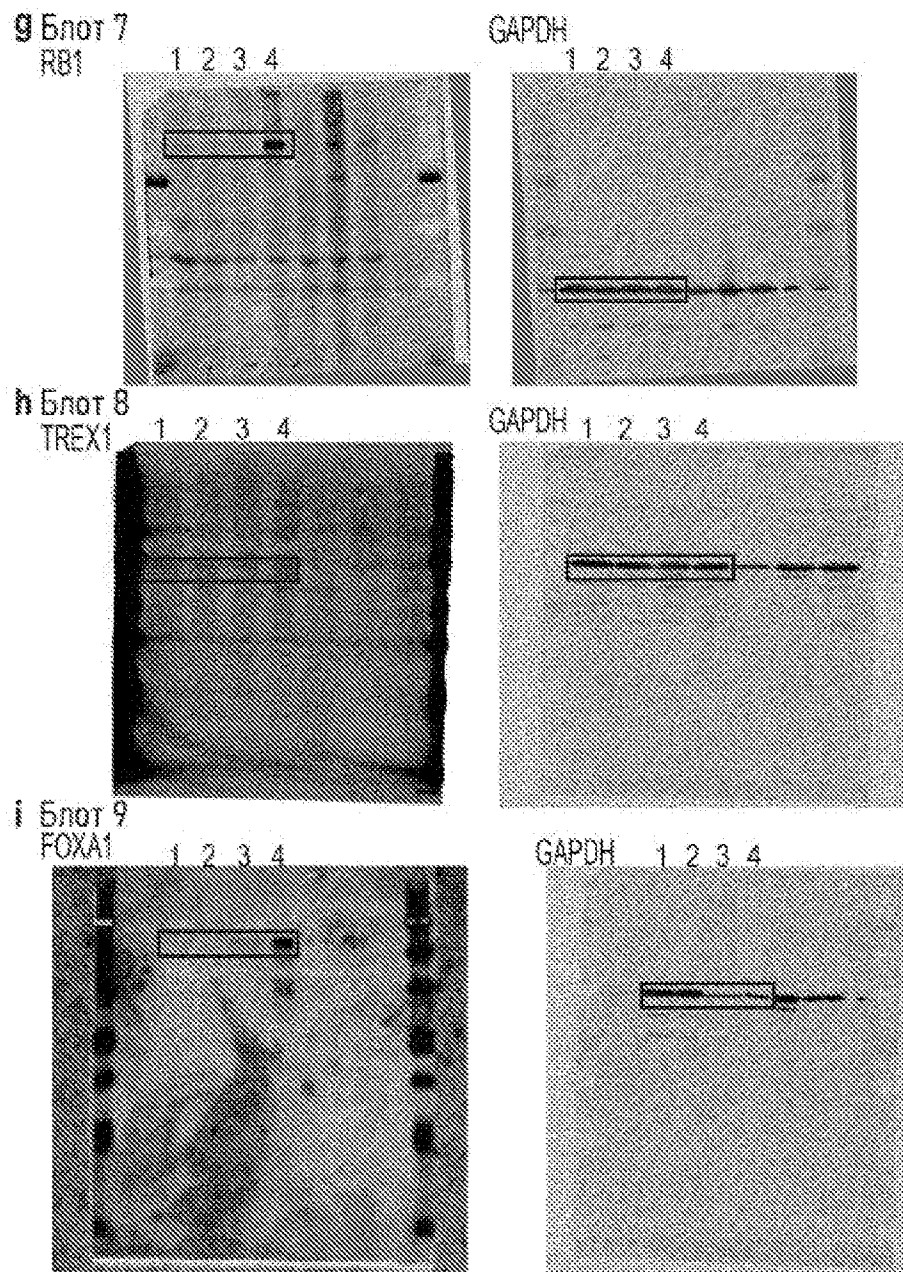


Fig. 16C

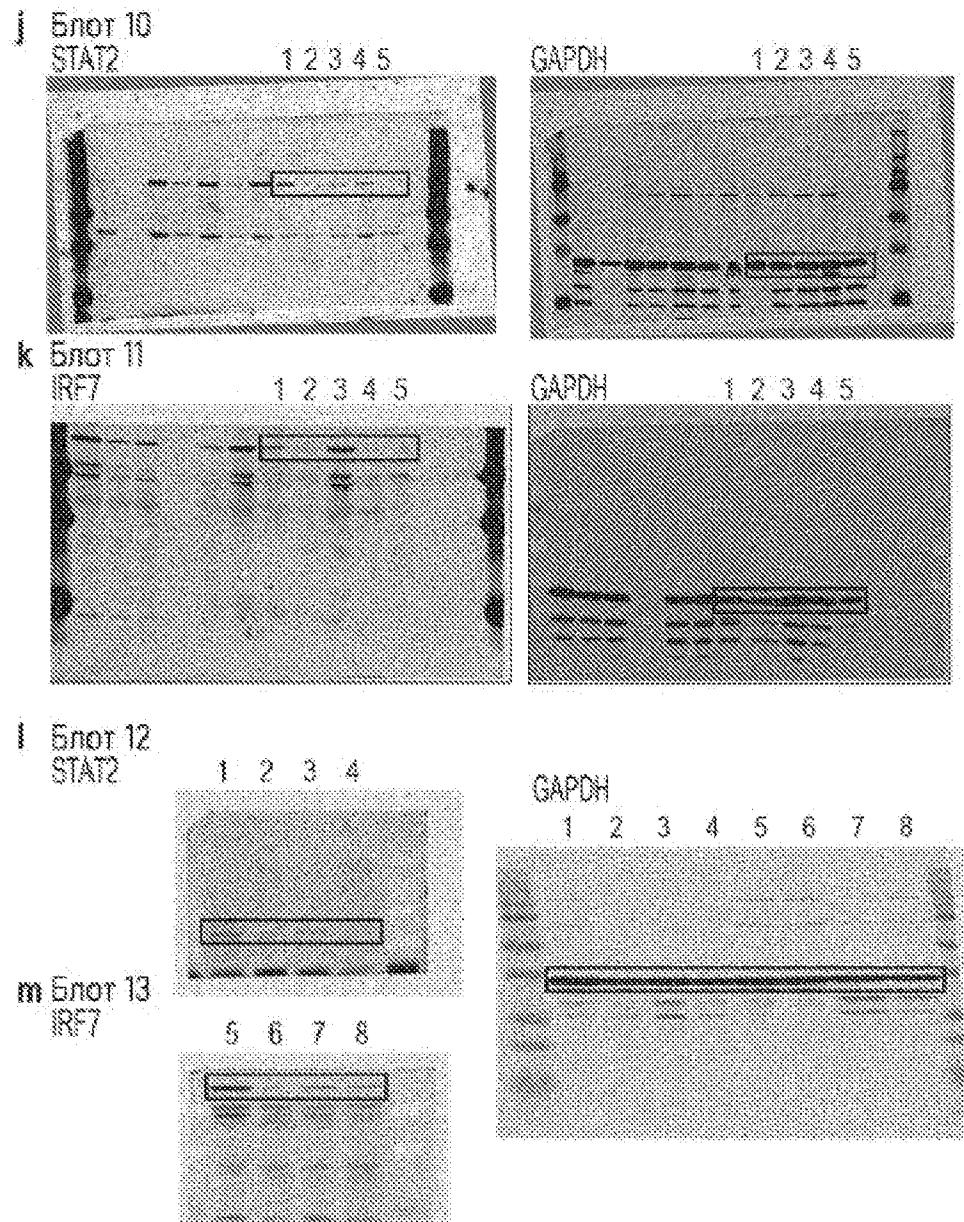
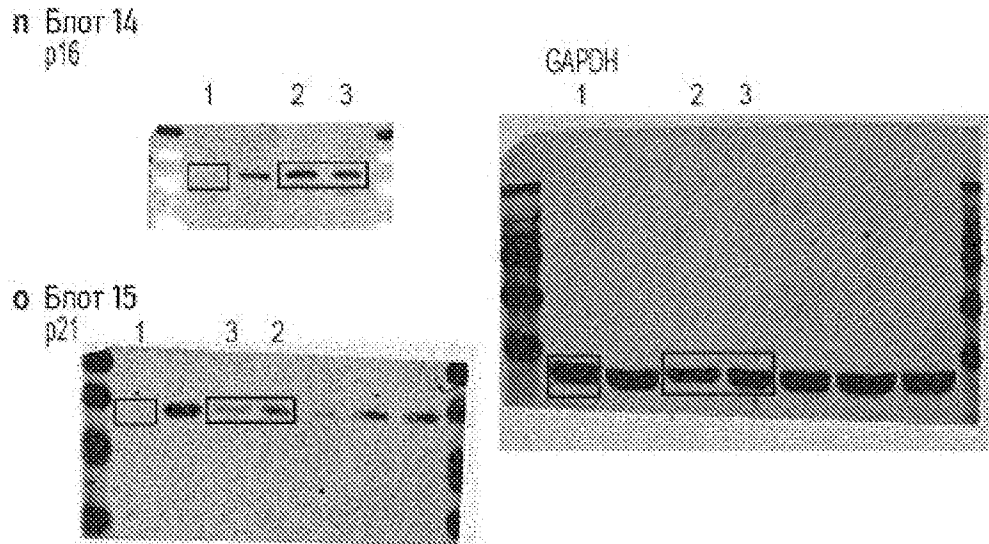


Fig. 16D



- а. Блот 1 - RB1: 1. РП; 2. Стар (П); 3. HE - Стар; 4. Стар (Р)
- б. Блот 2 - TREX1: 1. РП; 2. Стар (Р); 3. Стар (П)
- с. Блот 3 - FOXA1: 1. РП; 2. Зупинка; 3. Стар (Р); 4. Стар (П)
- д. Блот 4 - RB1: 1. РП; 2. 3X
- е. Блот 5 - TREX1: 1. РП; 2. 3X
- ф. Блот 6 - FOXA1: 1. РП; 2. 3X
- г. Блот 7 - RB1: 1. Стар (П); 2. shRB1 (b); 3. shRB1 (a); 4. CE-RB1
- г. Блот 8 - TREX1: 1. Стар (П); 2. shTREX1 (b); 3. shTREX1 (a); 4. HE-TREX1
- и. Блот 9 - FOXA1: 1. shFOXA1 (a); 2. shFOXA1 (b); 3. Стар (П); 4. HE-FOXA1
- ж. Блот 10 - STAT2: 1. 3X; 2. shL1; 3. H13T; 4. ΔIFNAR; 5. РП
- з. Блот 11 - IRF7: 1. РП; 2. shL1; 3. 3X; 4. shL1; 5. ΔIFNAR
- и. Блот 12 - STAT2: 1. Стар (П); 2. ΔIFNAR; 3. shL1; 4. H13T
- и. Блот 13 - IRF7: 5. Стар (П); 6. ΔIFNAR; 7. shL1; 8. H13T
- п. Блот 14 - p16 (CDKN2A): 1. РП; 2. Стар (Р); 3. Стар (П)
- о. Блот 15 - p21 (CDKN1A): 1. РП; 2. Стар (Р); 3. Стар (П)

Фиг. 16Е

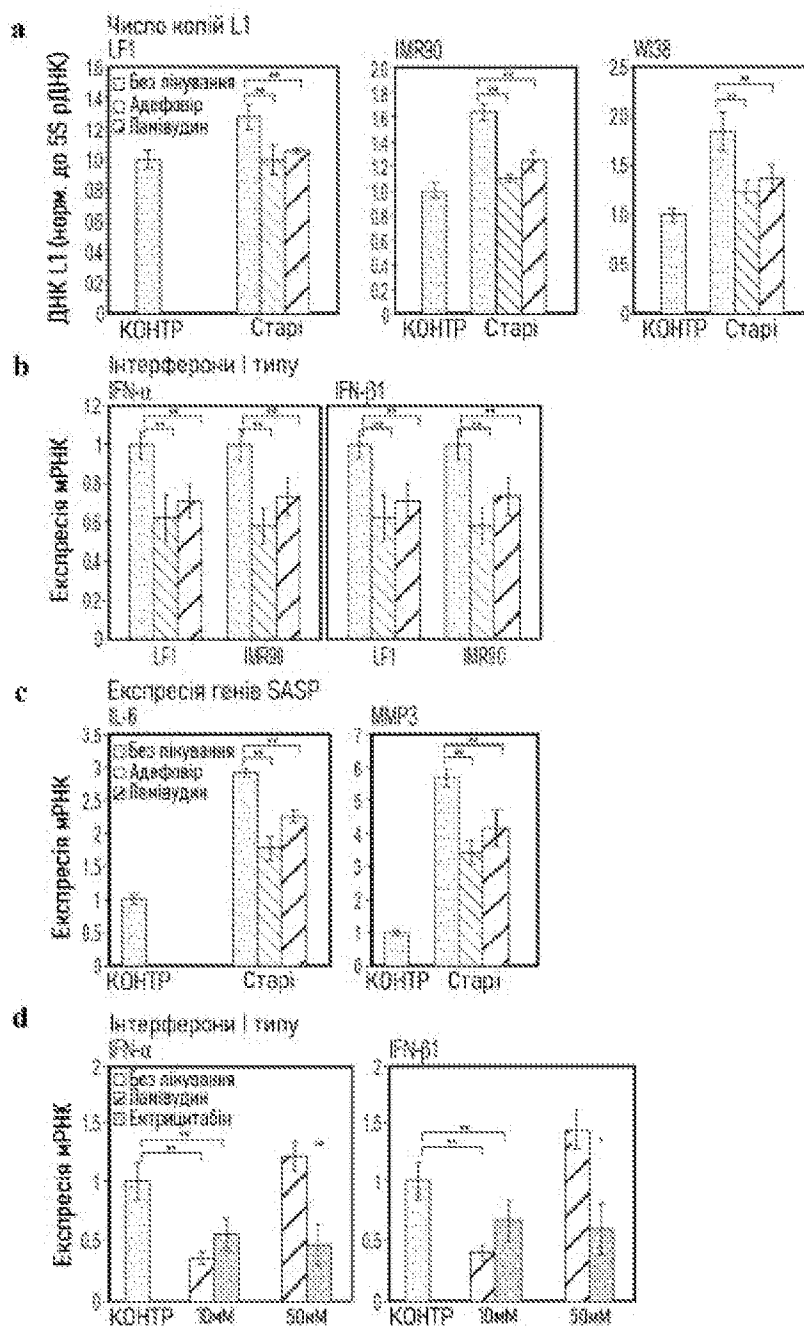
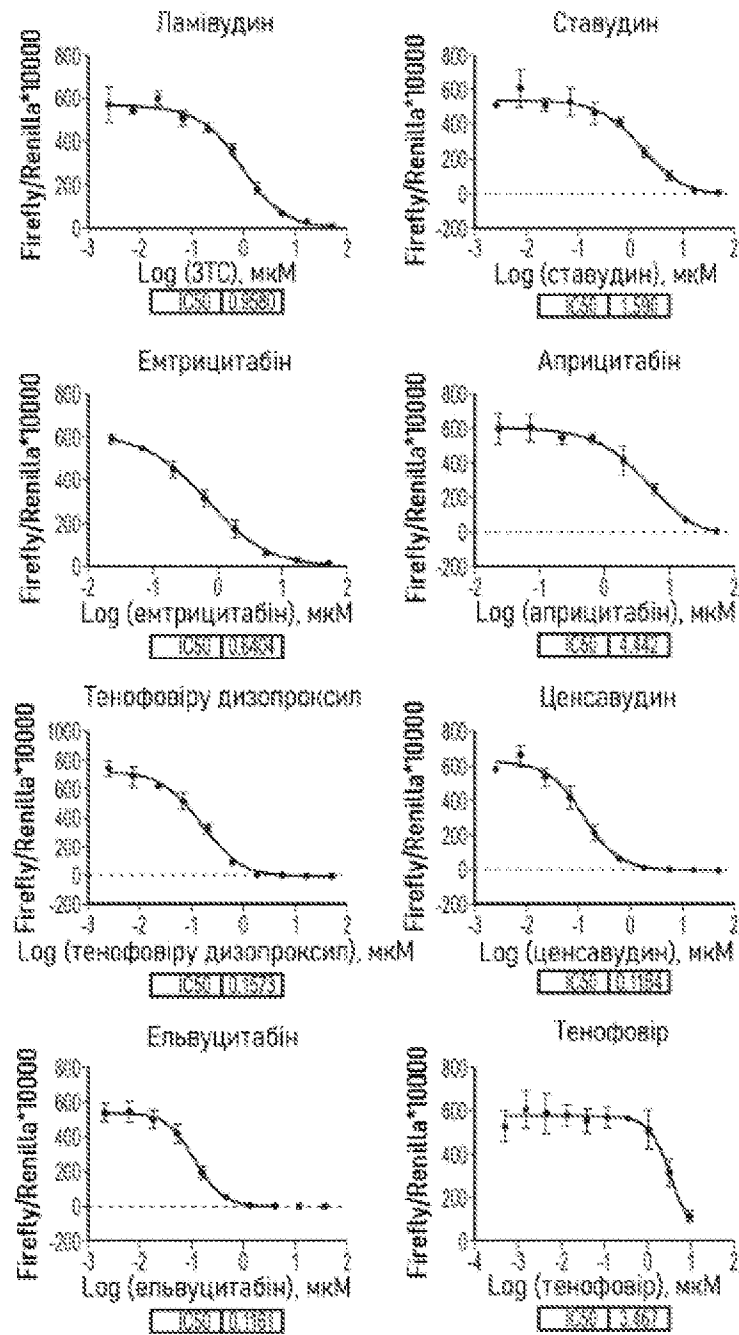
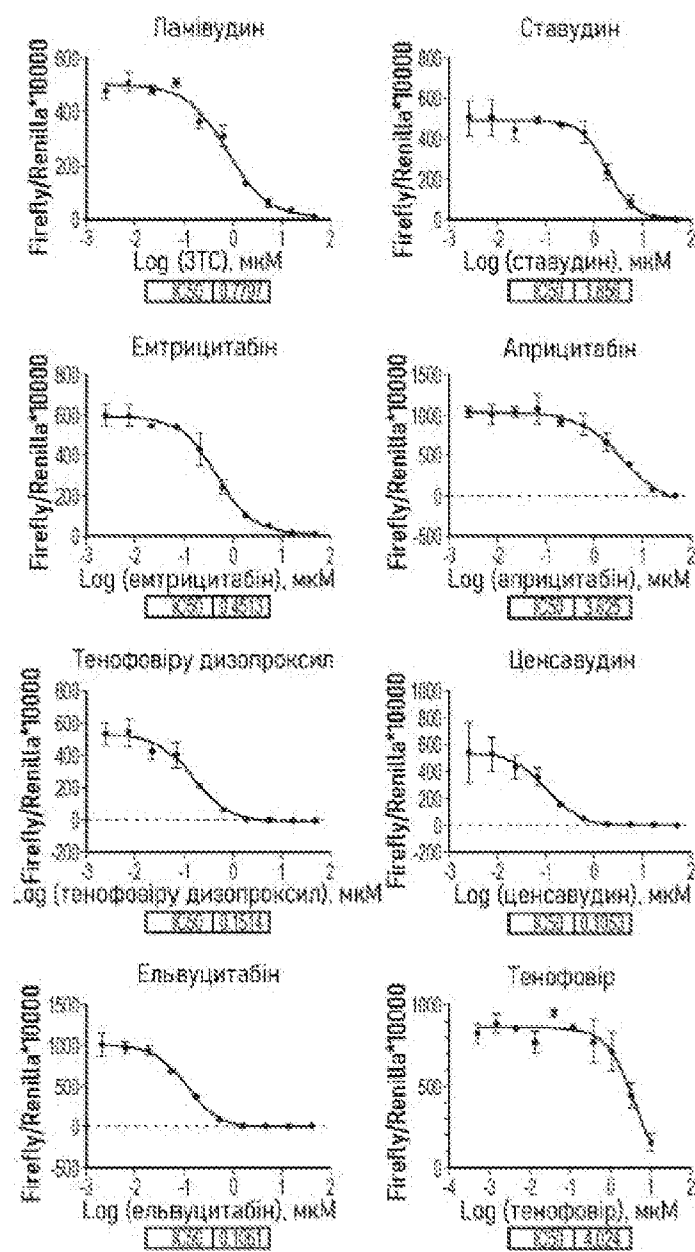


Fig. 17

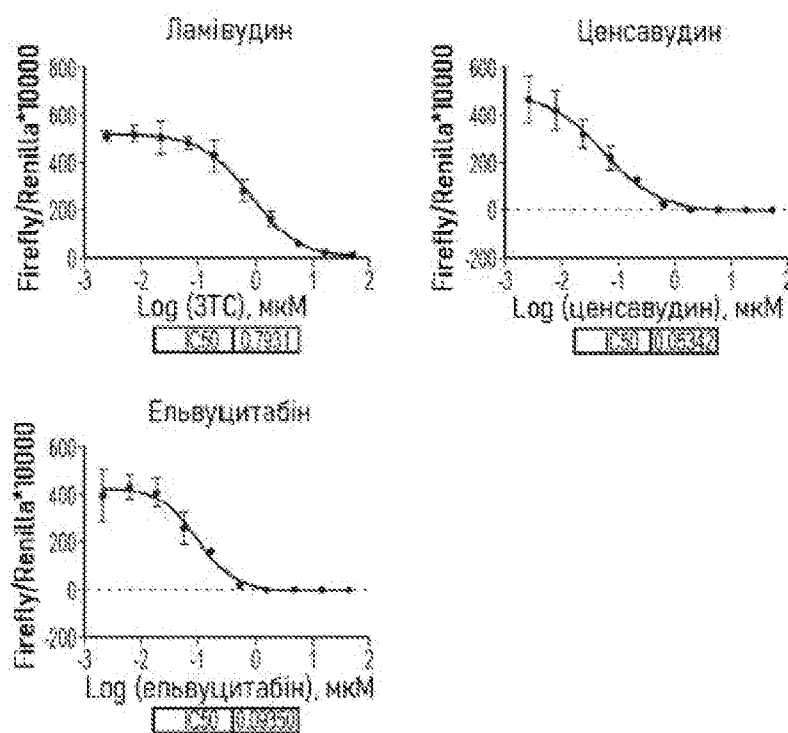


Фіг. 18А



Фіг. 18В

a



b

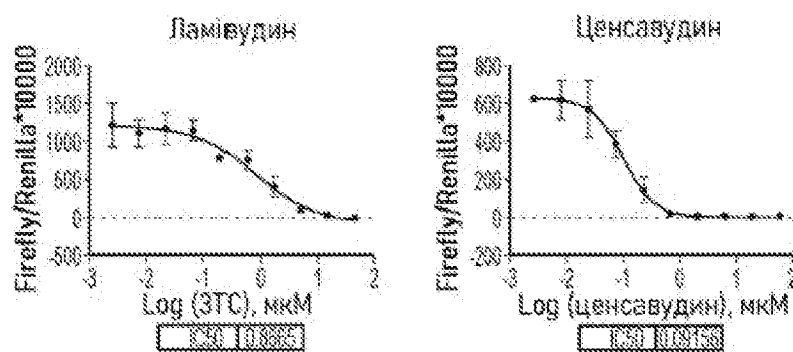
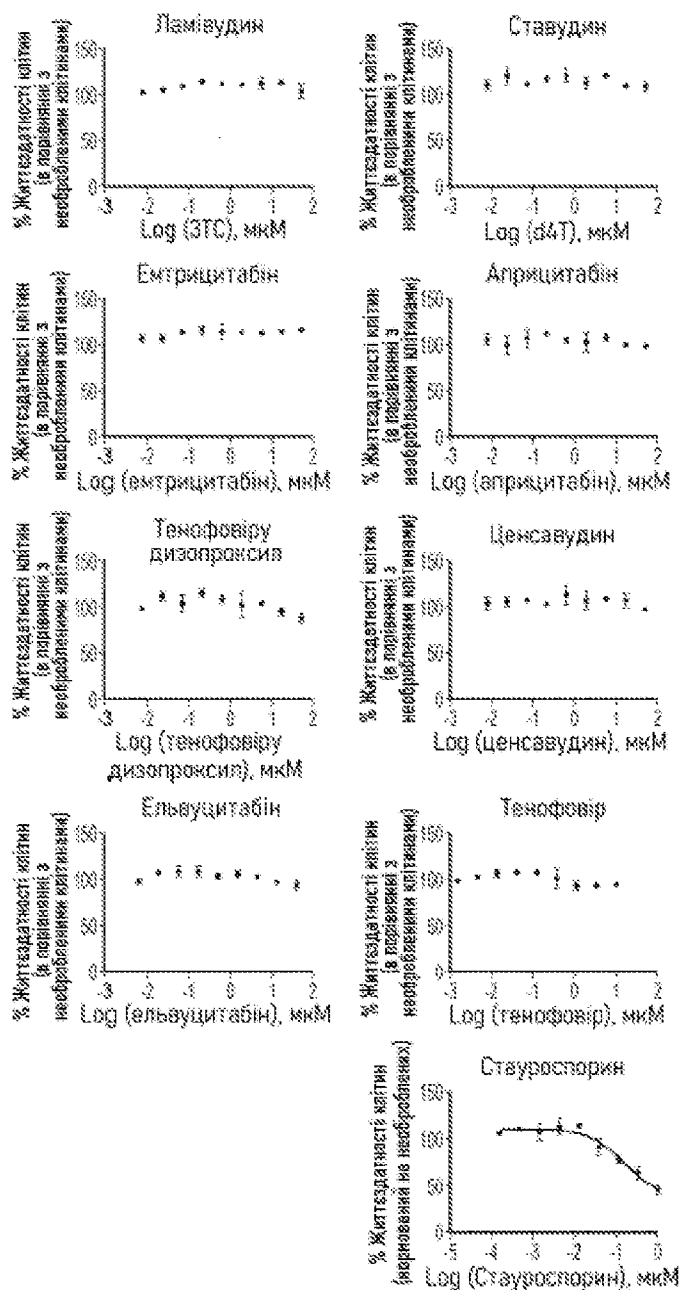


Fig. 19



Фіг. 20