

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202090850 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.07.16

(51) Int. Cl. *A61P 43/00* (2006.01)
A61K 31/5575 (2006.01)
G01N 33/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2018.10.12

(54) СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ ЗАБОЛЕВАНИЙ, СВЯЗАННЫХ С ЦИЛИОПАТИЯМИ

(31) 62/572,051

(32) 2017.10.13

(33) US

(86) PCT/US2018/055670

(87) WO 2019/075369 2019.04.18

(71) Заявитель:

АЛЕКСИОН ФАРМАСЬЮТИКАЛС,
ИНК. (US); ЭНСТИТЮ НАСЬОНАЛЬ
ДЕ ЛЯ САНТЭ Э ДЕ ЛЯ РЕШЕРШ
МЕДИКАЛЬ (FR)

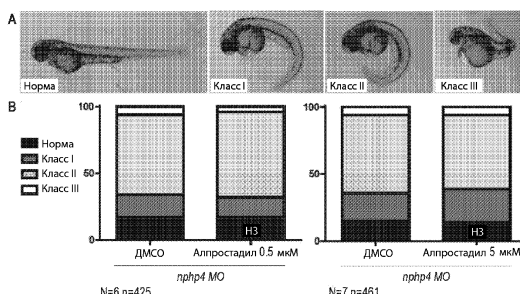
(72) Изобретатель:

Сонье Софи, Брисено-Роа Луи, Син-
Монно Сорайя, Аннеро Жан-Филипп,
Делу Марион, Гарсиа Хуго (FR),
Дель Анжел Гиллермо (US), Лежандр
Флора (FR)

(74) Представитель:

Гизатуллина Е.М., Глухарёва А.О.,
Угрюмов В.М., Строкова О.В.,
Христофоров А.А., Гизатуллин Ш.Ф.,
Костюшенкова М.Ю., Лебедев В.В.,
Парамонова К.В. (RU)

(57) Раскрываются способы лечения заболевания, связанного с цилиопатией, включая введение субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества соединения, которое нацелено по меньшей мере на один рецептор, сопряжённый с G-белком. Обеспечиваются способы идентификации терапевтических агентов для лечения заболевания, имеющего цилиопатию, в том числе создание модели цилиопатии на животных для тестирования предполагаемого терапевтического агента; введение нарушающего агента животному, воздействие на животное путем введения предполагаемого терапевтического агента, сравнение измеряемого фенотипа животного, которое подвергалось воздействию агента, с таковым животного, которое не подвергалось воздействию агента, и определение терапевтической мишени для лечения цилиопатии, если измеряемый фенотип животного, которое подвергалось воздействию агента, улучшается по сравнению с таковым у животного, которое не подвергалось воздействию агента.



202090850

A1

A1

202090850

СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ ЗАБОЛЕВАНИЙ, СВЯЗАННЫХ С ЦИЛИОПАТИЯМИ

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

Данная заявка представляет собой международную заявку в соответствии с Договором о патентной кооперации, которая заявляет приоритет согласно предварительной заявке на патент США № 62/572051, поданной 13 октября 2017 г. Содержание вышеупомянутой заявки полностью включено в данное раскрытие изобретения в полном объеме посредством ссылки.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Ресничка представляет собой вырост клеточной поверхности с каркасом из микротрубочек, который начинается от базальных тел, закрепленных на мембране центриолей. Первичные реснички представляют собой неподвижные сенсорные органеллы, присутствующие в одиночном экземпляре на поверхности большинства остановившихся в росте или дифференцированных клеток млекопитающих. Поток передачи сенсорной информации ресничек изменяется и опосредует сигнальные пути, необходимые во время развития и гомеостаза тканей, такие как передача сигналов hedgehog, Wnt/PCP и cAMP/PKA. Интрафлагеллярный транспорт (ИФТ (IFT)) обеспечивает отбор компонентов у основания реснички и транспортирует аксонемные компоненты, необходимые для сборки ресничек, и белки, участвующие в передаче сигналов ресничек. Как только ресничка сформирована, контроль состава мембраны реснички зависит от дискретных молекулярных машин, включая барьер для мембранных белков, попадающих в ресничку в специализированной области основания реснички, называемой переходной зоной, и адаптер для переноса, который контролирует локализацию в ресничке рецепторов, сопряженных с G-белком (GPCR), называемый BBSome (комплекс белков синдрома Бардета-Бидля (BBS) и других белков, который является компонентом базального тельца и участвует в доставке компонентов в первичную ресничку). Цилиогенез требует координации многих процессов. Сложное согласование регуляции клеточного цикла, везикулярного транспорта и удлинения ресничек должно происходить с точным временем, чтобы сформировать ресничку. Важность формирования и поддержания правильно дифференцированных ресничек во время эмбрионального развития и в физиологии взрослого человека лучше всего подчеркивается большим количеством заболеваний человека, связанных с цилиопатиями.

Цилиопатии представляют собой группу заболеваний человека, которые непосредственно вызваны дефектами формирования или функционирования ресничек. Дефектные первичные реснички вызывают плеiotропные и высоковариабельные аномалии, что согласуется с обширным распределением в тканях первичных ресничек и их широкими функциями. У людей, страдающих первичными цилиопатиями, наблюдаются сочетания аномалий почек и сетчатки, дефектов центральной нервной системы, которые могут привести к умственной отсталости, дефектов печени (включая кисты), ожирение, а также наблюдаются дефекты скелета, включая отклонения в длине конечностей, количестве пальцев (полидактилия), дефекты организации левой/правой оси (*транспозиция внутренних органов*) и формирования черепно-лицевой структуры. Аномалии, специфичные для фоторецепторов, соединяющих реснички, также могут привести к дегенерации сетчатки и слепоте. Примеры первичных цилиопатий включают нефронофтиз (НФ (NPHP)), синдром Сениора-Локена (SLS), синдром Жубера (JBTS), синдром Барде-Бидля (BBS), синдром Меккель-Грубера (MKS), оро-фацио-дигитальный синдром (OFD) и синдром Жёна (асфиксическая торакальная дисплазия, JATD).

Нефронофтиз (НФ) представляет собой аутомно-рецессивную нефропатию, характеризующуюся массивным интерстициальным фиброзом, утолщением трубчатой базальной мембраны и образованием кисты, что приводит к терминальной почечной недостаточности (ТПН (ESRD)) в детском возрасте. НФ может быть изолированным или ассоциированным с различными внепочечными проявлениями (*например*, дистрофия сетчатки, фиброз печени, дисплазия скелета и т. д.) в синдромальных формах, которые в дальнейшем называются цилиопатиями, связанными с нефронофтизом (НФ-ЦЦ (NPHP-RC)).

НФ обуславливается 21 геном НФ (NPHP), на сегодняшний день на них приходится 60% случаев. Остается ясным, что с учетом высокой генетической гетерогенности НФ и многочисленных обсуждаемых механистических путей нет единой патологии, ведущей к НФ. Гистология почек при НФ указывает на общий результат тубулярного некроза и фиброза, который может иметь несколько триггеров. Кажется, что с каждой новой научной работой по открытию генов становится яснее молекулярная диагностика, но возникает путаница в отношении сигнальных путей, лежащих в основе заболевания.

По-прежнему существует острая потребность в характеристике плохо изученной молекулярной основы заболеваний, имеющих цилиопатию, включая НФ, и в улучшении диагностики и лечения этих заболеваний.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В одном варианте реализации изобретения, данное изобретение относится к способу лечения, по меньшей мере, одного заболевания, связанного с цилиопатией, у субъекта, включающему введение субъекту терапевтически эффективного количества, по меньшей мере, одного агента, который нацелен, по меньшей мере, на один рецептор, сопряжённый с G-белком (GPCR). В одном варианте реализации изобретения заболевание, связанное с цилиопатией, возникает в результате гомозиготной делеции локуса *NRHP1*. В одном варианте реализации изобретения заболевание, связанное с цилиопатией, возникает в результате гетерозиготной делеции локуса *NRHP1* и гетерозиготной или гомозиготной потери функции (ПФ (LOF)) по второму локусу. В одном варианте реализации изобретения заболевание, связанное с цилиопатией, возникает в результате гетерозиготной делеции в одном аллеле *NRHP1* и мутации с ПФ во втором аллеле. В одном варианте реализации изобретения заболевание, связанное с цилиопатией, возникает в результате мутации с потерей функции в одном аллеле *NRHP1* и другой мутации с потерей функции во втором аллеле.

В конкретном варианте реализации изобретения, по меньшей мере, один агент является агонистом, по меньшей мере, одного GPCR. В конкретном варианте реализации изобретения, по меньшей мере, один агент представляет собой простагландин. В конкретном варианте реализации изобретения, по меньшей мере, один агент выбран из группы, состоящей из: простагландина E1 (ПГЕ1 (PGE1)), простагландина E2 (ПГЕ2 (PGE2)), 16,16-диметил-ПГЕ2 (дмПГ2 (dmPGE2)), L902,688, CP-544326, AGN -210669, 18a, AGN-210961, ED-117, CP-533536 и их комбинации. В конкретном варианте реализации изобретения, по меньшей мере, один GPCR выбран из группы, состоящей из: EP1, EP2, EP3 и EP4. В конкретном варианте реализации изобретения, по меньшей мере, одно заболевание выбрано из группы, состоящей из: нефронофтиза (НФ (NRHP)), синдрома Сеньора-Локена (SLS), синдрома Жубера (JBTS) и связанных с ним расстройств (JSRD), который может включать все варианты формы СЖБР, имеющие дополнительные признаки, такие как полидактилия, колобома, дистрофия сетчатки, почечные кисты, оральные френулы и печеночный фиброз, синдрома Барде-Бидля (BBS), синдрома Меккеля-

Грубера (MKS), оро-фацио-дигитального синдрома (OFD), терминальной почечной недостаточности, обусловленной большой гомозиготной делецией *NPHP1*, а также цилиопатии почек и сетчатки, связанных с мутациями *NPHP1*, *NPHP4*, *NPHP6/CEP290*, и любых цилиопатий, обусловленных геном *NPHP*. В конкретном варианте реализации изобретения, по меньшей мере, один агент представляет собой CP-544326, и, по меньшей мере, один GPCR представляет собой EP2. В конкретном варианте реализации изобретения эффективное количество составляет от 100 пМ до 5 мкМ. В конкретном варианте реализации изобретения, по меньшей мере, одно заболевание представляет собой нефронофтиз.

В одном варианте реализации изобретения, изобретение относится к способу идентификации терапевтического агента для лечения, по меньшей мере, одного заболевания, связанного с цилиопатией, причем способ включает: (a) введение тестируемого агента животной или клеточной модели заболевания, связанного с цилиопатией, при этом животная или клеточная модель демонстрирует измеряемый фенотип заболевания, связанного с цилиопатией, (b) сравнение измеряемого фенотипа животной или клеточной модели, которая подвергалась воздействию агента, с таковым измеряемым фенотипом животной или клеточной модели, которая не подвергалась воздействию агента, и (c) идентификацию тестируемого агента в качестве терапевтического агента для лечения заболевания, связанного с цилиопатией, при этом измеряемый фенотип животной или клеточной модели, которая подвергалась воздействию агента, улучшается по сравнению с таковым у животной или клеточной модели, которая не подвергалась воздействию агента. В конкретном варианте реализации изобретения животная модель может быть моделью *Danio rerio* (Данио-рерио) или мышинной моделью нокаутной (НА) по *nphp1* (*nphp1*^{-/-}). В конкретном варианте реализации изобретения животную модель получают путем введения одного или более нарушающих агентов. В конкретном варианте реализации изобретения один или более нарушающих агентов включают морфолино. В конкретном варианте реализации изобретения морфолино ингибирует экспрессию, по меньшей мере, одного нефроцистина (*NPHP*), например, *NPHP4*. В конкретном варианте реализации изобретения измеряемый фенотип выбран из группы, состоящей из: искривления тела, кист эмбриональных почек, латеральных дефектов сердца и дилатаций клоаки. В конкретном варианте реализации изобретения, по меньшей мере, одно заболевание выбрано из группы, состоящей из: нефронофтиза (НФ (*NPHP*)), синдрома Сеньора-Локена (SLS), синдрома Жубера (JBTS) и связанных с

ним расстройств (JSRD), синдрома Барде-Бидля (BBS), синдрома Меккеля-Грубера (MKS), оро-фацио-дигитального синдрома (OFD), терминальной почечной недостаточности, обусловленной большой гомозиготной делецией *NPHP1*, а также цилиопатий почек и сетчатки, связанных с мутациями *NPHP1*, *NPHP4*, *NPHP6/CEP290*.

В одном варианте реализации изобретения, изобретение относится к агонисту GPCR для применения при лечении, по меньшей мере, одного заболевания, связанного с цилиопатией. В конкретном варианте реализации изобретения агонист GPCR выбран из группы, состоящей из: простагландина E1 (ПГЕ1 (PGE1)), простагландина E2 (ПГЕ2 (PGE2)), 16,16-диметил-ПГЕ2 (дмПГ2 (dmPGE2)), CP-544326, L902,688, AGN-210669, 18a, AGN-210961, ED-117, CP-533536, и их комбинации. В конкретном варианте реализации изобретения GPCR выбран из группы, состоящей из: EP1, EP2, EP3 и EP4. В конкретном варианте реализации изобретения, по меньшей мере, одно заболевание выбрано из группы, состоящей из: нефронофтиза (НФ (NPHP)), синдрома Сеньора-Локена (SLS), синдрома Жубера (JBTS) и связанных с ним расстройств (JSRD), синдрома Барде-Бидля (BBS), синдрома Меккеля-Грубера (MKS), оро-фацио-дигитального синдрома (OFD), терминальной почечной недостаточности, обусловленной большой гомозиготной делецией *NPHP1*, а также цилиопатий почек и сетчатки, связанных с мутациями *NPHP1*, *NPHP4*, *NPHP6/CEP290*.

В конкретном варианте реализации изобретения животную модель получают путем введения одного или более нарушающих агентов. В конкретном варианте реализации изобретения один или более нарушающих агентов включают систему CRISPR/Cas9, которая опосредует онПНК-направленную (sgRNA-directed) генетическую делецию. В конкретном варианте реализации изобретения система CRISPR/Cas9 ингибирует экспрессию, по меньшей мере, одного нефроцистина (NPHP), например *NPHP1*. В конкретном варианте реализации изобретения измеряемый фенотип выбран из группы, состоящей из толщины слоев фоторецепторов сетчатки, электроретинограмм и накопления родопсина в теле клетки фоторецепторов. В конкретном варианте реализации изобретения, по меньшей мере, одно заболевание выбрано из группы, состоящей из: нефронофтиза (НФ (NPHP)), синдрома Сеньора-Локена (SLS), синдрома Жубера (JBTS) и связанных с ним расстройств (JSRD), синдрома Барде-Бидля (BBS), синдрома Меккеля-Грубера (MKS), оро-фацио-дигитального синдрома (OFD), терминальной почечной недостаточности, обусловленной большой гомозиготной делецией

NRHP1, а также цилиопатий почек и сетчатки, связанных с мутациями NRHP1, NRHP4, NRHP6/CEP290.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Для дальнейшего понимания природы, объектов и преимуществ данного раскрытия изобретения следует обратиться к следующему подробному описанию, которое необходимо читать совместно со следующими графическими материалами, при этом ссылки указывают на соответствующие им элементы.

На Фиг. 1A-1D изображены клетки почечного эпителия, полученные из мочи; 1A: контроль (норма); 1B: Пациент с НФ, несущий делецию NRHP1 (Пц1 (Pt1)); 1C: сравнение ОТ-ПЦР; 1D: сравнение иммуноблотов.

На Фиг. 2 представлен автоматический анализ *in vitro* для количественного определения цилиогенеза в представляющих интерес клетках.

На Фиг. 3 продемонстрировано, что процент реснитчатых клеток у пациента с НФ (Пц1) в значительной степени ниже, чем у контрольных клеток (Контр. (CTRL)).

Фиг. 4 представляет собой схематический чертеж, демонстрирующий этапы нового анализа на основе ресничек.

На Фиг. 5 изображены воздействия: (A) флутиказона, (B) фенирамина, (C) верапамила, (D) ML-141, (E) митоксантрона, (F) трописетрона, (G) этопропазина, (H) ципрогептадина, (I) паклитаксела и (J) симвастатина на цилиогенезе, по сравнению с ДМСО.

На Фиг. 6 изображено воздействие алпростадилла на цилиогенез по сравнению с ДМСО.

На Фиг. 7A изображен дозозависимый эффект алпростадилла на цилиогенез по сравнению с ДМСО.

На Фиг. 7B изображено соответствующее представление в логарифмическом масштабе только по одной оси для определения IC₅₀.

На Фиг. 8A-8C представлены мета-анализы результатов, полученных во множественных экспериментах с цилиогенезом при воздействии алпростадилла.

На Фиг. 9 (A-D) представлены мета-анализы результатов, полученных в множественных экспериментах с цилиогенезом при воздействии алпростадилла, с указанием отдельных данных для каждого эксперимента.

На Фиг. 10 изображена стабильность ПГЕ1 в экспериментальных условиях.

На Фиг. 11A изображено воздействие алпростадилла (ПГЕ1), динопростона (ПГЕ2) и 16,16-диметил-ПГЕ2 (дмПГЕ2) на цилиогенез.

На Фиг. 11В изображено воздействие аллпростадилла (ПГЕ1) на линии клеток, полученные от пациентов с делецией NRHP1.

На Фиг. 11С представлен мета-анализ ресничек.

На Фиг. 12 изображено воздействие ПГЕ2 на цилиогенез.

На Фиг. 13 изображен профиль экспрессии EP1-4 в почечной ткани человека, полученный с помощью вестерн-блоттинга, и в сетчатке человека, полученный с помощью иммуногистохимии.

На Фиг. 14А продемонстрировано, что мРНК EP2 и EP4 экспрессируются в контрольных клетках и клетках почечного эпителия, полученных от Пц1.

На Фиг. 14В продемонстрировано, что EP2 экспрессируется на уровне белка в контрольных клетках и клетках почечного эпителия, полученных от Пц1.

На Фиг. 14С изображена экспрессия мРНК генов, кодирующих рецепторы EP1-4, во множественных контрольных клеточных линиях и во множественных клеточных линиях почечного эпителия, полученных от пациентов с НФ.

На Фиг. 15 представлены модуляторы простагландина (ПГ) (агонисты и антагонисты), проверенные на их воздействие на цилиогенез.

На Фиг. 16А представлен мета-анализ ресничек.

На Фиг. 16В изображены клетки, полученные от пациентов с НФ, которые подвергались воздействию CP-544326.

На Фиг. 16С изображено соответствующее представление в логарифмическом масштабе только по одной оси.

На Фиг. 17А изображено воздействие L-902.688 на цилиогенез.

На Фиг. 17В изображено воздействие CP-544326 на цилиогенез.

На Фиг. 17С изображено воздействие CP-544326 на клетки, полученные от пациента.

На Фиг. 17D представлен мета-анализ ресничек.

На Фиг. 18 изображены РНК, выделенные способом RLT или Qiazol для микроматричного анализа.

На Фиг. 19 представлены данные микромассива образцов, проанализированные с помощью иерархической кластеризации.

На Фиг. 20 представлены данные микромассива образцов, проанализированные с помощью иерархической кластеризации.

На Фиг. 19 представлены данные микромассива образцов, проанализированные с помощью иерархической кластеризации.

На Фиг. 20 представлены данные микромассива образцов, проанализированные с помощью иерархической кластеризации.

На Фиг. 21 представлены данные микромассива образцов, проанализированные с помощью иерархической кластеризации.

На Фиг. 22 представлены общие данные микромассива, полученные от образцов выделенных RLT способом.

На Фиг. 23 представлены общие данные микромассива, полученные от образцов выделенных Qiazol способом.

На Фиг. 24A и 24B изображено отсутствие существенного различия между данными микромассива, полученными для различных доз.

На Фиг. 25 изображен процесс мультиомного анализа воздействия лекарственного средства на цилиогенез.

На Фиг. 26 (A-E) изображен фенотипический анализ воздействия алпростадилла на цилиогенез.

На Фиг. 27 изображена дифференциальная экспрессия мРНК подвергаемых и потенциально подвергаемых воздействию лекарственных средств (drugged и druggable) генов.

На Фиг. 28A-C изображен анализ путей на основе мультиомных данных, и связанных с ними целевых возможностей для (A) взаимодействий простагландина E1 (алпростадилла), нацеленных на последующие взаимодействия, (B) взаимодействий *NPHP1*, нацеленных на более ранние взаимодействия, и (C) прямых взаимодействий, связанных с генами *NPHP1-20*.

На Фиг. 29 изображена модель *NPHP4* МО данио рерио.

На Фиг. 30 представлены протоколы медикаментозного воздействия на модели *NPHP4* МО данио рерио.

На Фиг. 31 (A-C) представлены общие результаты влияния инъекции морфолино на данио рерио.

На Фиг. 32 изображены (A) характерные искривления оси тела данио рерио; и (B, C) воздействие алпростадилла на искривления оси тела у данио рерио.

На Фиг. 33 изображены (A) характерные кисты эмбриональных почек данио рерио; и (B, C) воздействие алпростадилла на кисты эмбриональных почек данио рерио.

На Фиг. 34 изображено (A, B) воздействие динопростона на искривления оси тела у данио рерио; и (C) воздействие динопростона на кисты эмбриональных почек данио рерио.

На Фиг. 35 изображено воздействие CP-544326 на кисты эмбриональных почек данио рерио.

На Фиг. 36 представлен план исследования фармакокинетики.

На Фиг. 37А-37Е представлены результаты исследования фармакокинетики.

На Фиг. 38А изображена окрашенная реактивом Шиффа сетчатка мышей дикого типа и *Nphp1^{-/-}*.

На Фиг. 38В представлены результаты полуавтоматического способа количественного определения толщины слоев сетчатки.

На Фиг. 38С представлена количественная оценка толщины слоев сетчатки у мышей *Nphp1^{-/-}* по сравнению с мышами дикого типа.

На Фиг. 39А и В изображено иммуногистохимическое окрашивание Сер290 в сетчатке в качестве маркера ресничек у мышей дикого типа и *Nphp1^{-/-}*, и родопсина и PNA (агглютинаина арахиса) в качестве маркеров фоторецепторов наружного сегмента (OS) и внутреннего/наружного сегментов соответственно.

На Фиг. 40 изображена электроретинограмма мышей *Nphp1^{-/-}* по сравнению с мышами дикого типа.

На Фиг. 41 изображена экспрессия рецептора EP2 у мышей дикого типа и *Nphp1^{-/-}*.

На Фиг. 42 представлен план исследования в соответствии с одним вариантом реализации данного раскрытия изобретения.

На Фиг. 43 изображено воздействие CP-544326 на соотношение толщины слоев сетчатки ONL/OPL у мышей *Nphp1^{-/-}*.

На Фиг. 44 изображено воздействие CP-544326 на нарушение локализации родопсина, меченного зеленым флуоресцентным белком, у ONL у мышей *Nphp1^{-/-}*.

На Фиг. 45 изображено воздействие CP-544326 на электроретинограмму мышей *Nphp1^{-/-}*.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Следует понимать, что раскрытие изобретения не ограничено конкретными вариантами реализации изобретения, описанными ниже, поскольку могут быть сделаны изменения конкретных вариантов реализации изобретения, и они также попадают в объем прилагаемой формулы изобретения. Также следует понимать, что используемая терминология предназначена для описания конкретных вариантов реализации изобретения и не предназначена для их ограничения.

Используемые в контексте данного документа и в прилагаемой формуле изобретения существительные в единственном числе включают соответствующие существительные во множественном числе, если в контексте явно не указано иначе. Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют то же значение, которое обычно понимают специалисты в области техники, к которой относится это изобретение.

Пациенты с НФ

Нефронофтиз (НФ) представляет собой рецессивную тубулоинтерстициальную цилиопатию, которая характеризуется прогрессирующим разрушением почек, приводящим к терминальной почечной недостаточности (ТПН). Проявление ТПН, вызванной НФ, варьирует от первых месяцев жизни (инфантильный тип НФ) до >60 лет (взрослый тип НФ), с > 17% с ТПН после 20 лет. Вызывающие заболевание мутации были выявлены в более чем 20 генах, связанных с НФ (например, *NRHP1*–20, *IFT140*, *TRAF3IP1/IFT54*), что составляет около 60% всех случаев с НФ. Полная делеция локуса *NRHP1* (*NRHP1*(дел), *NRHP1*(del)) составляет более 20% случаев НФ. Как правило, портал о редких заболеваниях Orphanet сообщает о частоте примерно 1 к 100 000 по всему миру (Канада 1/50,000, США 1/900,000, Финляндия 1/100,000; Франция 1/50,000). В данное время НФ не лечится.

Цилиопатии часто вызваны мутациями в генах, кодирующих белки переходной зоны (ПЗ (TZ)) или компоненты интрафлагеллярного транспорта (ИФТ (Reiter, J. & Leroux, M., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 18:533-47, 2017; Hildebrandt, F. *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, 364:1533-43, 2011; Czarnecki, P. & Shah, J., *Trends Cell Biol.*, 22:201-10, 2012). Функционально ПЗ представляет собой компартмент у основания первичных ресничек на проксимальном конце аксонемы, контролирующей вход и выход цилиарного белка (Betleja, E. & Cole, D., *Curr. Biol.*, 20:R928-31, 2010; Craige, B. *et al.*, *J. Cell Biol.*, 190:927-40, 2010; Omran, H., *J. Cell Biol.*, 190:715-7, 2010; Benzing, T. & Schermer, B., *Nat. Genet.*, 43:723-4, 2011). На молекулярном уровне, ПЗ состоит из различных мультипротеиновых комплексов, модуля *NRHP1*-4-8, модуля *NRHP5*-6 (Cep290), модуля *MKS/B9* и комплекса Инверсина (*INVS*; *NRHP2*) (Sang, L. *et al.*, *Cell*, 145:513-28, 2011). Модуль *NRHP1*-4-8, модуль *NRHP5*-Cep290 и комплекс Инверсина иногда совместно называют модулем *NRHP*.

Мутации и/или инактивация одного или нескольких генов, кодирующих белки модуля *NRHP*, могут неблагоприятно влиять на цилиогенез и/или эпителизацию,

что приводит к фиброзу и развитию кист у пациентов с НФ. Механизм ИФТ забирает компоненты у основания ресничек и транспортирует аксонемные компоненты, необходимые для сборки ресничек, и белки, участвующие в передаче сигналов ресничек. Комплекс IFT-B, состоящий из 16 различных белков, опосредует антероградный транспорт, связываясь с кинезином II. Ретроградный транспорт опосредован динеином 2 и шестью субъединицами комплекса IFT-A. Мутации в шести генах, кодирующих субъединицы IFT-A, были идентифицированы при цилиопатиях, связанных с НФ, только три субъединицы IFT-B связаны с нефронофтизом (IFT172, IFT54) (Halbritter, J. *et al.*, *Am. J. Hum. Genet.*, 93:915-25, 2013; Bizet, A. *et al.*, *Nat. Commun.*, 6:8666, 2015). В дополнение к ИФТ и ПЗ, белки отростка и GPCR также являются важными факторами для функционирования и поддержания ресничек.

Что касается модуля NPHP, у мыши-мутанта *Nphp4* развилась дегенерация сетчатки, но не кисты почек или серьезные дефекты цилиогенеза; мужчины были бесплодными и имели сперматозоиды с пониженной подвижностью (Won, J. *et al.*, *Hum. Mol. Genet.*, 20:482-96, 2011). Аналогично, целенаправленное разрушение *Nphp1* у мыши (делеция последнего С-концевого экзона 20) не вызывало нефронофтиза, но показывало быструю дегенерацию сетчатки, начиная с P14-P21 (Jiang, S. *et al.*, *Hum. Mol. Genet.*, 17:3368-79, 2008) и вызвало мужское бесплодие (Jiang, S. *et al.*, *Hum. Mol. Genet.*, 18:1566-77, 2009). У мышей нокаутированных по *Serp290* отсутствуют соединительные реснички в фоторецепторах и не созревают подвижные эпидимальные реснички, что согласуется с их дегенерацией сетчатки и фенотипами гидроцефалии (Rachel, R. *et al.*, *Hum. Mol. Genet.*, 24:3775-91, 2015).

Мутации в NPHP1 являются наиболее распространенной причиной НФ. В большой когорте пациентов с ТПН у взрослых (неселективных по этиологии), НФ, обусловленный гомозиготной делецией полного гена *NPHP1* (NPHP (del)), имеет распространенность у одного из 200 пациентов (0,5%) во всех случаях ТПН с началом у взрослых (Snoek, R. *et al.*, *J. Am. Soc. Nephrol.*, 29:772-9, 2018). Хотя заболеваемость была явно выше у пациентов с началом ТПН от 18 до 50 лет (распространенность 0,9%), НФ может возникать в возрасте до 61 года. Поскольку способ, который они использовали, недооценивает общее количество причинных мутаций, они приходят к выводу, что НФ является относительно частой моногенной причиной возникновения ТПН у взрослых, которая, вероятно, недооценивается в современной повседневной практике.

В когорте реципиентов трансплантации почки и (соответствующих донору) контролей из Международного Сетевого Консорциума по Генетическим и Трансляционным Исследованиям в Трансплантологии (iGenTRaIN) приблизительная относительная частота 0,5% (26 из 5606) пациентов, гомозиготных по делеции *NRHP1*, была выявлена среди взрослых с ТПН (от 18 до 50 лет). Из них только 13% (3 из 26) были правильно диагностированы как пациенты с НФ, и приблизительно половина (11 из 26%) были диагностированы как пациенты с ТПН с неизвестной этиологией. Эти результаты показали, что до 1 из 200 (0,5%) взрослых с ТПН имеют генотип *NRHP1(дел)*; эта цифра увеличивается до 0,9%, когда наступление ТПН происходит в возрасте от 18 до 50 лет (Abstract. ASN2017 & Nephrol Dial Trans, Vol 32, 2017).

В данном документе описаны результаты, полученные с использованием исследовательской среды «Genomics England» - безопасного рабочего пространства для утвержденных исследователей для проведения исследований в базе данных проекта «100,000 Геномов» с целью выявления новых болезней и понимания болезни, связанной с пациентом, тем самым позволяя делать научное открытие и ускоряя начало его применения в лечении пациента. База данных проекта «100 000 Геномов» включает пациентов с редкими заболеваниями (и их родственников), а также больных с онкологическим заболеванием. В этой базе данных пациенты, гомозиготные по *NRHP1(дел)*, были идентифицированы с приблизительной относительной частотой 1 на 6000 (10 из 61 554) - ни у кого из них ранее не был диагностирован НФ. Из 10 идентифицированных пациентов у 7 были явные клинические признаки/симптомы НФ, такие как признаки/симптомы почечной недостаточности или цилиопатии, или они были отобраны как врожденных аномалий у пациентов с заболеваниями почек и мочевыводящих путей (CAKUT). Остальные 3 пациента имеют более сложную клиническую картину - возможно, с множеством редких заболеваний. В дополнение к гомозиготам, 193 гетерозиготных *NRHP1 (дел)* были идентифицированы в полном наборе данных (приблизительная частота 1 на 200 в этом наборе данных); эти пациенты могут быть гетерозиготными носителями, но могут также включать в себя сложные гетерозиготы *NRHP1 (NRHP1(дел) с мутацией с потерей функции (ПФ) NRHP1)* и/или эпистаз (*NRHP1(дел)* в сочетании с мутациями ПФ в другом локусе). Кроме того, пациенты могут иметь дополнительные варианты *NRHP1-ПФ*, такие как варианты сплайсинга, сдвиги рамки считывания и нонсенс-мутации, которые также могут способствовать клинической картине НФ.

Описанные в данном документе результаты *NRHP*(del) были получены в ходе исследования, проведенного с использованием базы данных «Genomics England». Это исследование стало возможным благодаря доступу к данным и результатам, полученным в исследовательской среде Genomics England, а также к пациентам, которые дали согласие на использование своих данных в исследовательских целях, и к клиницистам и командам медицинского обслуживания HC3 (NHS), которые внесли свой вклад в данные и результаты, охватываемые этим исследованием. Исследовательская среда Genomics England управляется Genomics England Limited (полностью принадлежащей Министерству Здравоохранения) и финансируется Национальным институтом исследований в области здравоохранения и NHS England (HC3 Англии), Wellcome Trust, Cancer Research UK и Советом Медицинских Исследований.

Миллионы людей во всем мире страдают от ТПН и врожденных патологий, для которых единственным лечением является трансплантация. Только в США за последние пять десятилетий было выполнено более 600 000 трансплантаций, и спрос сегодня выше, чем когда-либо. К сожалению, имеющееся наличие донорских органов не в состоянии удовлетворить потребности в трансплантатах. Варианты реализации данного раскрытия изобретения включают выявление и/или лечение пациентов, которые являются либо гомозиготными, либо гетерозиготными в отношении *NRHP* (например, ТПН, обусловленной НФ) и/или имеют связанные с НФ цилиопатии (например, *NRHP1*).

Клетки, полученные от пациента с НФ

В данном документе описаны материалы и способы идентификации терапевтических агентов, полезных для лечения заболеваний или расстройств, связанных с цилиопатией, например НФ, или расстройств, связанных с *NRHP1*(дел). Такие способы могут включать использование клеточных линий, полученных от пациентов. Такие клеточные линии, как разработано, также могут быть использованы для других родственных способов, включая, например, мониторинг эффективности данного лечения для заболевания или расстройства, связанного с цилиопатией, или заболеваний или расстройств, связанных с *NRHP1*(дел).

Для идентификации соединений для лечения заболеваний, связанных с цилиопатиями, таких как, например, НФ, были взяты клетки, полученные от пациентов с НФ, и были созданы клеточные линии. Вкратце, очищенные клетки

почечного эпителия, которые в основном представляют собой клетки проксимального почечного канальца (tbc), выделенные из мочи пациентов с делецией NPHP1, были immortalized путем ретровирусного переноса гена SV40 T-антигена. Клетки фиксировали и флуоресцентно метили с использованием Hoechst (для окрашивания ядер), антитела против γ -тубулина (для окрашивания базальных тел) и антитела против ARL13B (для окрашивания ресничек) для детекции с помощью иммунофлуоресцентной микроскопии. В отличие от большинства нормальных клеток почечного эпителия (UREC), полученных из мочи, которые имеют по одной ресничке на каждую клетку (Фиг. 1A), большинство клеток, полученных от пациентов с НФ, не имеют ресничек (Фиг. 1B). Отсутствие экспрессии NPHP в этих клетках, полученных от пациентов с НФ, было дополнительно подтверждено с помощью ОТ-ПЦР (Фиг. 1C) и иммуноблоттинга (Фиг. 1D), которые не выявили, соответственно, обнаруживаемый уровень экспрессии РНК NPHP и экспрессии белка NPHP в клетках, полученных от пациента с НФ.

На Фиг. 2 представлен автоматический анализ *in vitro*, который можно использовать для количественной оценки цилиогенеза в представляющих интерес клетках. Вкратце, полученные от пациентов с НФ клетки и контрольные клетки культивировали в полной среде при 39 °C (недопустимая температура для экспрессии SV40) с последующим автоматическим анализом ресничек с использованием иммунофлуоресцентной микроскопии для измерения цилиогенеза, *например*, в пересчете на % ресничек. Система с технологией вращающегося диска может использоваться для лекарственного скрининга (Фиг. 5, A-J) и анализа цилиогенеза по набору данных G3 multi-OMIC (Фиг. 29, A-E). Система Opera Phenix может использоваться для другого фенотипического анализа (*например*, титрования аллпростадилла и CP-544326 при цилиогенезе, скрининга других агонистов EP основываясь на цилиогенезе, анализа цилиогенеза с использованием других клеточных линий, полученных от пациента NPHP1, анализа ацетилирования γ -тубулина).

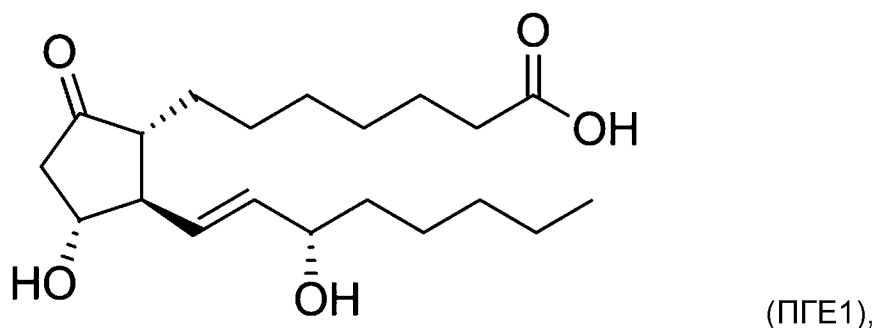
На Фиг. 3 продемонстрировано, что процент реснитчатых клеток у пациента с НФ (Пц1) был в значительной степени ниже, чем у контрольных клеток (Контр.) ($p = 0.0065$).

Лекарственный Скрининг

Описанный выше анализ, основанный на изучении ресничек, может быть использован для идентификации соединений, которые восстанавливают цилиогенез. На Фиг. 4 продемонстрированы процессы анализа, основанного на изучении ресничек, в котором клетки могут быть посеяны в клеточную культуру (например, в 96-луночном планшете) в День 0, инкубированы с препаратами-кандидатами в День 3, и зафиксированы и флуоресцентно помечены Hoechst, антителом против γ -тубулина и антителом против ARL13B в День 5. Например, может быть выполнено автоматическое случайное получение 35 изображений на лунку. Каждое изображение может иметь z-стек из 10 изображений, сделанных с интервалом <1 мкм. Может быть получена последовательная визуализация ядра (Hoechst при 461 нм), базального тельца (γ -тубулин при 555 нм) и ресничек (ARL13b при 647 нм).

Используя процессы, изображенные на Фиг. 4, клетки, полученные от пациентов с НФ, обрабатывали несколькими препаратами-кандидатами для идентификации лекарственных препаратов, которые могут восстанавливать цилиогенез. На Фиг. 5, части A-J, указывают на то, что флутиказон, фенирамин, верапамил, ML-141, митоксантрон, трописетрон, этопропазин, ципрогептадин, паклитаксел и симвастатин, соответственно, в различных испытанных концентрациях не оказывали значительного влияния на цилиогенез по сравнению с ДМСО. Удивительно, но из Фиг. 6 следует, что алпростадил по сравнению с ДМСО в значительной степени восстанавливал цилиогенез в клетках, полученных от пациентов с НФ, за счет увеличения процента реснитчатых клеток.

Алпростадил, *то есть* простагландин E1 (ПГЕ1), имеет химическую структуру



и проявляет активность в отношении вазодилатации, ингибирования агрегации тромбоцитов и стимуляции гладкой мускулатуры кишечника и матки для лечения заболеваний сердца и эректильной дисфункции. Алпростадил может действовать

как агонист, связывая рецепторы простагландина Е-типа (EP), которые являются рецепторами, сопряженными с G-белками (GPCR), со значениями IC_{50} 36, 10, 1,1 и 2,1 нМ для EP1, EP2, EP3 и EP4, соответственно. GPCR стимулируют аденилатциклазу и впоследствии повышают внутриклеточный цАМФ.

Используемый в контексте данного документа термин «агонист GPCR» включает композиции, которые активируют GPCR, чтобы имитировать действие эндогенной сигнальной молекулы, специфичной для этого рецептора. Термин «антагонист GPCR» включает композиции, которые ингибируют активность GPCR. Активность GPCR может быть измерена по способности связываться с эффекторной сигнальной молекулой, такой как G-белок. «Активированный GPCR» представляет собой GPCR, который способен взаимодействовать и активировать G-белок. Ингибированный рецептор может обладать пониженной способностью связывать внеклеточный лиганд и/или продуктивно взаимодействовать с G-белком и активировать его.

Применение агониста GPCR, *например*, изопропила тапренепага, может проводиться в концентрации, *например*, от около 0,1 мг/кг до около 20 мг/кг, от около 0,5 мг/кг до около 20 мг/кг, от около 1 до около 20 мг/кг, от около 2 до около 20 мг/кг; от около 3 мг/кг до около 20 мг/кг; от около 4 мг/кг до около 20 мг/кг; от около 5 мкг/кг до около 20 мг/кг; от около 6 до около 20 мг/кг, от около 7 мг/кг до около 20 мг/кг, от около 8 мг/кг до около 20 мг/кг, от около 9 мг/кг до около 20 мг/кг, от около 10 мг/кг до около 20 мг/кг, от около 12 мг/кг до около 20 мг/кг, от около 14 мг/кг до около 20 мг/кг, от около 16 мг/кг до около 20 мг/кг или от около 18 мг/кг до около 20 мг/кг с частотой, *например*, каждый день, каждые 2 дня, каждые 3 дня, каждые 4 дня, каждые 5 дней, каждые 6 дней, каждые 7 дни, каждые 8 дней, каждые 9 дней, каждые 10 дней, один раз в неделю, один раз каждые 2 недели, один раз каждые 3 недели или один раз в месяц.

Чтобы определить эффективную концентрацию алпростадилла для восстановления цилиогенеза, проводили автоматический анализ ресничек с титрованием алпростадилла от 1 нМ до 2 мкМ (Фиг. 7А) и от 100 пМ до 2 мкМ (Фиг. 7В). Эффективные концентрации агонистов GPCR, *например* алпростадилла, могут составлять от около 1 пМ до около 10 мкМ, от около 10 пМ до около 5 мкМ, от около 50 пМ до около 5 мкМ, от около 100 пМ до около 5 мкМ, от около 1 нМ до около 5 мкМ, от около 1 нМ до около 4 мкМ, от около 1 нМ до около 3 мкМ, от около 1 нМ до около 2,5 мкМ, от около 1 нМ до около 2 мкМ, от около 10 нМ до около 2 мкМ, от около 100 нМ до около 2 мкМ, от около 500 нМ до около 2 мкМ или от около 1 мкМ

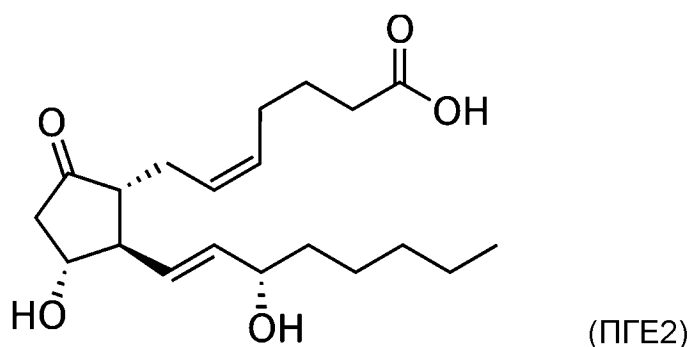
до около 2 мкМ. На Фиг. 7С изображено соответствующее представление в логарифмическом масштабе только по одной оси для определения IC_{50} , указывая на, что алпростадил в значительной степени увеличивает % реснитчатых клеток в зависимости от дозы препарата в клетках, полученных от пациентов с НФ.

На Фиг. 8А-8С и 9 (части А-Д) представлен мета-анализ, демонстрирующий, что воздействие алпростадилем (2 мкМ) не оказывает значительного влияния на цилиогенез в контрольных нормальных эпителиальных клетках (Контр.) по сравнению с контролем (ДМСО 0,04%) (Фиг. 8А). И напротив, воздействие алпростадилем в значительной степени увеличивает цилиогенез в клетках, полученных от пациентов с НФ (Пц1), по сравнению с контролем (ДМСО 0,04%) (Фиг. 8В). На Фиг. 8С изображено увеличение около двух раз влияния алпростадиле на цилиогенез в клетках, полученных от пациентов с НФ, по сравнению с контрольными клетками, которые не подвергались воздействию алпростадилем, т.е. контролем (ДМСО 0,04%).

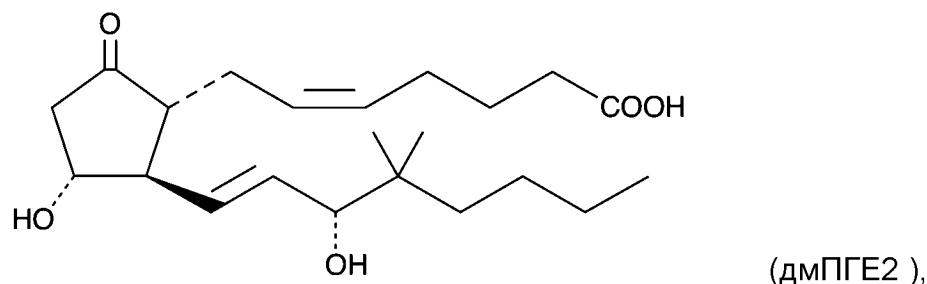
Мета-анализ также демонстрирует почти линейное влияние дозы алпростадиле на цилиогенез. На Фиг. 9 (части А и В), например, представлено значение R^2 , равное 0,9194, относительно влияния алпростадиле на цилиогенез в контрольных нормальных эпителиальных клетках. Аналогично, на Фиг. 9 (части С и D), например, представлено значение R^2 , равное 0,8489, относительно влияния алпростадиле на цилиогенез в клетках, полученных от пациентов с НФ.

Чтобы определить стабильность алпростадиле (ПГЕ1), были получены супернатанты из клеток почечного эпителия (UREC) мочи, подвергшихся воздействию различных концентраций алпростадиле после 24 и 48 часов воздействия. Затем образцы были выделены и разделены на равные части для анализа на системах LC/MS/MS и Polar LC. На Фиг. 10 продемонстрировано, что ПГЕ1 стабилен в условиях эксперимента.

В дополнение к ПГЕ1, другие агонисты EP, такие как простагландин E2 (ПГЕ2 или динопростон), имеющие химическую структуру



и его производное длительного действия, 16,16-диметил-ПГЕ2 (дмПГЕ2), имеющее химическую структуру



также были проверены на их способность восстанавливать цилиогенез. На Фиг. На фиг.11А изображено, что ПГЕ2 и дмПГЕ2 оказывают восстановительное воздействие на цилиогенез, сходное с таковыми для аллпростадилла в клетках, полученных от пациентов с НФ, тогда как в контрольных нормальных клетках значительного влияния не наблюдалось. Небольшое снижение восстановления цилиогенеза в клетках, полученных от пациентов с НФ, наблюдалось при самой высокой концентрации (40 мкМ динопростона и 20 мкМ дмПГЕ2), что может быть связано с цитотоксичностью.

Чтобы проверить влияние аллпростадилла (ПГЕ1) на клетки, с делецией *NRHP1*, клеточные линии, полученные от пациентов с *NRHP1*(дел), *например*, PT1, 1-03-P, 1-06-P1, 1-06-P2, 1-09-P, 1-10-P и 1-12-P подвергали воздействию аллпростадиллом (2 мкМ) или ДМСО. На Фиг. 11В продемонстрировано, что аллпростадилл в значительной степени увеличивает скорость цилиогенеза в клетках с делецией *NRHP1*, однако аллпростадилл не оказывает значительного влияния на скорость цилиогенеза в нормальных контрольных клетках, из чего можно сделать вывод, что аллпростадилл эффективен в восстановлении цилиогенеза у пациентов с делецией *NRHP1*.

Метаанализ на Фиг. 11С демонстрирует линейно-регрессионный анализ предыдущих данных, где наклон отражает влияние аллпростадилла на цилиогенез контрольных клеток и множественных клеточных линий, полученных от пациентов с НФ, каждый символ представляет независимый эксперимент, а каждый цвет

представляет клеточную линию пациента (называемые 1-09-P L4, 1-06-P1, 1-06-P2, PT-1). Линейная регрессия для данных контрольных нормальных эпителиальных клеток показывает значение наклона между 0,7665 и 0,9974, что свидетельствует об отсутствии влияния алпростадилла на цилиогенез. И напротив, линейная регрессия для множественных клеток, полученных от пациентов с НФ, показывает суммарное значение наклона 1,414 или диапазон значений наклона от 1,333 до 1,506, что указывает на стимулирующее действие алпростадилла на цилиогенез.

Простагландины содержатся в большинстве тканей человека и синтезируются из незаменимых жирных кислот. Структурные различия между разными простагландинами объясняют различную биологическую активность. Простаноиды, включая простагландины, обильно вырабатываются в почках. Простаноиды возникают при высвобождении арахидоновой кислоты (AA) из мембранных фосфолипидов фосфолипазой A2. Арахидоновая кислота подвергается биоксигеназной и пероксидазной активности циклооксигеназ (или простагландин-G/H-синтаз) с образованием простагландина G2 (ПГГ2 (PGG2)) и затем простагландина H2 (ПГН2 (PGH2)). ПГН2 является субстратом для синтаз, включая ПГЕ2-синтазу, ПГD2-синтазу, простагландин-синтазу, ПГF2 α -синтазу (ПГF2 α также можно синтезировать непосредственно из ПГЕ2) и тромбоксан-синтазу для синтеза отдельных классов простаноидов, включая ПГЕ2. Все эти классы имеют дискретные подтипы рецепторов, включая EP1-4, через которые они инициируют свои действия. Циклооксигеназы 1 и 2 (ЦОГ1 (COX1) и ЦОГ2 (COX2)) являются основными мишенями нестероидных противовоспалительных препаратов (НПВП (NSAID)), но они могут быть специфичными для одной изоформы или другой, селективными или неселективными. Блокирование синтеза ПГН2 посредством ингибирования ЦОГ может снизить уровни всех последующих простаноидов.

ПГЕ в цилиогенезе

ПГЕ2 является наиболее характерным простаноидом в патофизиологии почек. ПГЕ2 синтезируется ЦОГ1 и ЦОГ2 и экспортируется через белок переносчик Lkt/ABCC4 на клеточную мембрану. Высвобожденный ПГЕ2 связывается с рецептором EP4 на ресничке, что приводит к активации GPCR (G) и аденилатциклазы (АЦ (AC)) для увеличения цАМФ, тем самым увеличивая антероградный ИФТ и усиливая цилиогенез.

Для формирования и удлинения ресничек необходим сигнальный каскад COX-Lkt/ABCC4-EP4 (в клетках почечных протоков мыши IMCD3 и в модели данио рерио). Известно, что передача сигналов цАМФ-зависимой киназы усиливает антероградный ИФТ во время цилиогенеза. Lkt/ABCC4-опосредованная передача сигналов ПГЕ2 влияет на уровень цАМФ и способствует цилиогенезу за счет увеличения скорости антероградного ИФТ. Применение ПГЕ2 вызывает увеличение внутриклеточного цАМФ, но не Ca^{2+} во время цилиогенеза в клетках IMCD3. ПГЕ2 действует аутокринным и/или паракринным образом, поскольку клетки могут реагировать на ПГЕ2, высвобождаемый либо самими клетками, либо соседними клетками. В раковых клетках человека взаимодействие ПГЕ2 с рецептором EP4 индуцирует передачу сигналов Wnt/ β -катенина, что приводит к экспрессии ЦОГ2 и, таким образом, создает петлю положительной обратной связи, ведущую к дальнейшему синтезу ПГЕ2.

На Фиг. 12 продемонстрировано, что добавление экзогенного ПГЕ2 увеличивало как длину ресничек, так и процент реснитчатых клеток в контрольных клетках, но не в клетках с нехваткой EP4, что указывает на то, что EP4 действует ниже передачи сигналов ПГЕ2 во время цилиогенеза.

ПГЕ2 продуцируется ПГЕ-синтазой (PGES) и передает сигналы путем связывания с его GPCR: EP1–4. Активация EP1 (сопряженного с G_q) увеличивает внутриклеточный Ca^{2+} через PLC. Активация EP3 (сопряженного с G_i) увеличивает внутриклеточный Ca^{2+} с помощью PLC и/или ингибирует выработку цАМФ с помощью аденилатциклазы (АЦ). Активация EP2 или EP4 (оба сопряжены с G_s) стимулирует выработку цАМФ с помощью АЦ.

Существует около 800 человеческих GPCR, разделенных на пять основных филогенетических семейств: родопсин, секретин, адгезин, глутамат и Frizzled/Taste2. GPCR являются привлекательными мишенями для рекомбинантных белков, низкомолекулярных соединений, аллостерических лигандов или антител. 46 GPCR стали мишенями для лечения гипертонии, боли, язв, аллергии, алкоголизма, ожирения, глаукомы, психотических расстройств и ВИЧ. Одним из основных препятствий, во многом, является общее отсутствие знаний относительно связи предполагаемого GPCR с точной физиологической функцией или болезненным состоянием.

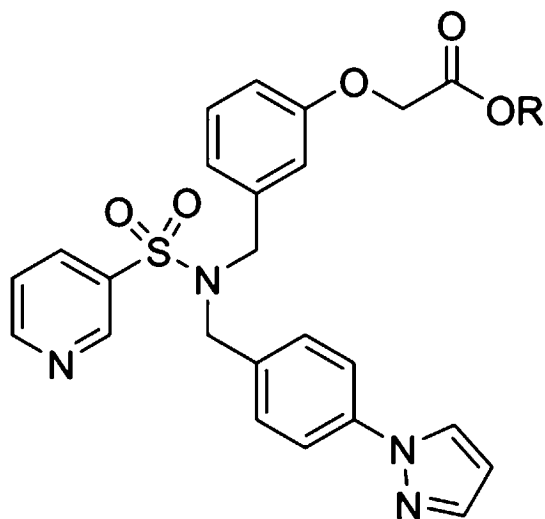
На Фиг. 13 продемонстрировано, что EP1–4 экспрессируются в почках и в сетчатке - оба органа поражены НФ и НФ-СЦ. В почке рецепторы EP дифференцированно экспрессируются вдоль нефрона, что подчеркивает

различные функциональные последствия активации каждого подтипа рецептора EP в почке. Рецепторы EP регулируют тонус сосудов в афферентной артериоле, где EP1/EP3 действуют как вазоконстрикторы, а EP2/EP4 действуют как вазодилататоры. EP1/EP4 регулирует транспорт в проксимальных канальцах. EP3 и EP4 регулируют транспорт в толстом восходящем отделе петли Генле и дистальном канальце. EP4 стимулирует высвобождение ренина из плотного пятна. EP2/EP4 оказывает сосудорасширяющее воздействие на прямые сосуды. Рецепторы EP регулируют транспорт в собирающем протоке, при этом EP1 ингибирует реабсорбцию Na^+ , EP3 ингибирует реабсорбцию H_2O , а EP4 стимулирует реабсорбцию H_2O .

Экспрессию компонентов пути PG, включая рецепторы EP, в клетках UREC определяли с помощью количественной ПЦР с детекцией в реальном времени (qRT-PCR). На Фиг. 14A продемонстрировано, что EP2 и EP4 экспрессируются на уровне мРНК и что EP2 преимущественно экспрессируется на уровне мРНК. На Фиг. 14B изображена экспрессия белка EP2 в клетках UREC.

Модуляторы ПГЕ2 (EP2)

Селективные агонисты и антагонисты рецептора EP2 продемонстрированы в Markovič, T. "Structural features of subtype-selective EP receptor modulators" Drug Discovery Today. 2017;22(1):57-71, например, который включен в данный документ посредством ссылки. Первый класс агонистов включает лиганды, которые структурно напоминают эндогенный лиганд ПГЕ2, но включают в себя основные модификации в ω -липофильной цепи, которые способствуют повышению эффективности и селективности. Второй класс агонистов представляет собой непростаноидную серию производных пиридилсульфонамида, наиболее мощным из которых является изопропила тапренепага (PF 04217329, пролекарственный препарат CP 544326). Тапренепаг имеет непростаноидную структуру

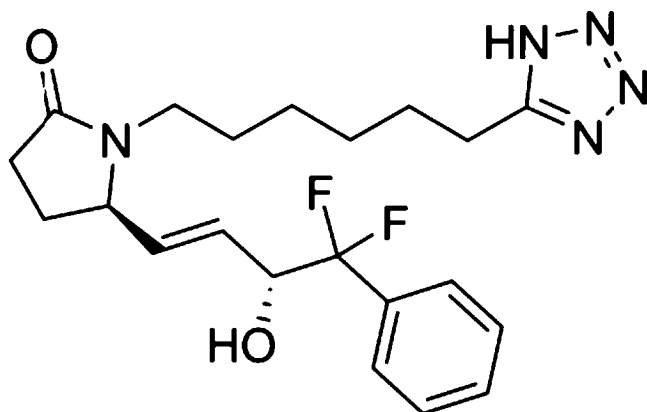


CP-544326.

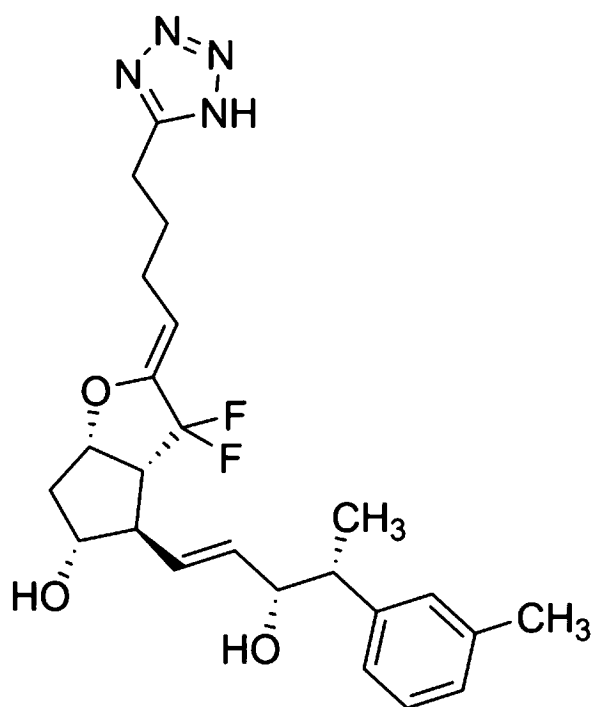
Третий класс агонистов включает непростаноидную серию производных N-фенил-у-лактида, включая AGN-210669 и AGN-210961.

PF-04418948, производное азетидин-3-карбоновой кислоты, было первым селективным антагонистом EP2, оно имеет IC_{50} 16 нМ (K_b = 1,8 нМ), демонстрируя >10,000-кратное увеличение селективности в отношении рецептора EP2 по сравнению с другими простаноидными рецепторами.

На Фиг. 5 в работе Marković (которая включена в данный посредством ссылки) изображены селективные агонисты рецептора EP4: (а) производные на основе функционализированного цикlopентанового ядра, (b) производные, несущие лактамный аналог гидроксциклопентанового ядра, и (с) структурно разнообразные EP4 агонисты. Тетразольная группа была введена в α-цепь вместо терминальной функциональной группы карбоновой кислоты с целью улучшения биодоступности, что привело к открытию L902,688, субнанолярного агониста рецептора EP4 (EC_{50} = 0,2 нМ). L902,688 имеет простаноидную структуру



Структура KAG-308



низкого наномолярного EP4-агониста, является несколько уникальной в области агонистов EP4, потому что только он основывается на остове из 7,7-дифторпростациклина.

На Фиг. 6 в работе Marković (которая включена в данный документ посредством ссылки) изображены селективные антагонисты рецептора EP4 и переключение функционального ответа в результате минимального структурного изменения: (a) селективные антагонисты рецептора EP4 и (b) переключение агонизма и антагонизма на рецепторе EP4. PG-1531, тризамещенное производное фурана, является наномолярным антагонистом EP4 с очень хорошим профилем селективности и повышенной растворимостью в воде. Посредством введения незначительных модификаций молекулы можно точно настроить внутреннюю активность последней на рецептор EP4 (пример представлен на Фиг. 17). Например, было продемонстрировано, что внутренняя активность (агонизм против антагонизма) зависит исключительно от характера замещения трифторметильного заместителя в бензильной группе соединений Фиг. 17 (часть b). Резкое изменение функции может быть достигнуто при минимальном изменении структуры лиганда.

На Фиг. 15 изображены модуляторы ПГ (агонисты и антагонисты), проверенные на их влияние на цилиогенез.

На Фиг. 16А продемонстрировано, что CP-544326, непростаноидный агонист EP2, восстанавливает цилиогенез до уровня, сходного с аллпростадилом. На Фиг. 16В продемонстрировано, что CP-544326 восстанавливает цилиогенез в

зависимости от дозы, в сравнении с ДМСО. Фиг. 16С представляет собой представление в логарифмическом масштабе только по одной оси Фиг. 16В, где титрование CP-544326 указывает на $EC_{50} = 11$ нМ для EP2. Восстановление цилиогенеза с помощью непростаноида CP-544326 подтверждает его специфичность в механизме действия. И напротив, на Фиг. 17А продемонстрировано, что L-902.688, простаноидный агонист EP4, не оказывает значительного влияния на цилиогенез. Эти результаты показывают, что EP2 играет более важную роль в цилиогенезе, чем EP4.

На Фиг. 17С продемонстрировано, что, подобно Апростадилу, применение CP-544326 увеличивает цилиогенез во множестве клеточных линий, *например*, 1-09-P, 1-06-P1 и 1-06-P2, полученных от пациентов с NPHP1(дел), по сравнению с применением ДМСО. Метаанализ на Фиг. 17D показывает линейно-регрессионный анализ Фиг. 17D, где наклон отражает влияние CP-544326 на цилиогенез контрольных клеток и множественных клеточных линий, полученных от пациентов с НФ, каждый символ представляет независимый эксперимент, а каждый цвет представляет клеточную линию пациента (называемые 1-09-P L4, 1-06-P1, 1-06-P2, PT-1). Линейная регрессия для данных контрольных нормальных эпителиальных клеток показывает значение наклона между 0,6369 и 1,03, что свидетельствует о том, что CP-544326 не влияет на цилиогенез. И напротив, линейная регрессия для множественных клеток, полученных от пациентов с НФ, показывает суммарное значение наклона 1,36 или диапазон значений наклона от 1,245 до 1,532, что указывает на стимулирующее действие алпростадила на цилиогенез.

Дифференциальный Микроматричный Анализ

Микроматричный анализ проводился для выявления экспрессированных генов, ответственных за алпростадил-опосредованное восстановление цилиогенеза. Клетки UREC культивировали в 96-луночных планшетах и обрабатывали различными концентрациями алпростадила с последующей экстракцией РНК с использованием метода RLT или Qiazol, как продемонстрировано на Фиг. 18.

На Фиг. 19 представлены данные микромассива образцов, проанализированные с помощью иерархической кластеризации. Данные были сначала сгруппированы по типу экстракции (Qiazol в сравнении с RLT). Образцы, выделенные Qiazol способом, затем кластеризовали по условию, *например*, по

сравнению с влиянием алпростадила, и образцы, выделенные RLT способом, были затем сгруппированы по повторностям.

На Фиг. 20 представлены данные микромассива образцов, проанализированные с помощью иерархической кластеризации. Данные, полученные из образцов, выделенных Qiazol, были сгруппированы по условию, а затем по повторностям, а не по дозам в ходе воздействия или среде/ДМСО в контроле.

На Фиг. 21 представлены данные микромассива образцов, проанализированные с помощью иерархической кластеризации. Данные, полученные из образцов выделенных RLT, были сгруппированы по повторностям, а затем по условию (контроль в сравнении с применением алпростадила), а не по дозам в ходе воздействия или средам/ДМСО в контроле.

Для данных микромассивов, полученных из образцов, выделенных RLT способом, не было значительного различия между ДМСО и средой, *например*, только четыре дифференциально экспрессированных гена без регулируемых экзонов/паттернов. На Фиг. 22 продемонстрировано, однако, сравнение контроля (ДМСО) с воздействием алпростадилом (0,2 мкМ, 2 мкМ и 10 мкМ), почти одинаковое количество экспрессированных и регулируемых генов в трех сравнениях концентрации алпростадила. Три верхних регулируемых гена также почти одинаковы и имеют одинаковый сигнальный путь, *например*, супрессия клеточной адгезии и внеклеточного матрикса.

Для данных микромассивов, полученных из образцов, выделенных Qiazol способом, не было значительного различия между ДМСО и средой, *например*, 33 дифференциально экспрессированных гена без регулируемых экзонов/паттернов. Однако, как продемонстрировано на Фиг. 26, при сравнении контроля (ДМСО) с воздействием алпростадилом (0,2 мкМ, 2 мкМ и 10 мкМ), наблюдалось почти одинаковое количество экспрессированных и регулируемых генов в трех сравнениях концентрации алпростадила. Три верхних регулируемых гена также почти одинаковы и имеют одинаковый сигнальный путь, *например*, супрессия клеточной адгезии и внеклеточного матрикса, усиление передачи сигналов интерферона.

Кроме того, на Фиг. 24А и 24В продемонстрировано, что были определены два кластера, собравшие в общей сложности 310 генов, то есть «кластер 1» = 120 супрессирующих генов и «кластер 2» = 190 генов с позитивной регуляцией. Это

указывает на то, что не было обнаружено существенного различия между данными микромассивов, полученных при различных дозах.

Кроме того, анализ сигнального пути с помощью пересечения данных микромассивов пациентов, которые подвергались и не подвергались воздействию алпростадилу, и с использованием РНКсек контроля и пациентов показал, что алпростадил может устранить изменение экспрессии генов, наблюдаемое в клетках, полученных от пациентов с НФ, по сравнению с контрольными клетками.

Мультиомный анализ

На Фиг. 25 изображен процесс мультиомного анализа воздействия лекарственного средства на цилиогенез. На Фиг. 26А-26Е показан, *например*, фенотипический анализ влияния алпростадилу на цилиогенез, *например*, % реснитчатых клеток, в пяти независимых экспериментах. Эти результаты показывают, что алпростадил частично восстанавливает цилиогенез при $n = 1-5$, с аналогичным коэффициентом кратности без дозозависимого ответа.

На Фиг. 27 приведены сводные данные о подвергаемых и потенциально подвергаемых воздействию лекарственных средств генах, идентифицированных из анализа дифференциальной экспрессии белков по мультиомным данным (клетки, полученные от пациентов с НФ в 0,04% ДМСО, по сравнению с клетками, полученными от пациентов с НФ, которые подвергались воздействию Алпростадом 2 мкМ), из которых названы подвергаемые воздействию гены.

На Фиг. 28 (А-С) изображен анализ путей (с использованием Ingenuity Pathway Analysis) на основе мультиомных данных, и связанных с ними целевых возможностей для (А) взаимодействий простагландина Е1 (алпростадилу), нацеленных на последующие взаимодействия, (В) взаимодействий *NRHP1*, нацеленных на более ранние взаимодействия, и (С) прямых взаимодействий, связанных с генами *NRHP1-20*.

Модель *in vivo*

На Фиг. 29 продемонстрированы результаты модели данио рерио *NRHP4* морфолино (МО), в которой эмбрионам данио рерио дикого типа на одноклеточной стадии вводили инъекцию морфолино (*например*, *NRHP4* ATG МО), который блокирует стартовый сайт мРНК *NRHP4* от связывания рибосомы. Морфолино специфически ингибирует трансляцию мРНК *NRHP4*. У данио рерио *NRHP4* МО наблюдается классический фенотип, связанный с цилиопатией, включая

искривление тела, кисты эмбриональных почек, дефекты латеральности (петли сердца) и дилатацию клоаки (обструкцию).

Фиг. 30 представляет собой схему, демонстрирующей протоколы медикаментозного воздействия (алпростадил: 0.5 мкМ and 5 мкМ) на модели данио рерио NPHP4 MO. Вкратце, трансгенным эмбрионам данио рерио *Tg(wt1b:GFP)* дикого типа вводили инъекцию морфолино (например, *nphp4* ATG MO) на одноклеточной стадии. Через 8 часов после оплодотворения (чпо (hpf)) эмбрионы, которым была введена инъекция, подвергали воздействию лекарственного вещества или носителя лекарственного вещества в воде для инкубации икринок с PTU (по 1 мл в 12-луночных планшетах). Через 24чпо медикаментозное воздействие было возобновлено, а через 36чпо была добавлена проназа для удаления хориона. Через 54чпо эмбрионы данио рерио были исследованы на фенотип, в частности на искривление тела и кисты клубочков эмбриональных почек (помечены трансгеном *Tg(wt1b:GFP)*), с использованием подходящих средств, например стереоскопа и системы PerkinElmer Opera Phenix HCS, соответственно.

На Фиг. 31, часть А продемонстрировано, что ДМСО (0,04%) не вызывало летальности, искривления тела или кист эмбриональных почек у эмбрионов данио рерио. Кроме того, у данио рерио, которым вводили инъекцию контрольный морфолино, который не влияет на экспрессию NPHP4, также не наблюдались искривления тела (Фиг. 31, часть В) или кисты эмбриональных почек (фиг. 31, часть С). Напротив, у данио рерио, которым вводили инъекцию NPHP4 MO, обнаруживаются классические фенотипы, связанные с цилиопатией, включая, например, искривление тела (Фиг. 31, часть В) и кисты эмбриональных почек (Фиг. 31, частьС), в зависимости от дозы.

На Фиг. 32, части А продемонстрировано характерное искривление оси тела данио рерио в четырех категориях: норма, класс I, класс II и класс III. На Фиг. 35, части В продемонстрировано, что воздействие алпростадилем (0,5 мкМ и 5 мкМ) не оказывало значительного влияния на искривление оси тела у данио рерио NPHP4 MO по сравнению с воздействием ДМСО ($p > 0,05$, точный тест Фишера). Аналогично, используя искривление тела в качестве автоматического количественного параметра, на Фиг. 32, части С продемонстрировано, что воздействие алпростадилем (0,5 мкМ и 5 мкМ) не оказывало значительного влияния на дорсальную кривизну у данио рерио NPHP4 MO по сравнению с воздействием ДМСО.

На Фиг. 33, части А изображены типичные кисты эмбриональных почек данио рерио: норма, умеренные и серьезные. На Фиг. 33, части В продемонстрировано,

что воздействие алпростадиллом (0,5 мкМ) в значительной степени снижало процент серьезных кист эмбриональных почек у эмбрионов, которым вводили инъекцию *nrhr4* МО, по сравнению с воздействием ДМСО ($p < 0,05$, точный тест Фишера). Аналогично, на Фиг. 33, части С продемонстрировано, что воздействие алпростадиллом (5 мкМ) в значительной степени снижало процент серьезных кист эмбриональных почек у эмбрионов, которым вводили инъекцию *nrhr4* МО, по сравнению с воздействием ДМСО.

Чтобы проверить влияние динопростона (ПГЕ₂) на цилиопатию, данио рерио *NRHR4* МО подвергали воздействию динопростона (50 мкМ) или ДМСО. На Фиг. 34 части А продемонстрировано, что воздействие динопростона в значительной степени увеличивает % нормальной кривизны оси тела у данио рерио *NRHR4* по сравнению с воздействием ДМСО ($p = 0,0066$, точный тест Фишера). На Фиг. 34, части В продемонстрировано, однако, что воздействие динопростона не оказало значительного влияния на дорсальную кривизну данио рерио *NRHR4*, по сравнению с воздействием ДМСО ($p = 0,0577$, *t*-критерий). На Фиг. 34, части С продемонстрировано, что воздействие динопростона в значительной степени снижало % тяжелых и умеренных кист эмбриональных почек и увеличивала % нормальных эмбриональных почек у данио рерио *NRHR4* МО по сравнению с воздействием ДМСО ($p < 0,008$, точный критерий Фишера).

Чтобы проверить действие селективного агониста EP₂, CP-544326, данио рерио *NRHR4* МО подвергали воздействию CP-544326 (100 нМ) или ДМСО. На Фиг. 35 продемонстрировано, что воздействие CP-544326 в значительной степени снижает % тяжелых кист эмбриональных почек и увеличивает % умеренных кист эмбриональных почек и нормальных эмбриональных почек у данио рерио *NRHR4* МО по сравнению с таковым при воздействии ДМСО ($p < 0,01$, точный критерий Фишера).

Для изучения стабильности изопропила тапренепага (PF 04217329, пролекарственного препарата CP-544326) и тапренепага (CP-544326) *in vivo* было проведено исследование фармакокинетики (ФК) на мышах дикого типа C57BL/6J. На Фиг. 36 представлен план исследования ФК. После интраперитонеальных инъекций изопропила тапренепага (1 мг/кг или 8 мг/кг) или тапренепага (8 мг/кг) концентрации этих соединений в различных органах определяли в разные моменты времени. Результаты показывают, что в целом тапренепаг является более стабильным, чем изопропил тапренепага в плазме (Фиг. 37А), почке (Фиг. 37В), семеннике (Фиг. 37С), сетчатке (Фиг. 37D) и стекловидном теле (Фиг. 37Е).

Гомозиготная делеция *NRHP1* является наиболее частой причиной ювенильного нефронофтиза 1. Гомозиготные или сложные гетерозиготные мутации в *NRHP1* также связаны, например, с синдромом Жубера 4 (аномалии головного мозга) и синдромом Сениора-Локена 1 (ретинопатия). Животных *NRHP1* НА получали, чтобы проверить, можно ли использовать тапренепаг для лечения этих заболеваний. Для создания модели мыши *Nphp1*^{-/-}, созданной с использованием CRISPR/Cas9, в эмбрионы C57BL/6J вводили одиночные направляющие РНК и генерировали делецию в 76 п.о., охватывающую АТГ в экзоне 1 *Nphp1*. Чтобы охарактеризовать естественное течение болезни у модели мыши *Nphp1*^{-/-}, гистохимическое окрашивание срезов почки и сетчатки было выполнено на мышах *Nphp1*^{+/+} и *Nphp1*^{-/-}. Модель *Nphp1*^{-/-} мыши не имеет почечного фенотипа. Напротив, у мышей *Nphp1*^{-/-} в возрасте P14 начинает проявляться уменьшение толщины слоев фоторецепторов (например, внутреннего сегмента (IS), наружного сегмента (OS) и наружного ядерного слой сетчатки (ONL)), до момента пока они не были умерщвлены в P28, что указывает на быструю дегенерацию сетчатки в этой модели, соответствующая проявлению цилиопатии.

Для оценки дегенерации сетчатки был разработан полуавтоматический инструмент для обеспечения обнаружения и количественных измерений толщины каждого слоя сетчатки на пяти отдаленных планах поля, вручную отмеченных на сечении сетчатки (Фиг. 38В). Полуавтоматический количественный анализ подтверждает явное уменьшение толщины слоев фоторецепторов ONL, IS и OS (Фиг. 38С).

Чтобы оценить влияние делеции *Nphp1* на структурную организацию фоторецепторов в этой модели, иммуногистохимический (IH) анализ был выполнен на срезах сетчатки мышей *Nphp1*^{+/+} и *Nphp1*^{-/-} (Фиг. 39А и В). Ткани фиксировали и флуоресцентно метили с помощью DAPI (для окрашивания ядер), антителом против родопсина (для окрашивания OS) и антителом против Сер290 (для окрашивания соединительных ресничек) или PNA (для окрашивания OS и IS), и детектировали с помощью иммунофлуоресцентной микроскопии. На Фиг. 39А продемонстрировано, что модель *Nphp1*^{-/-} мыши демонстрирует хорошо организованную фоторецепторную структуру с локализацией родопсина вдоль OS, ограниченной точечным распределением Сер290 в соединительных ресничках. Это указывает на то, что соединительная ресничка функционирует, чтобы обеспечить транспорт родопсина из IS в светочувствительную OS. Напротив, мыши *Nphp1*^{-/-} не могут образовывать соединительные реснички и демонстрируют явную

неправильную локализацию родопсина в IS и OS, что позволяет предположить, что транспорт родопсина требует правильного образования/поддержания соединительной реснички. Соответственно, на Фиг. 39В продемонстрировано, что у мышей *Nphp1*^{-/-} наблюдается четкая неправильная локализация родопсина в IS/OS, а также в ONL, в отличие от мышей *Nphp1*^{+/+}.

Чтобы оценить влияние делеции *Nphp1* на функциональность фоторецепторов, проводили электроретинограмму (ЭРГ (ERG)) у мышей *Nphp1*^{+/+} и *Nphp1*^{-/-} при световых стимулах различной интенсивности (Фиг. 40А-С). На Фиг. 40А и В изображены ЭРГ а- и b-волны, зарегистрированные от тех же самых животных в P21, для данной светимости. В отличие от мышей *Nphp1*^{+/+}, мыши *Nphp1*^{-/-} демонстрируют значительно более низкие амплитуды ЭРГ при данной интенсивности светового стимула. На Фиг. 40С представлено увеличение а-волн ЭРГ при световых стимулах различной интенсивности, поскольку а-волны отражают функцию фоторецептора.

Перед тестированием влияния CP-544326 на фенотипы, связанные с цилиопатией, экспрессию потенциальной мишени EP2 изучали с помощью иммуногистохимии. Флуоресцентная микроскопия показывает, что EP2 хорошо экспрессируется на уровне белка в слоях фоторецепторов IS и ONL мышей *Nphp1*^{+/+} и *Nphp1*^{-/-} в возрасте P21, хотя границы OS/IS/ONL трудно различаются у мышей *Nphp1*^{-/-}.

На Фиг. 42 изображен план эксперимента для оценки влияния CP-544326 на дегенерацию сетчатки, происходящую в модели *Nphp1*^{-/-} мыши. Вкратце, животным вводили (интраперитонеально) либо носитель лекарственного вещества, либо CP-544326 в носителе (18 мг/кг) каждые 3 или 4 дня от P6 до P21. Фенотипические показания охватывают структурные и функциональные параметры, описанные ранее для характеристики модели *Nphp1*^{-/-} мыши.

На Фиг. 43 продемонстрировано влияние CP-544326 на толщину ONL слоя фоторецептора, представленную отношением ONL/OPL, рассчитанную на основе полуавтоматического количественного определения слоев сетчатки на ИГХ срезах. Воздействие CP-544326 (18 мг/кг) в значительной степени предотвращает уменьшение соотношения ONL/OPL у мышей *Nphp1*^{-/-} по сравнению с таковым при воздействии носителем лекарственного средства ($p < 0,05$, критерий Манна-Уитни). Точно так же воздействие CP-544326 (18 мг/кг) в значительной степени предотвращало отклонение локализации родопсина у мышей *Nphp1*^{-/-}, представленной в виде параметра «Средняя интенсивность светимости зеленого

флуоресцентного белка в ONL», измеренного полуавтоматическим способом на ИГХ срезах с помощью флуоресцентной микроскопии ($p < 0,05$, t-критерий Стьюдента для одной выборки) (Фиг. 44).

Для оценки влияния CP-544326 на чувствительность фоторецепторов была выполнена электроретинограмма (ЭРГ) на мышах *Nphp1^{+/+}* и *Nphp1^{-/-}*, которые подвергались воздействию CP-544326 (18 мг/кг) или носителя лекарственного средства, при световых стимулах различной интенсивности. Увеличение а-волны ЭРГ (Фиг. 45) показывает, что CP-544326 (18 мг/кг) вызывает небольшое увеличение амплитуды ответа фоторецепторов по сравнению с таковой у мышей *Nphp1^{-/-}*, который подвергали воздействию носителем лекарственного средства.

Все ссылки, процитированные в данном раскрытии изобретения, включены в данный документ посредством ссылки, как если бы каждая ссылка была специально и индивидуально указана для включения посредством ссылки. Будет понятно, что каждый из элементов, описанных выше, или два или более вместе, также могут найти полезное применение в других типах способов, отличающихся от типа, описанного выше. Без дальнейшего анализа вышеизложенное будет настолько полно раскрывать сущность данного раскрытия изобретения, что другие могут, применяя современные знания, легко адаптировать его для различных применений, не пропуская признаков, которые, с точки зрения предшествующего уровня техники, действительно составляют существенные характеристики общего или конкретного аспекта данного раскрытия изобретения, изложенные в прилагаемой формуле изобретения. Вышеуказанные варианты реализации изобретения представлены только в качестве примера; объем данного раскрытия изобретения должен быть ограничен только следующей формулой изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения, по меньшей мере, одного заболевания, связанного с цилиопатией, у субъекта, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества, по меньшей мере, одного, агента, нацеленного, по меньшей мере, на один рецептор, сопряженный с G-белком (GPCR).
2. Способ по п. 1, в котором заболевание, связанное с цилиопатией, возникает в результате гомозиготной делеции локуса *NRHP1*.
3. Способ по п. 1, в котором заболевание, связанное с цилиопатией, возникает в результате гетерозиготной делеции локуса *NRHP1* и гетерозиготной или гомозиготной потери функции по второму локусу.
4. Способ по п. 1, в котором заболевание, связанное с цилиопатией, возникает в результате гетерозиготной делеции в одном аллеле *NRHP1* и мутации с потерей функции во втором аллеле.
5. Способ по п. 1, в котором заболевание, связанное с цилиопатией, возникает в результате мутации с потерей функции в одном аллеле *NRHP1* и другой мутации с потерей функции во втором аллеле.
6. Способ по п. 1, в котором, по меньшей мере, один агент представляет собой агонист, по меньшей мере, одного GPCR.
7. Способ по п. 6, в котором, по меньшей мере, один агент представляет собой простагландин.
8. Способ по п. 6, в котором, по меньшей мере, один агент выбран из группы, состоящей из: простагландина E1 (ПГЕ1), простагландина E2 (ПГЕ2), 16,16-диметил-ПГЕ2 (дмПГЕ2), L902,688, CP-544326, AGN -210669, 18a, AGN-210961, ED-117, CP-533536 и их комбинаций.
9. Способ по п. 6, в котором, по меньшей мере, один GPCR выбран из группы, состоящей из EP1, EP2, EP3 и EP4.
10. Способ по п. 6, в котором, по меньшей мере, одно заболевание выбрано из группы, состоящей из нефронофтиза (НФ (*NRHP*)), синдрома Сеньора-

Локена (SLS – англ.: Senior-Loken syndrome), синдрома Жубера (JBTS - Joubert syndrome) и связанных с ним расстройств (JSRD), синдрома Барде-Бидля (BBS - Bardet-Biedl syndrome), синдрома Меккеля-Грубера (MKS - Meckel-Gruber syndrome), оро-фацио-дигитального синдрома (OFD - orofacialdigital syndrome), терминальной почечной недостаточности, обусловленной потерей функции *NPHP1*, а также цилиопатии почек и сетчатки, связанных с аллелями *NPHP1*, *NPHP4*, *NPHP6/CEP290* и другими патогенными вариантами или вариантами с потерей функции.

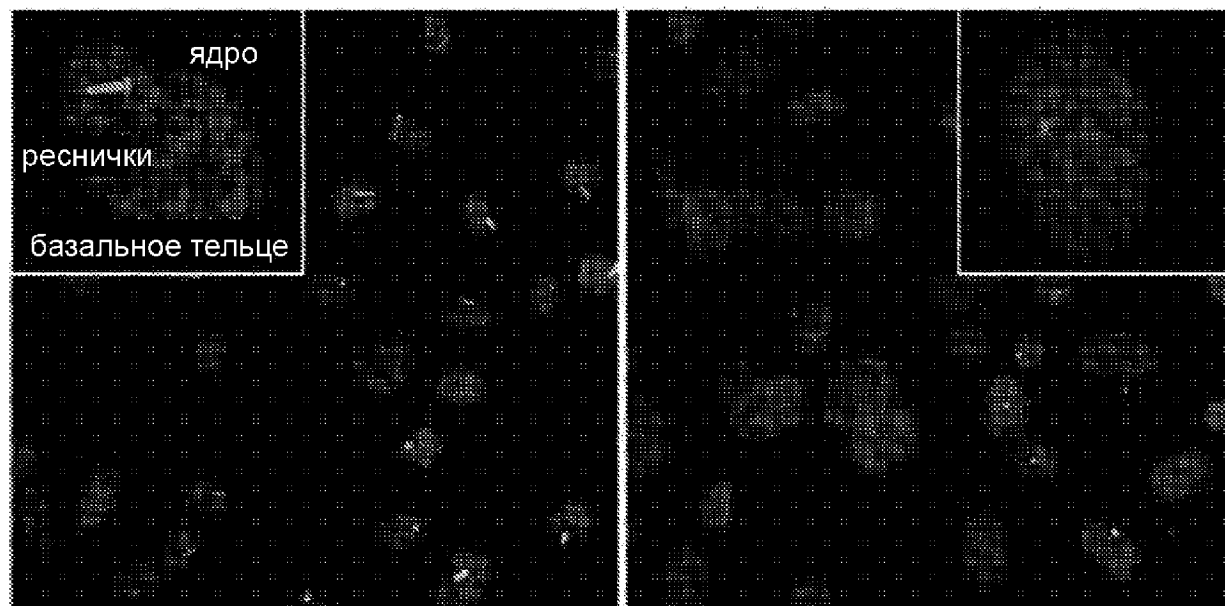
11. Способ по любому из пп. 1-10, в котором, по меньшей мере, один агент представляет собой CP-544326, и, по меньшей мере, один GPCR представляет собой EP2.
12. Способ по любому из пп. 1-10, в котором эффективное количество составляет от 100 пМ до 5 мкМ.
13. Способ по любому из пп. 1-10, в котором, по меньшей мере, одно заболевание представляет собой нефронофтиз.
14. Способ идентификации терапевтического агента для лечения, по меньшей мере, одного заболевания, связанного с цилиопатией, включающий:
 - (a) введение тестируемого агента в животную или клеточную модель заболевания, связанного с цилиопатией, при этом животная или клеточная модель демонстрирует измеряемый фенотип заболевания, связанного с цилиопатией,
 - (b) сравнение количественно измеряемого фенотипа животной или клеточной модели, которая подвергалась воздействию агента, с таковым количественно измеряемым фенотипом животной или клеточной модели, которая не подвергалась воздействию агента, и
 - (c) идентификацию тестируемого агента в качестве терапевтического агента для лечения заболевания, связанного с цилиопатией, если количественно измеряемый фенотип животной или клеточной модели, которая подвергалась воздействию агента, улучшается по сравнению с таковым у животной или клеточной модели, которая не подвергалась воздействию агента.

15. Способ по п. 14, в котором животная модель представляет собой *Danio rerio* (данио рерио).
16. Способ по п. 15, в котором животную модель получают путем введения одного или более нарушающих агентов.
17. Способ по п. 16, в котором один или более нарушающих агентов включают морфолино.
18. Способ по п. 17, в котором морфолино ингибирует экспрессию, по меньшей мере, одного нефроцистина (NPHP).
19. Способ по п. 18, в котором, по меньшей мере, один NPHP представляет собой NPHP4.
20. Способ по любому из пп. 14-19, в котором измеряемый фенотип выбран из группы, состоящей из: искривления тела, кист эмбриональных почек, латеральных дефектов сердца и дилатаций клоаки.
21. Способ по п. 20, в котором измеряемый фенотип представляет собой кисты эмбриональных почек.
22. Способ по любому из пп. 14-19, в котором, по меньшей мере, одно заболевание, связанное с цилиопатией, выбрано из группы, состоящей из нефронофтиза (НФ (NPHP)), синдрома Сеньора-Локена (SLS), синдрома Жубера (JBTS) и связанных с ним расстройств (JSRD), синдрома Барде-Бидля (BBS), синдрома Меккеля-Грубера (MKS), оро-фацио-дигитального синдрома (OFD), терминальной почечной недостаточности, обусловленной потерей функции NPHP1, а также цилиопатии почек и сетчатки, связанных с мутациями *NPHP1*, *NPHP4*, *NPHP6/CEP290*.
23. Способ по п. 22, в котором, по меньшей мере, одно заболевание представляет собой нефронофтиз.
24. Агонист GPCR для применения при лечении, по меньшей мере, одного заболевания, связанного с цилиопатией.
25. Применение агониста по п. 24, в котором агонист GPCR выбран из группы, состоящей из: простагландина E1 (ПГЕ1), простагландина E2 (ПГЕ2), 16,16-

диметил-ПГЕ2 (дмПГЕ2), CP-544326, L902,688, AGN-210669, 18a, AGN-210961, ED-117, CP-533536, и их комбинаций.

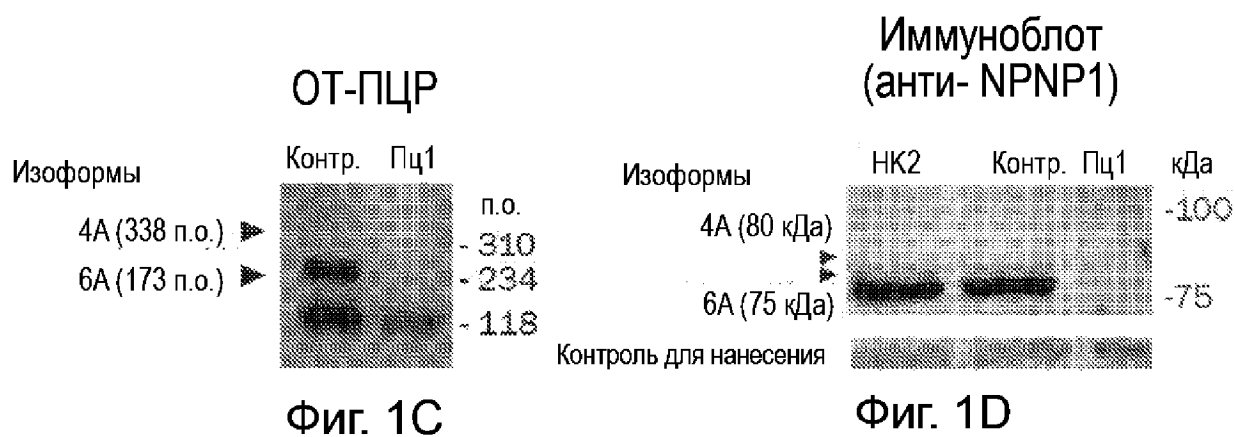
26. Применение агониста по п. 24, в котором, по меньшей мере, один GPCR выбран из группы, состоящей из EP1, EP2, EP3 и EP4.
27. Применение по любому из пп. 24-26, в котором, по меньшей мере, одно заболевание, связанное с цилиопатией, выбрано из группы, состоящей из нефронофтиза (НФ (NPHP)), синдрома Сеньора-Локена (SLS), синдрома Жубера (JBTS) и связанных с ним расстройств (JSRD), синдрома Барде-Бидля (BBS), синдрома Меккеля-Грубера (MKS), оро-фацио-дигитального синдрома (OFD), терминальной почечной недостаточности, обусловленной потерей функции NPHP1, а также цилиопатии почек и сетчатки, связанных с мутациями *NPHP1*, *NPHP4*, *NPHP6/CEP290*.
28. Способ по п. 14, в котором животная модель представляет собой мышиную модель *nphp1^{-/-}*.
29. Способ по любому из пп. 28, в котором измеряемый фенотип включает толщину слоя сетчатки.
30. Способ по п. 28 или п. 29, в котором, по меньшей мере, одно заболевание, связанное с цилиопатией, выбрано из группы, состоящей из нефронофтиза (НФ (NPHP)), синдрома Сеньора-Локена (SLS), синдрома Жубера (JBTS) и связанных с ним расстройств (JSRD), синдрома Барде-Бидля (BBS), синдрома Меккеля-Грубера (MKS), оро-фацио-дигитального синдрома (OFD), терминальной почечной недостаточности, обусловленной потерей функции NPHP1, а также цилиопатии почек и сетчатки, связанных с мутациями *NPHP1*, *NPHP4*, *NPHP6/CEP290*.

1/71

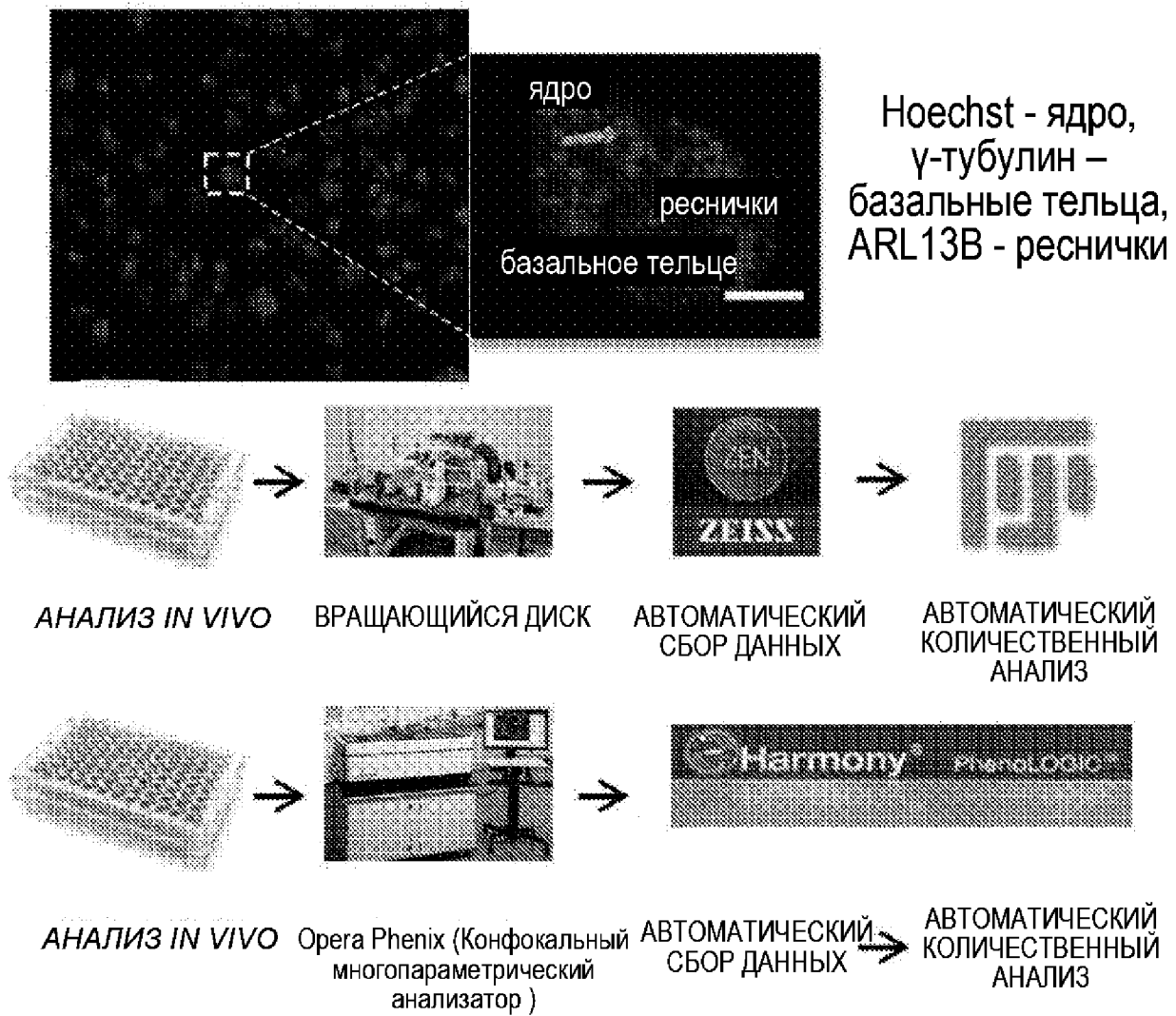


Фиг. 1А

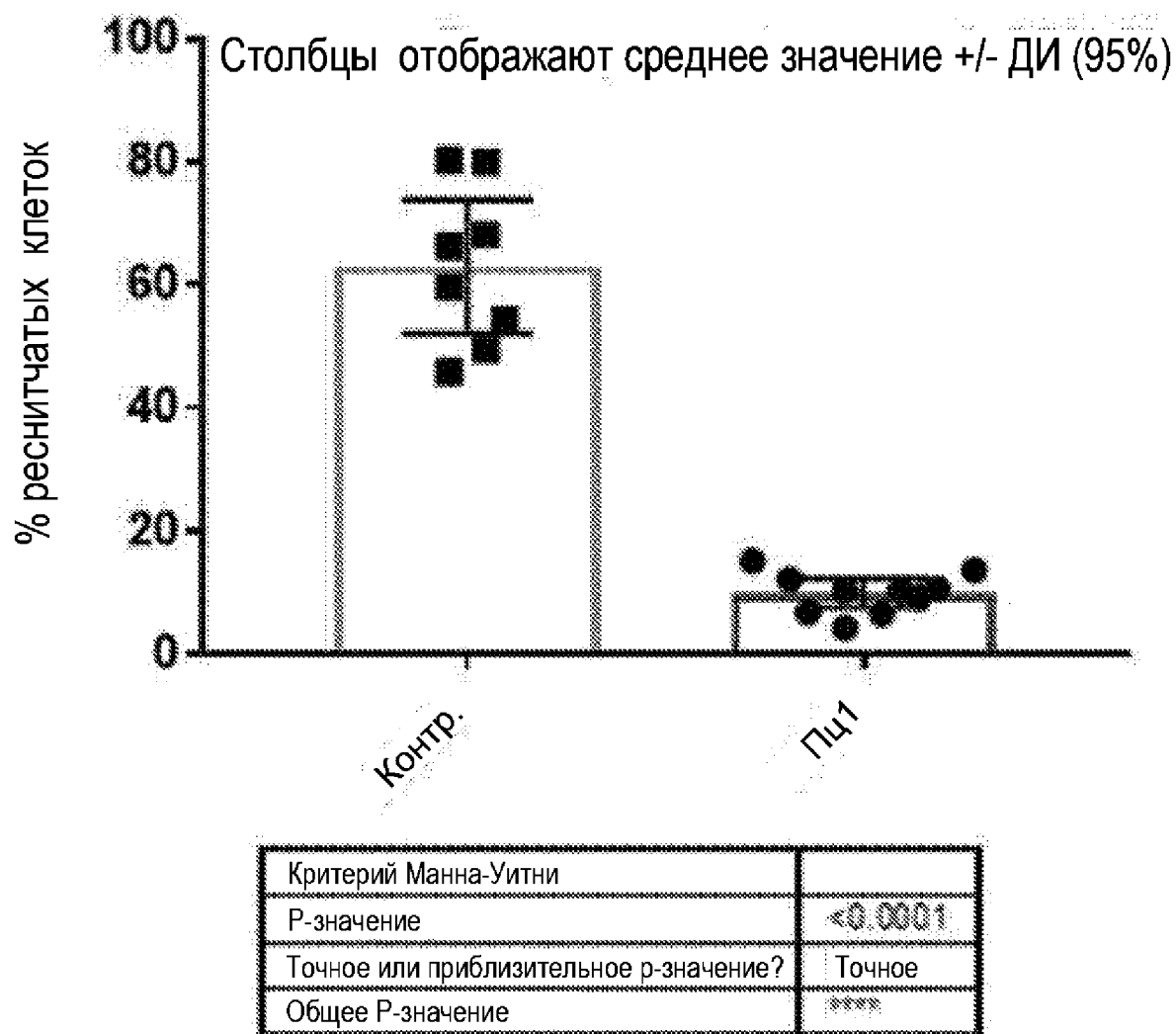
Фиг. 1В



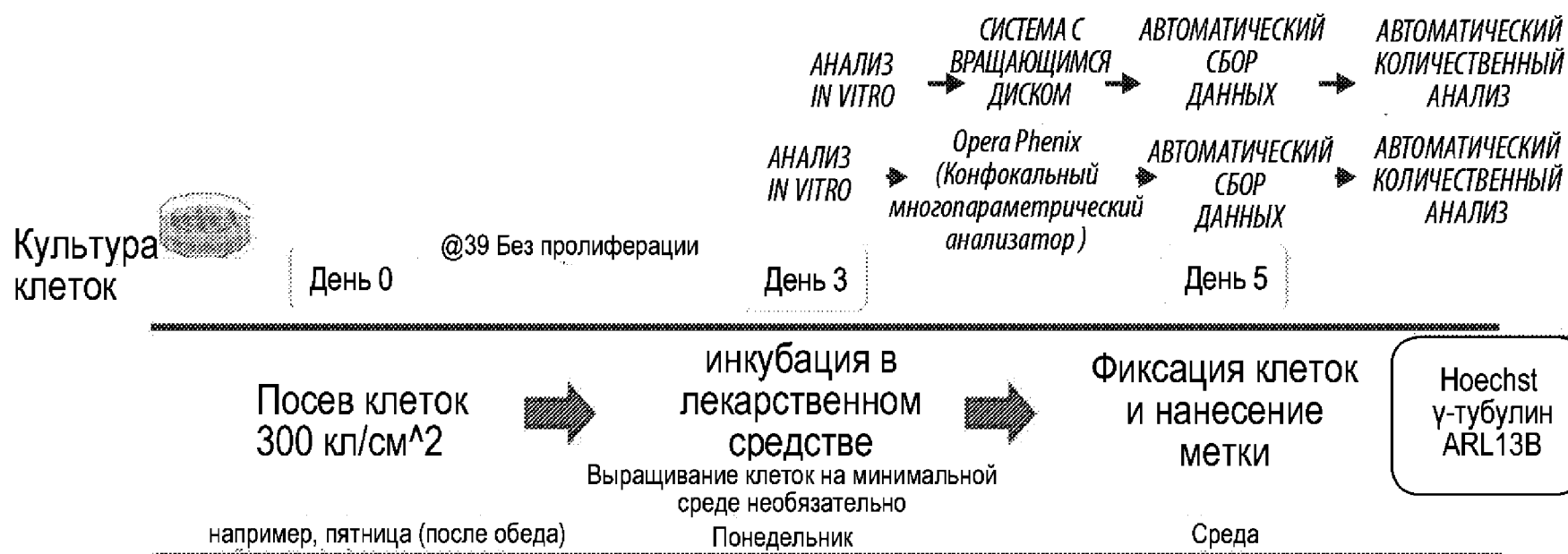
2/71



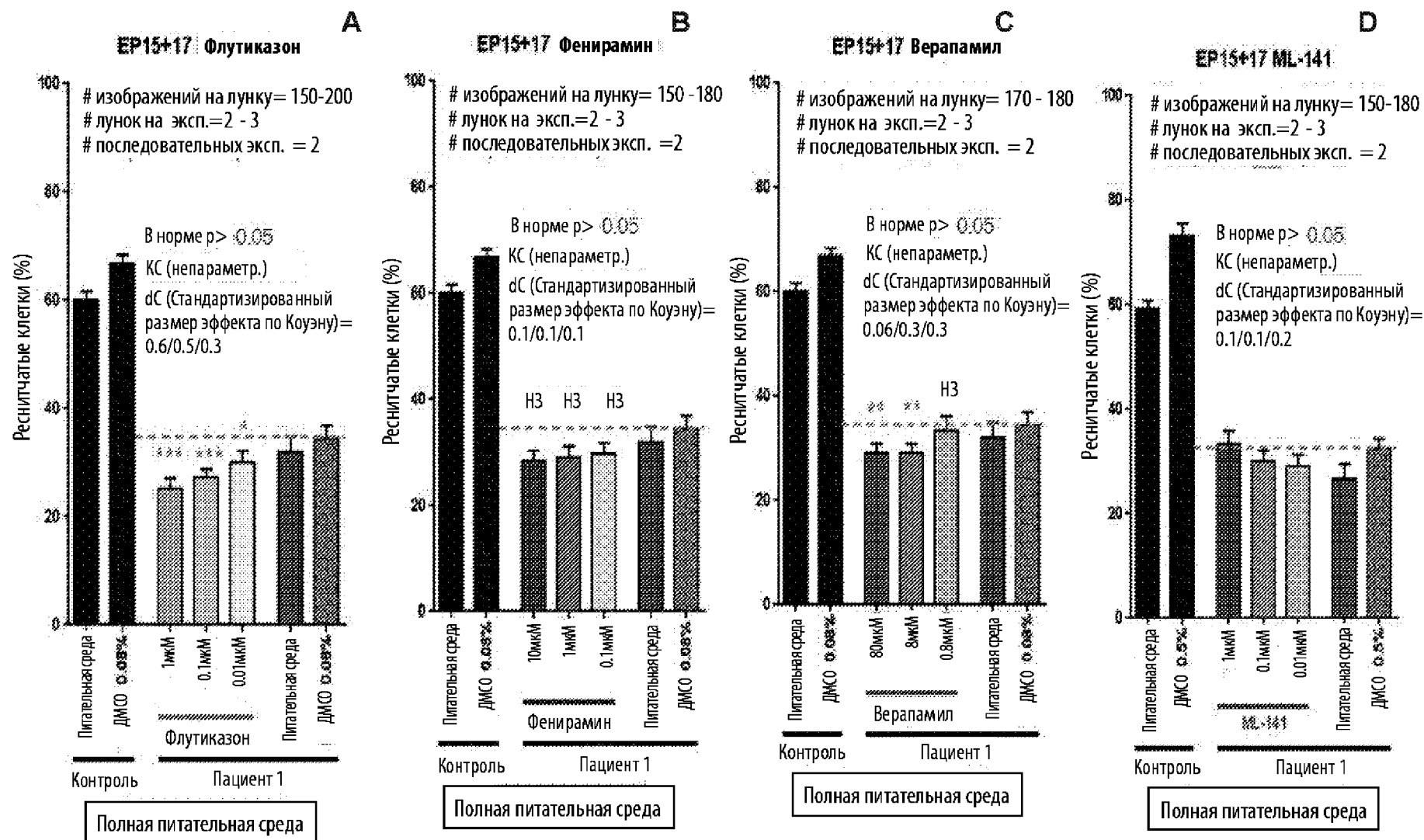
Фиг. 2



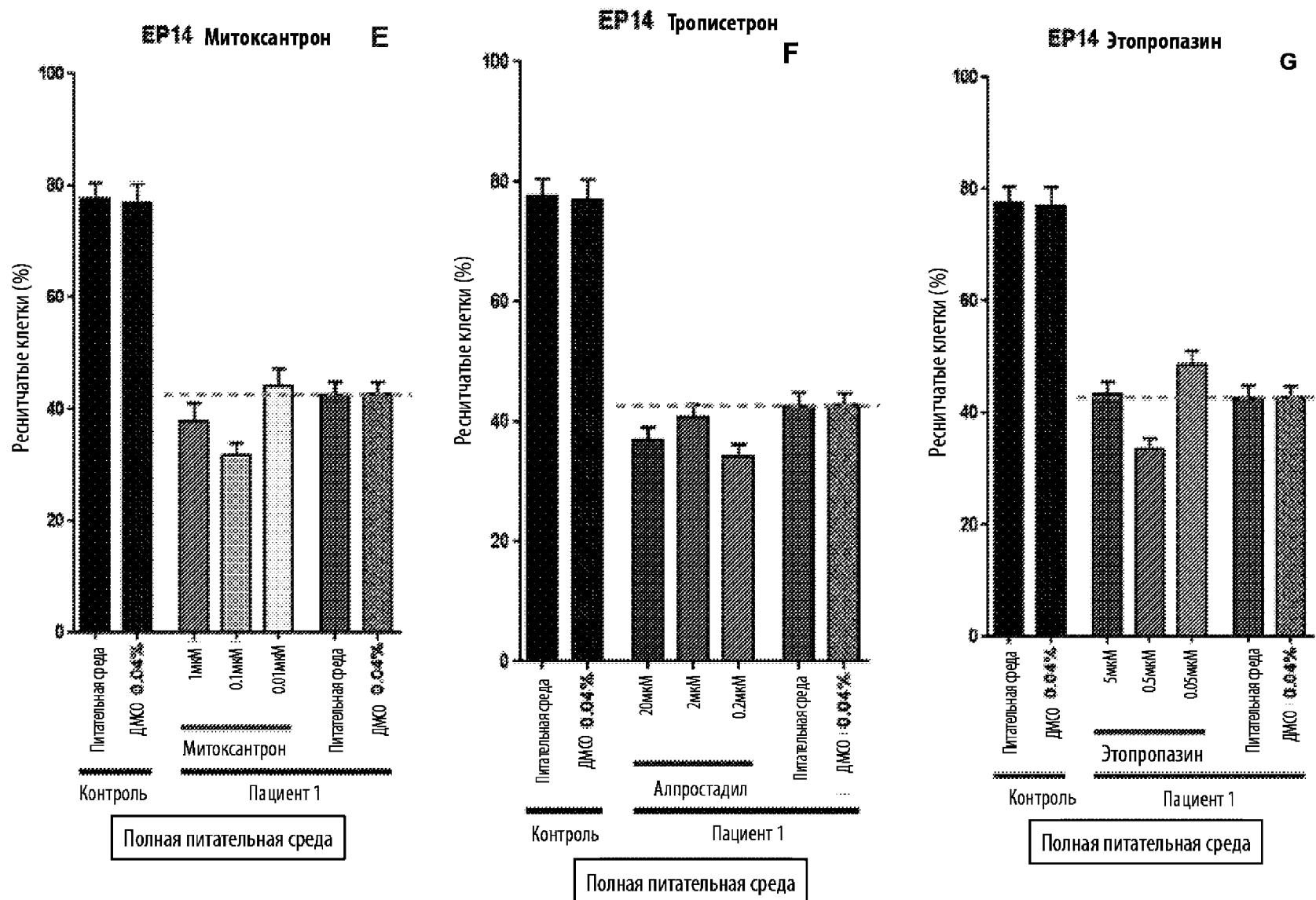
Фиг. 3



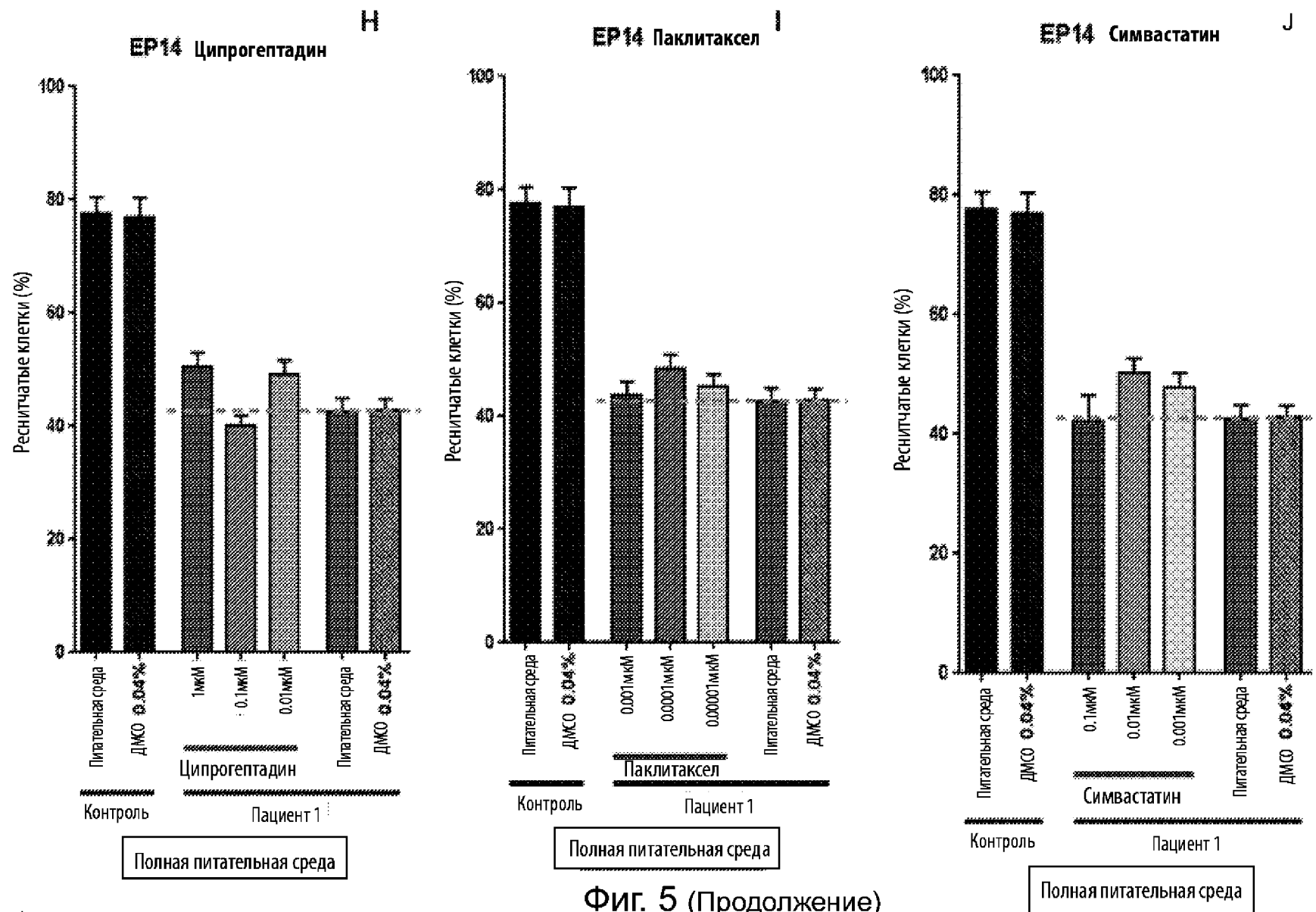
Фиг. 4



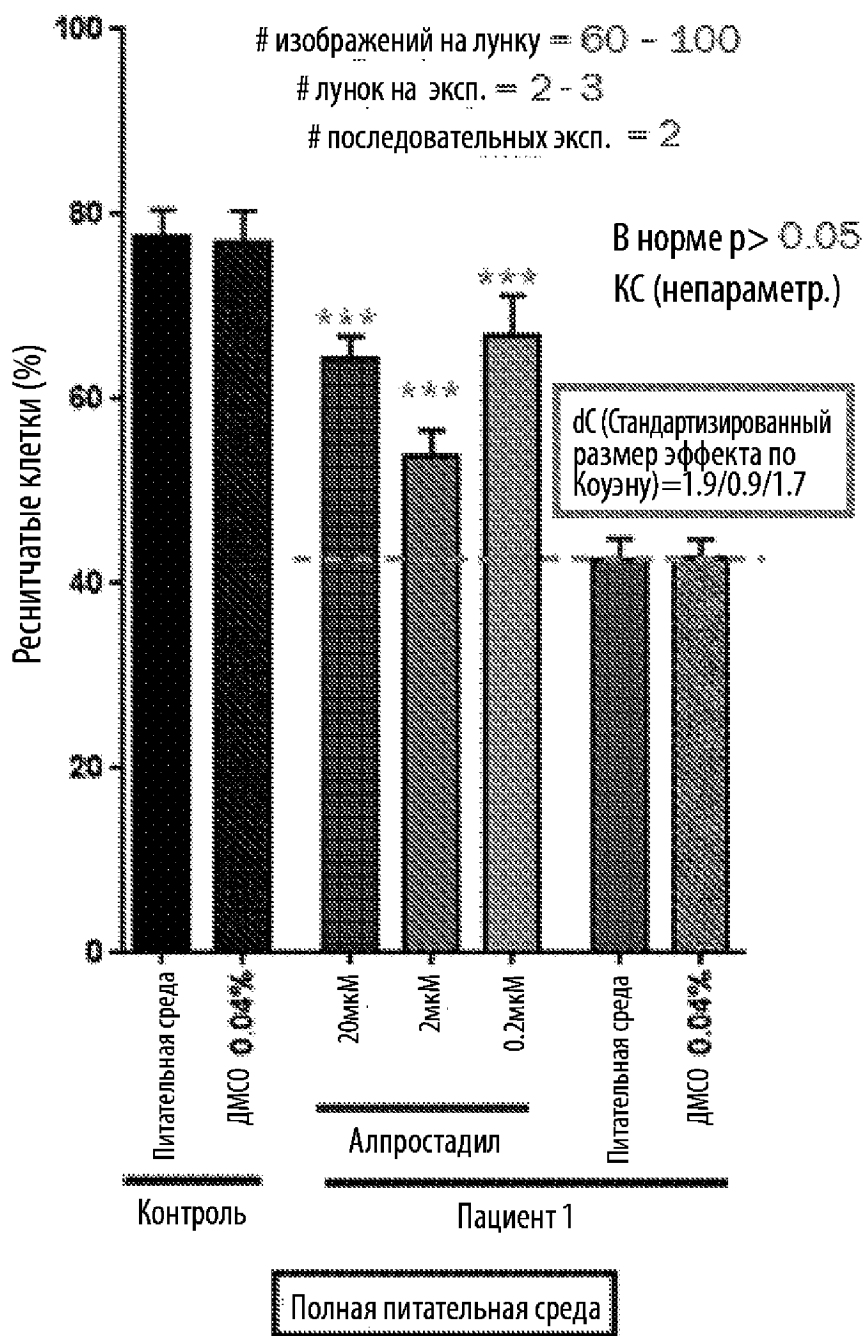
Фиг. 5



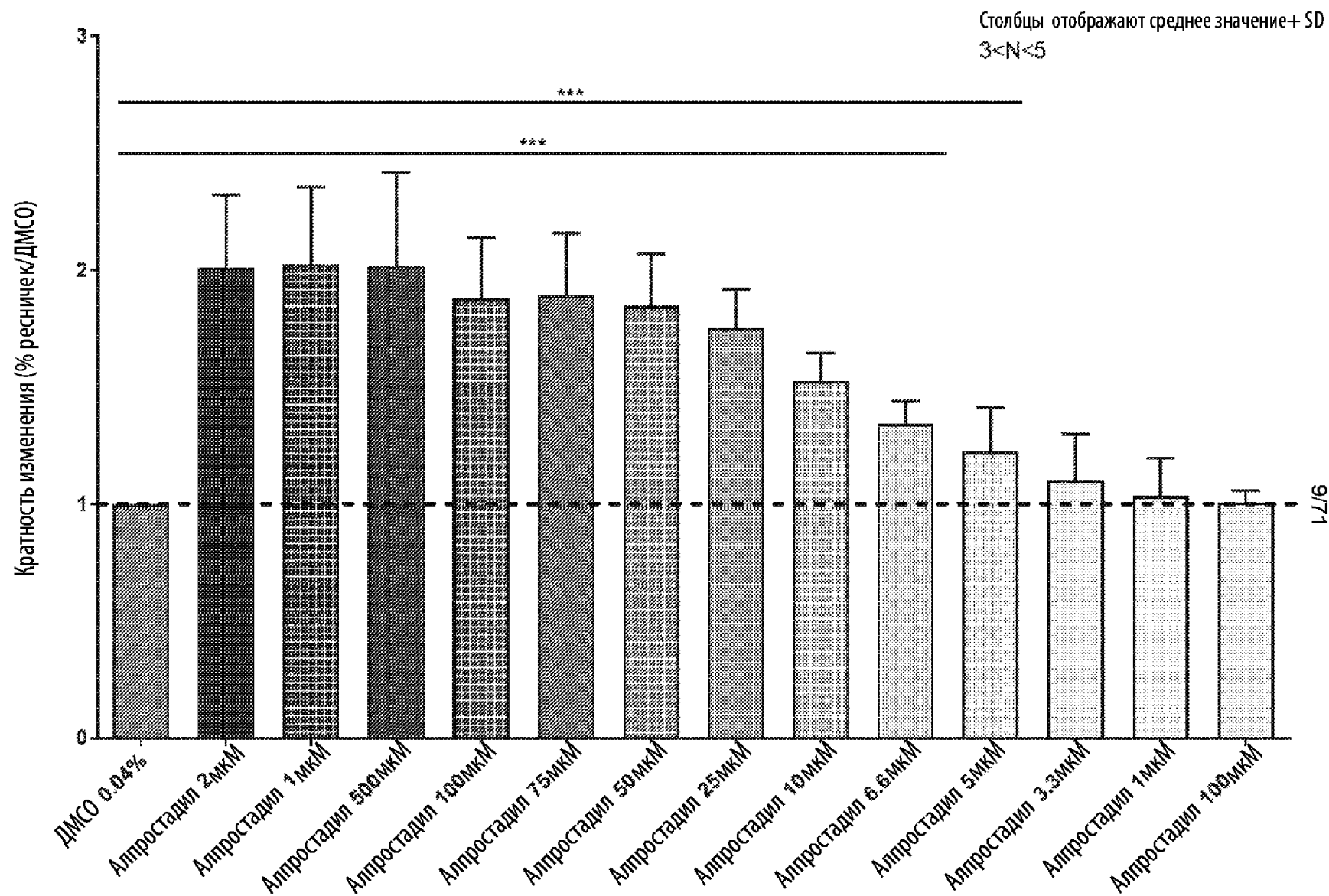
Фиг. 5 (Продолжение)



Фиг. 5 (Продолжение)

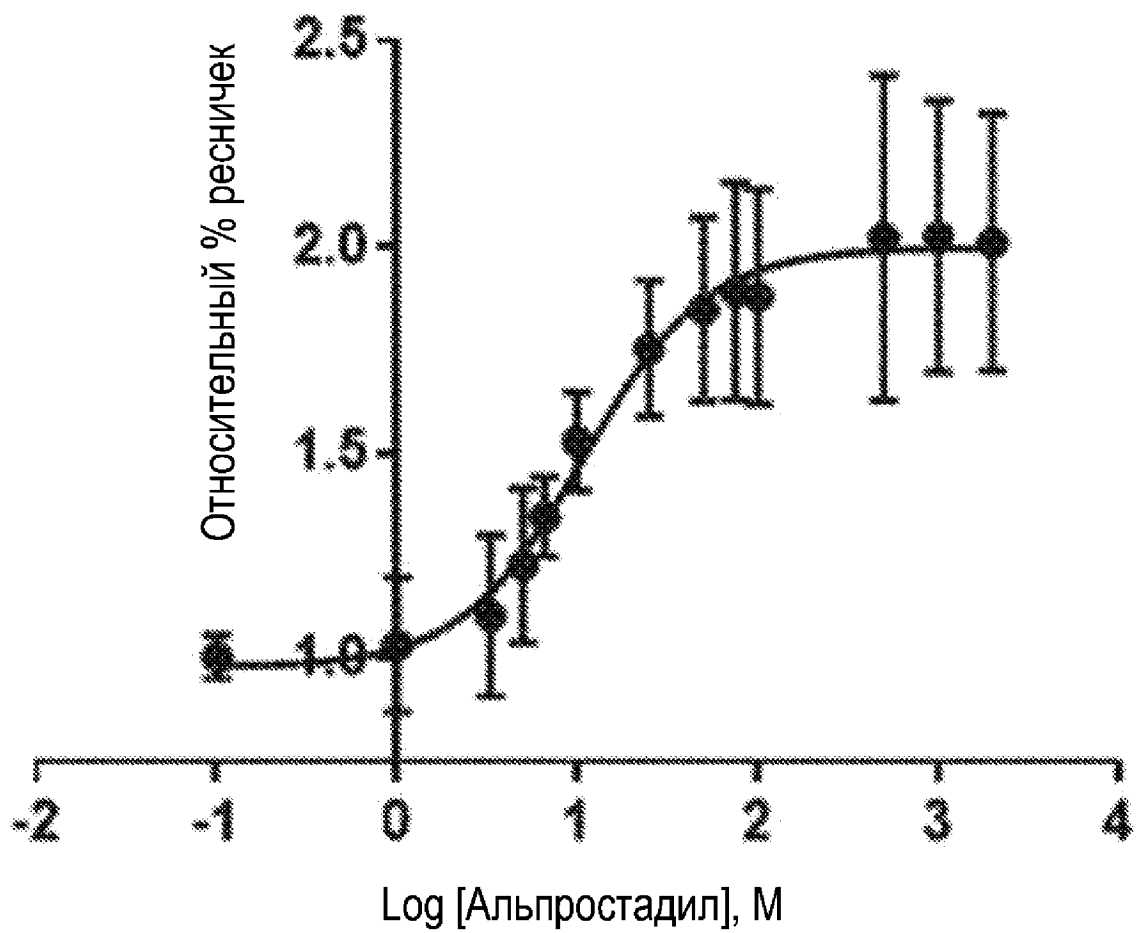
E14 Аллпростадил

Фиг. 6



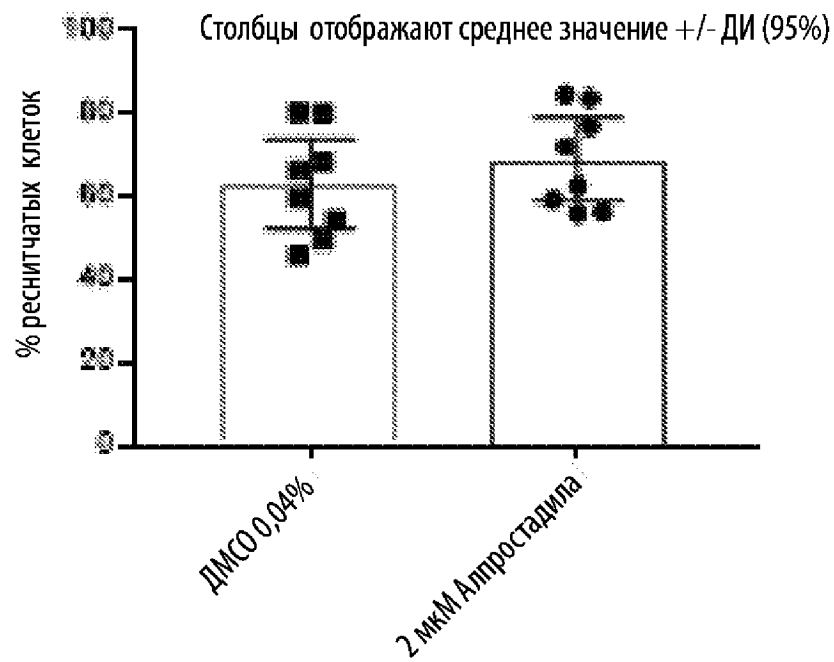
Фиг. 7А

* критерий Манна-Уитни



Фиг. 7В

11/71

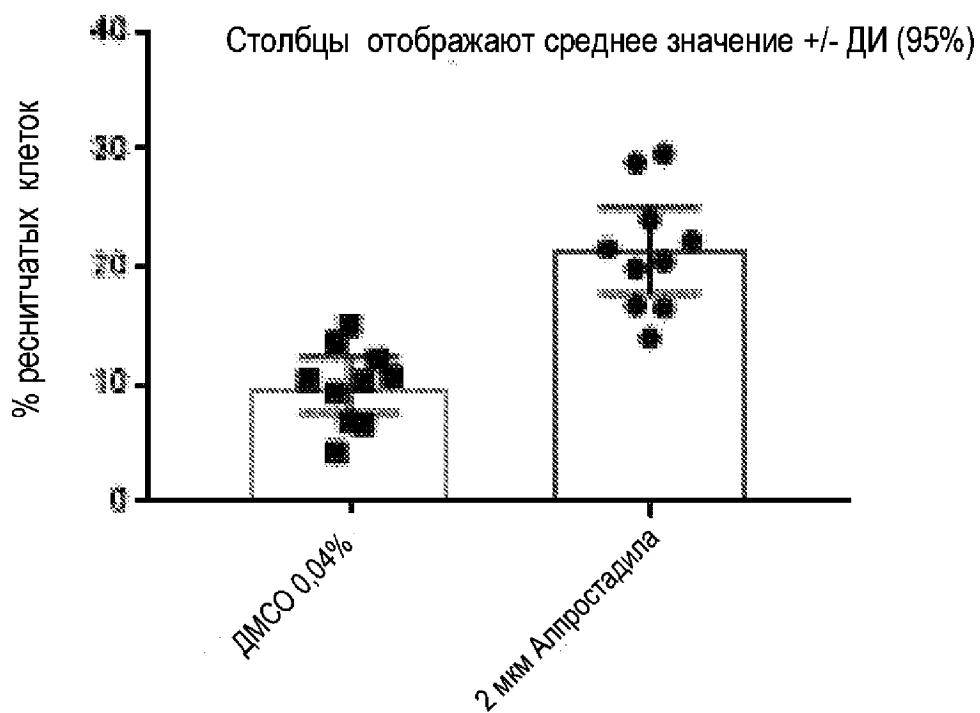
КОНТР.

Критерий Манна-Уитни	
Р-значение	0.3823
Точное или приблизительное р-значение?	Точное
Общее Р-значение	нз

Фиг. 8А

12/71

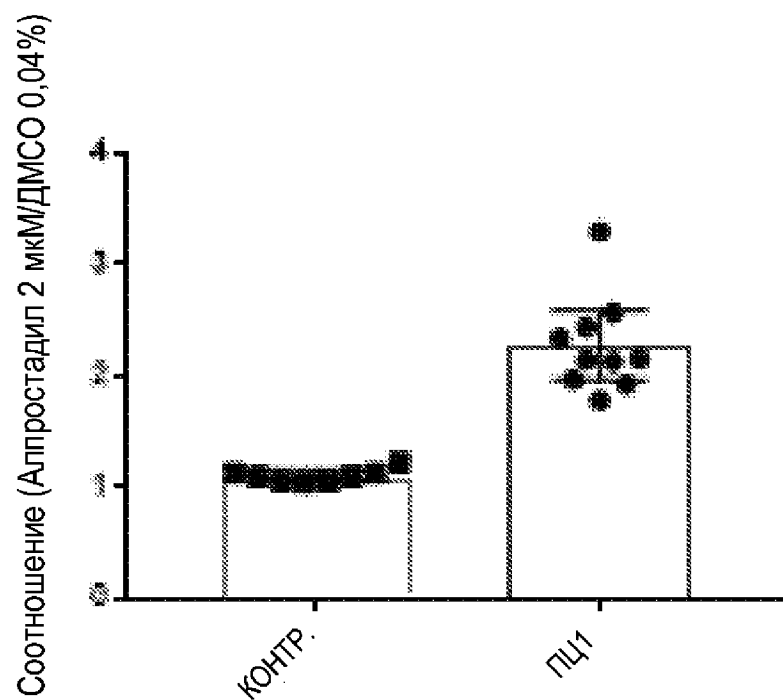
ПЦ1



Критерий Манна-Уитни	
Р-значение	<0.0001
Точное или приблизительное р-значение?	Точное
Общее Р-значение	****

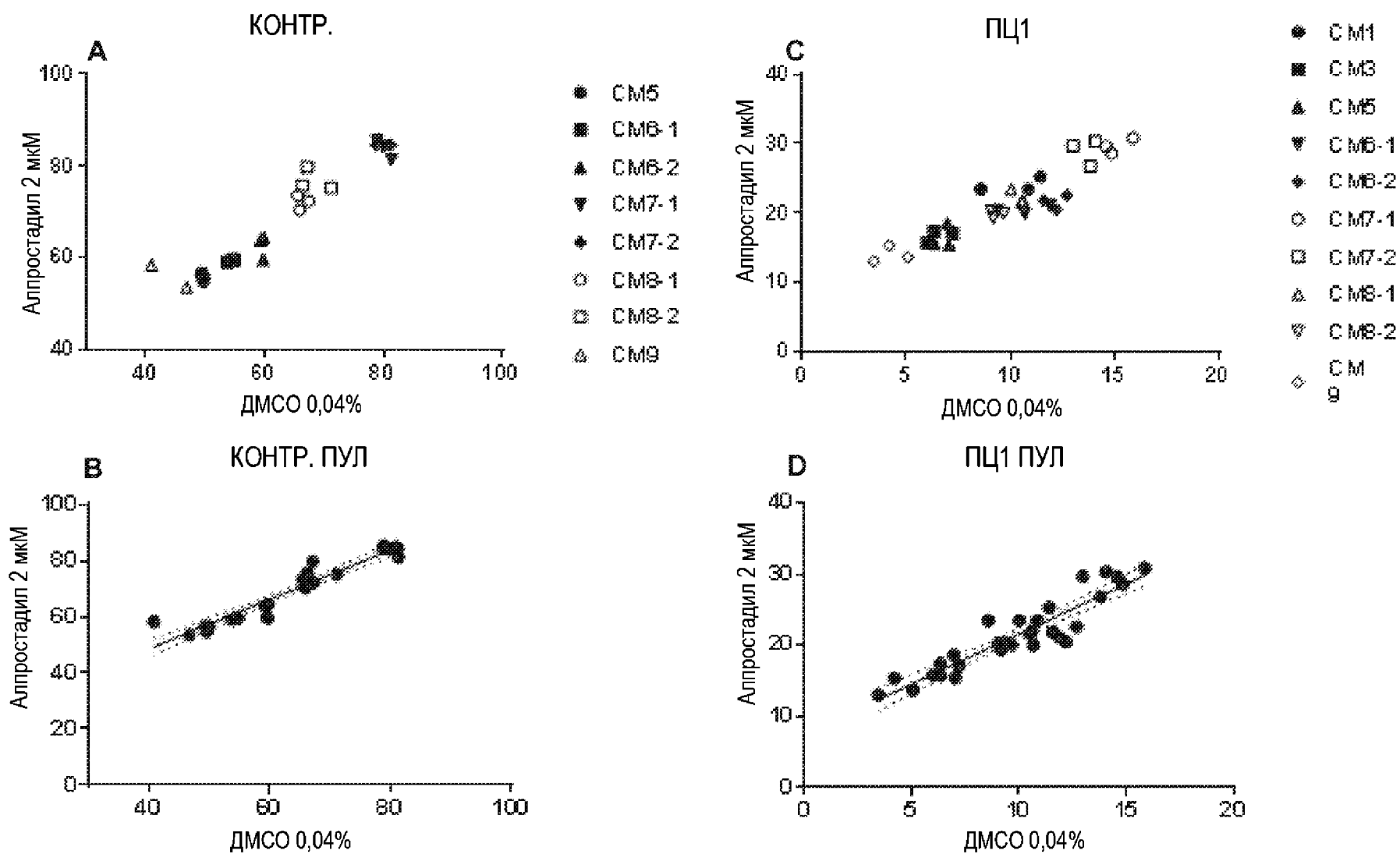
Фиг. 8В

13/71



Критерий Манна-Уитни	
P-значение	<0.0001
Точное или приблизительное p-значение?	Точное
Общее P-значение	****

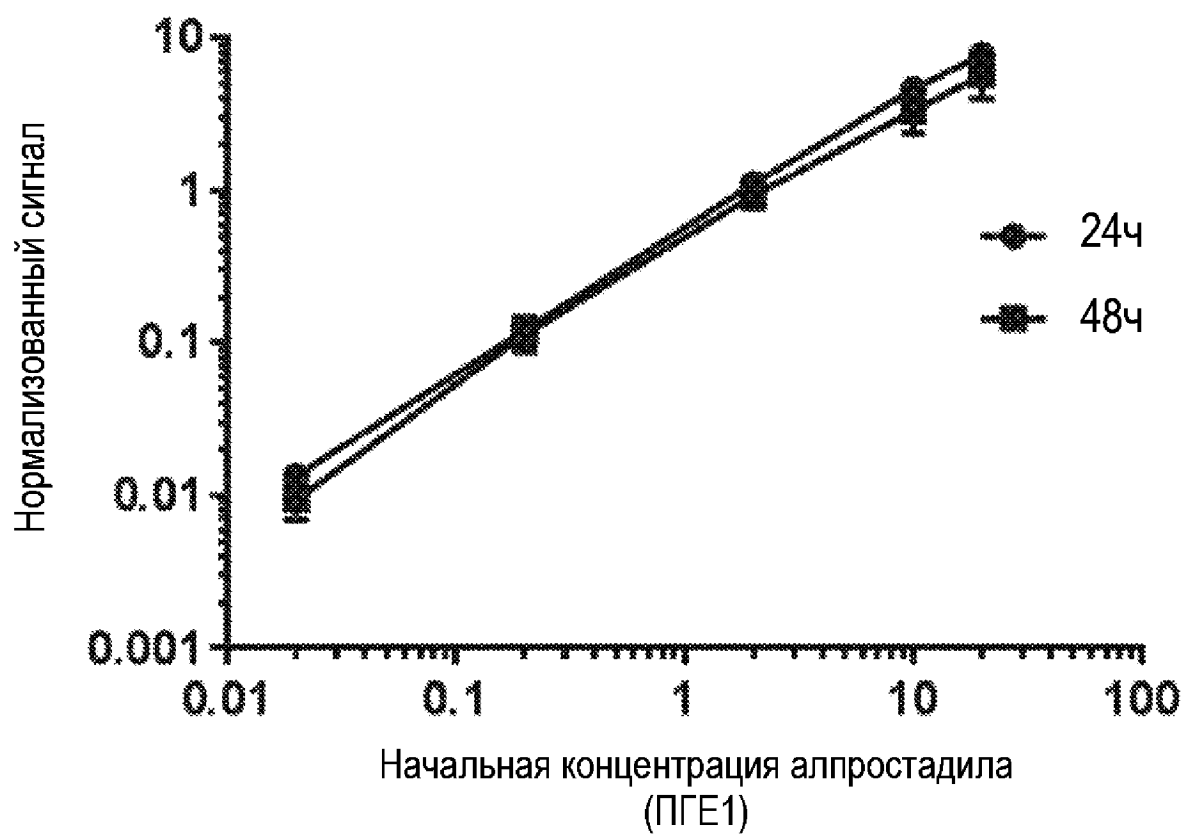
Фиг. 8С



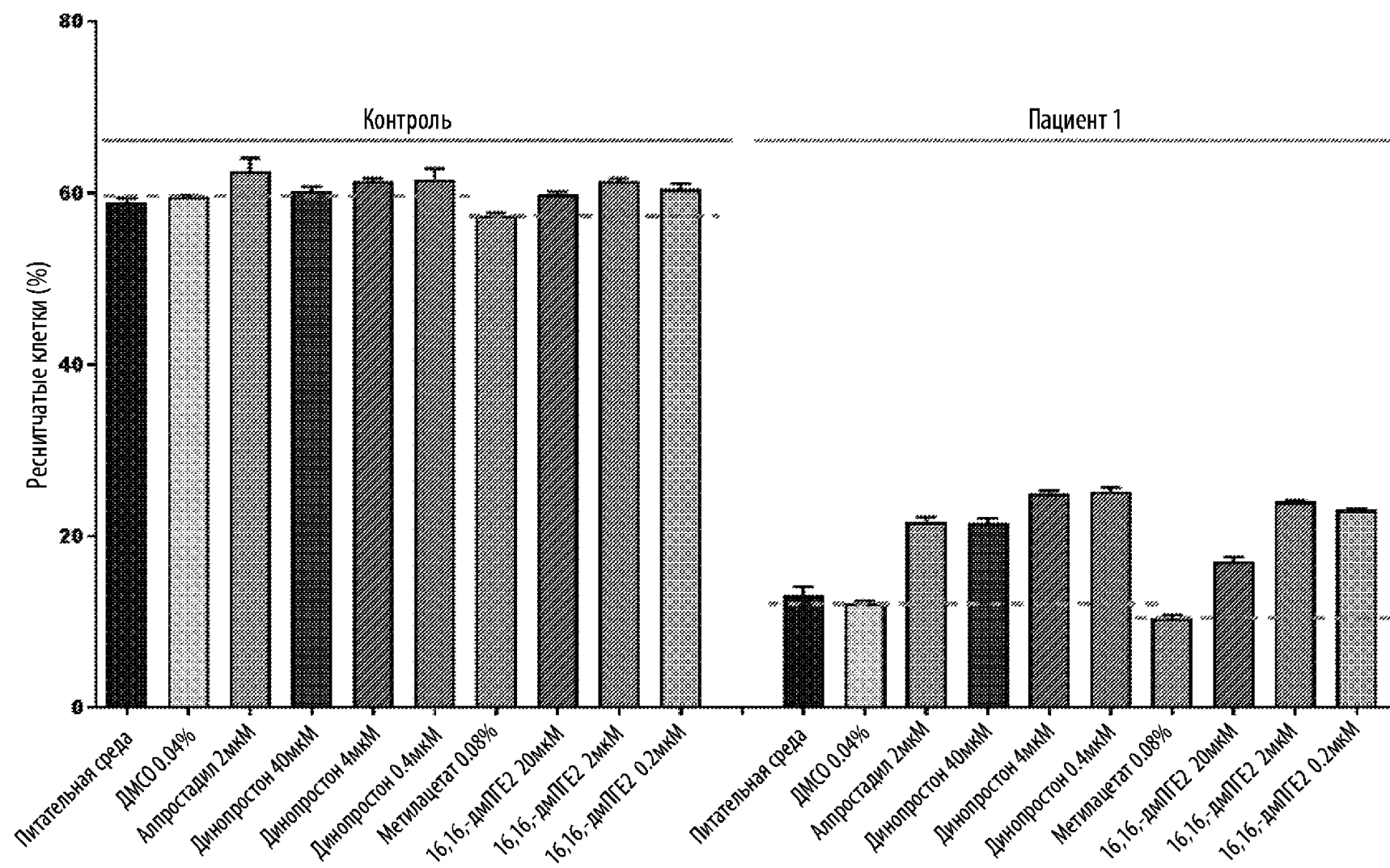
Фиг. 9

15/71

Детекция ПГЕ1

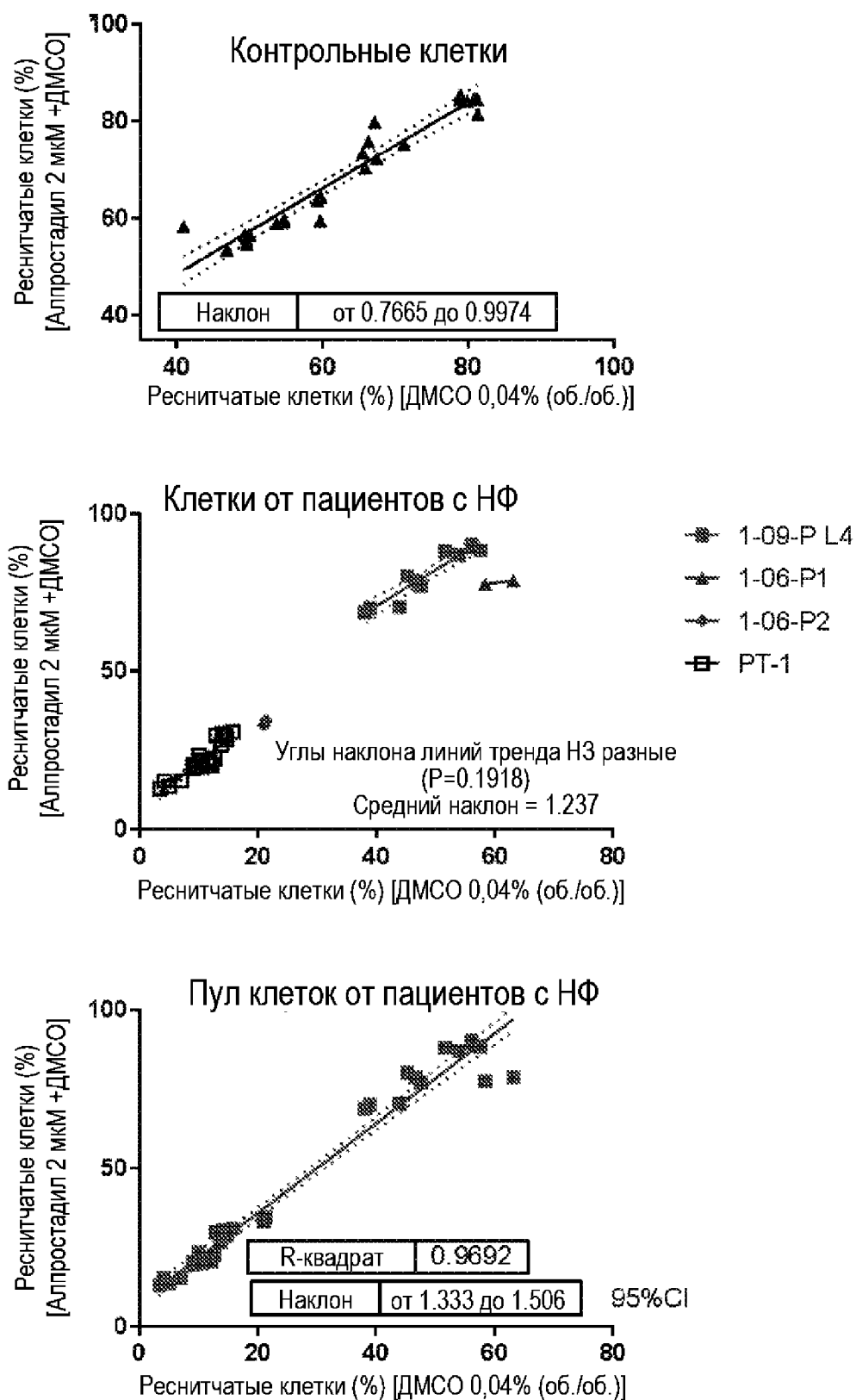


Фиг. 10

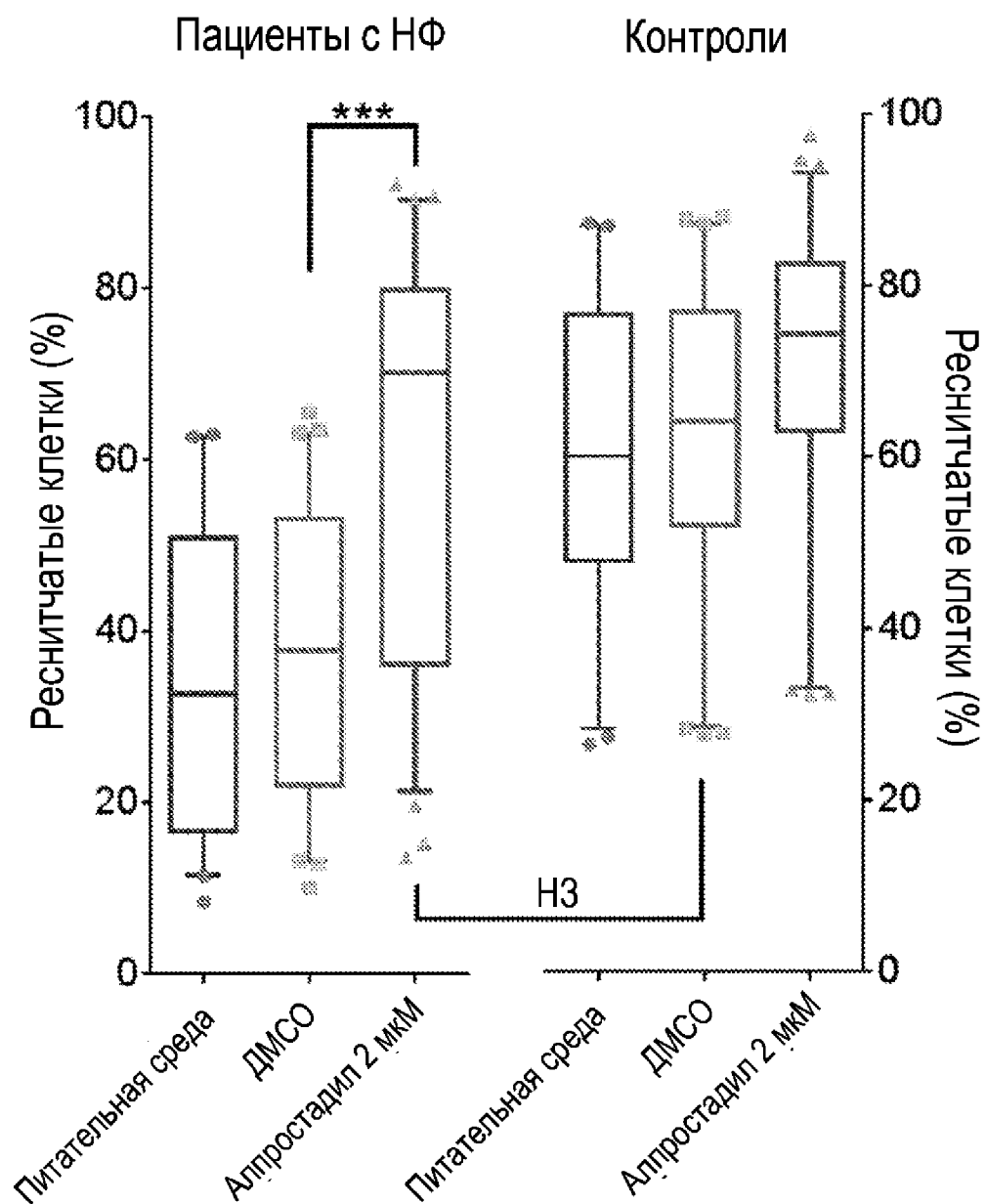


Фиг. 11А

17/71

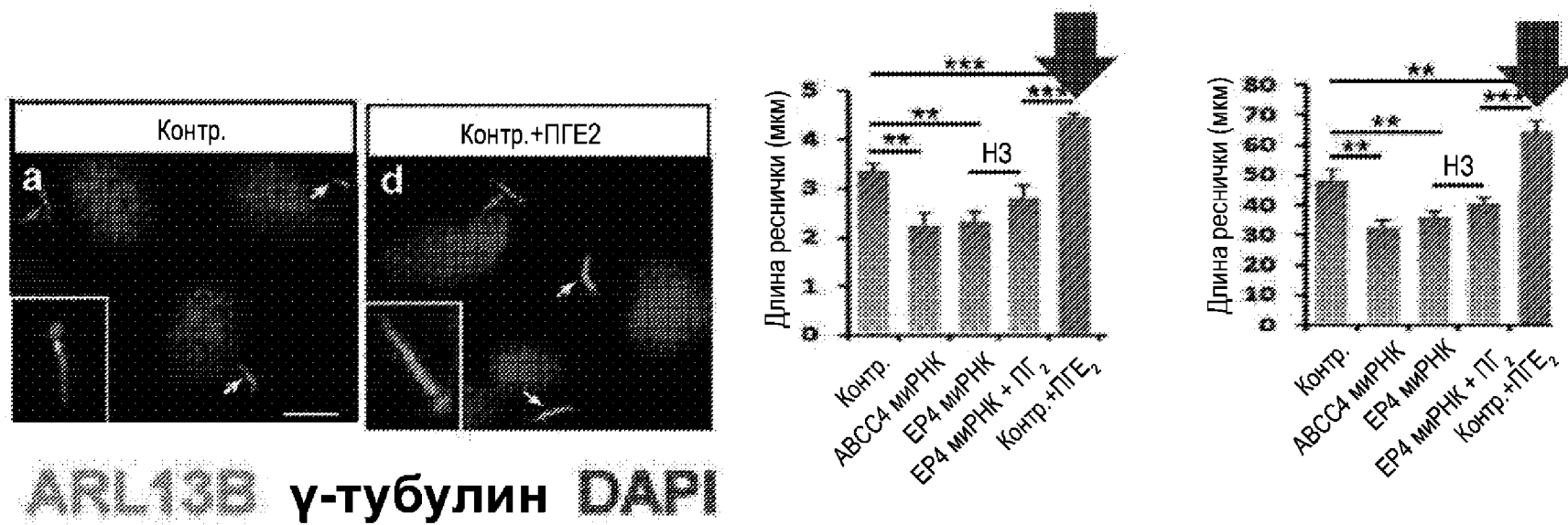


Фиг. 11В

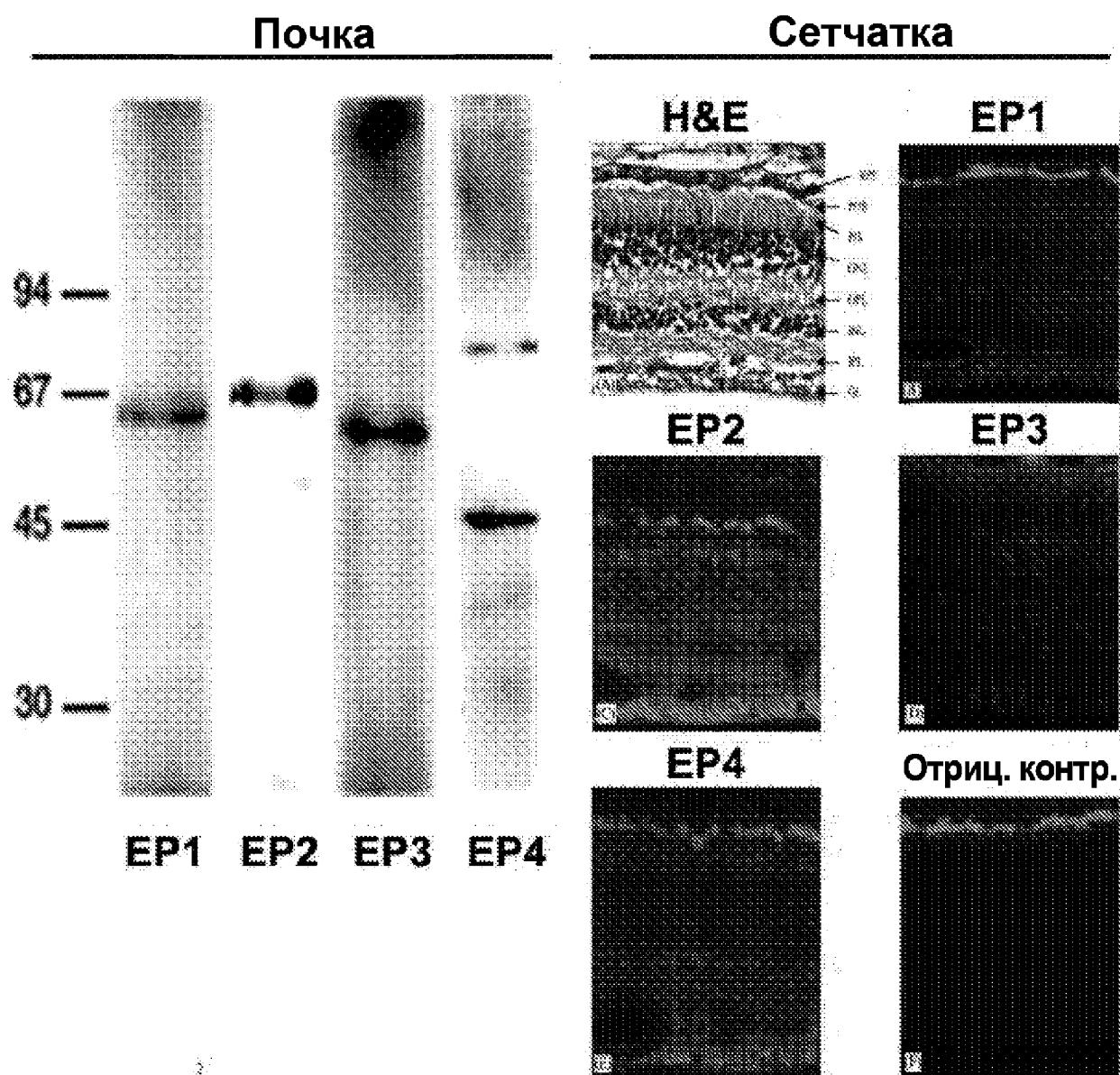


Фиг. 11С

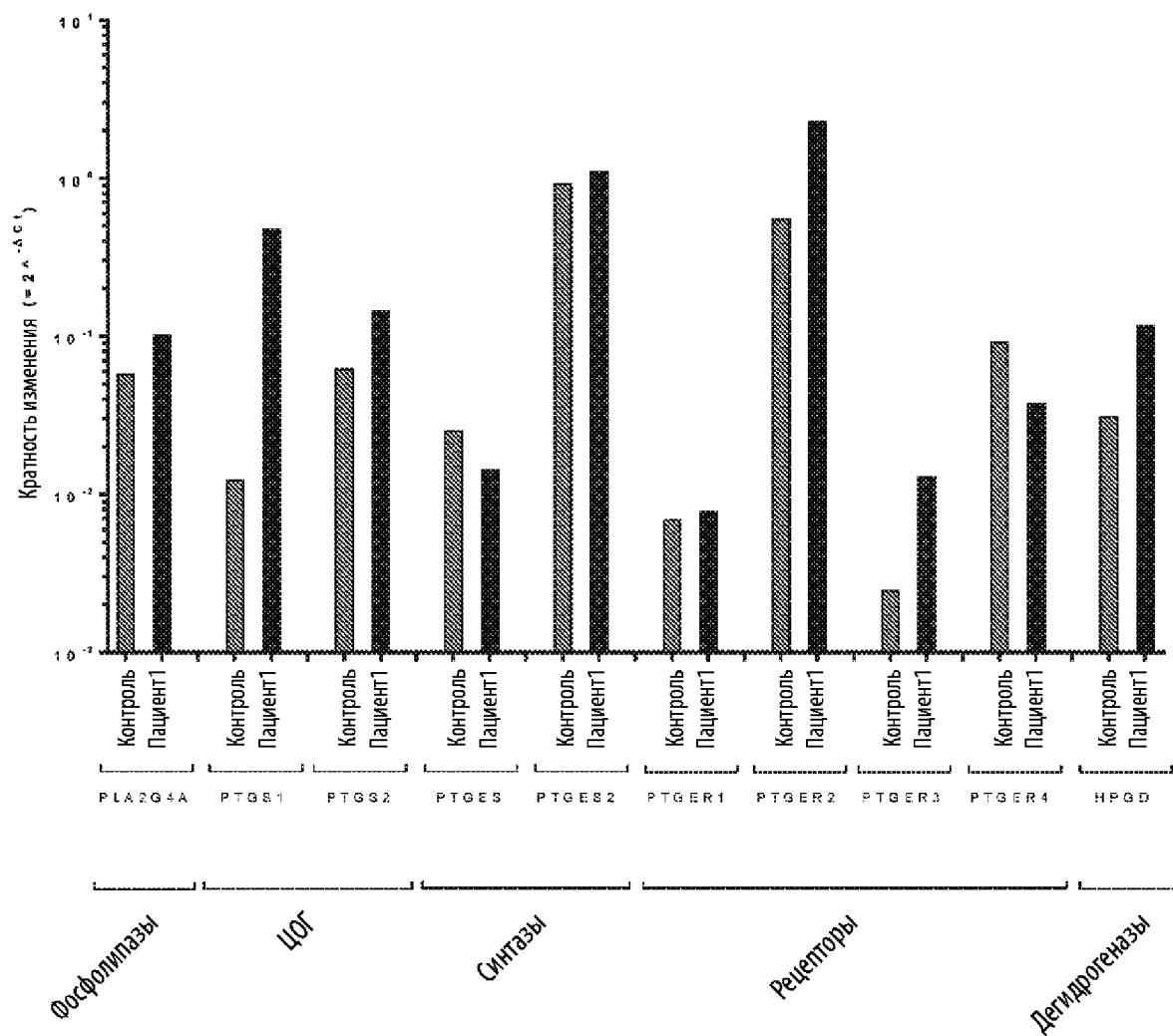
19/71



Фиг. 12



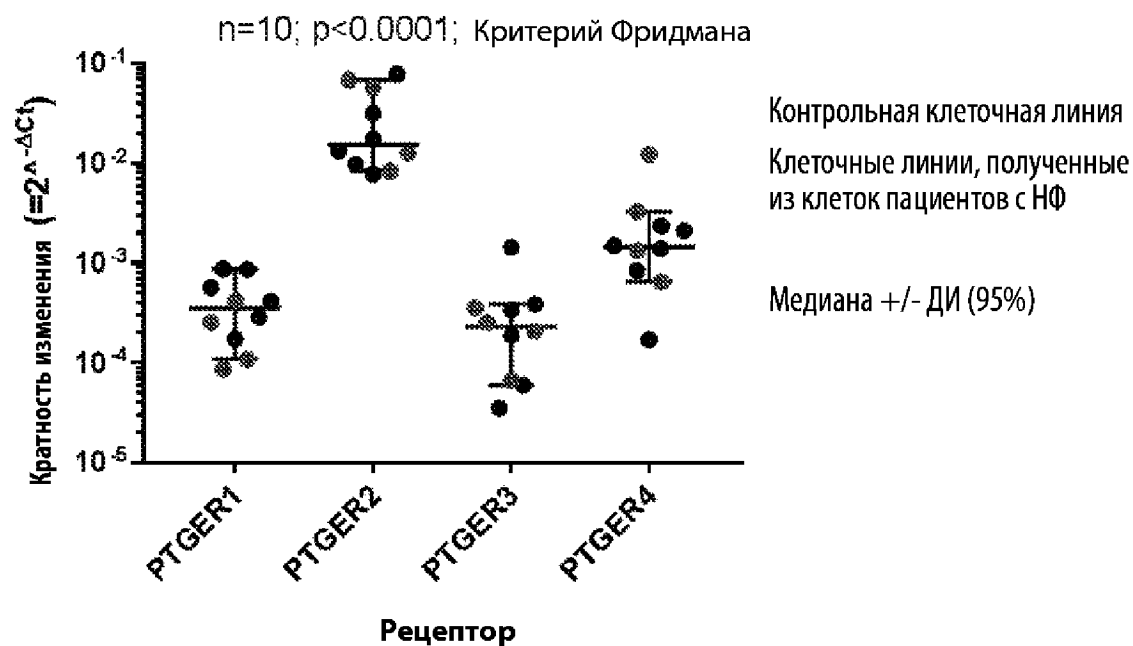
Фиг. 13



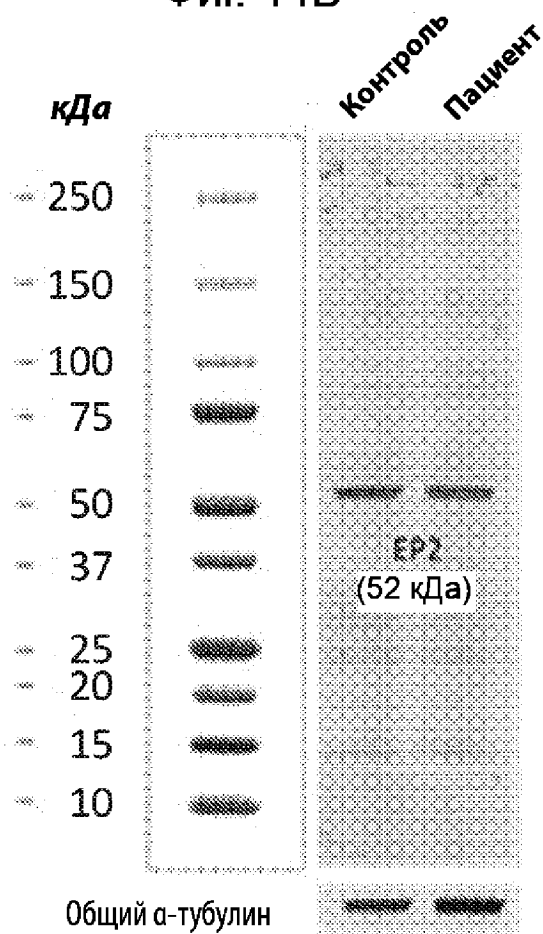
ΔCt = интересующий ген - C_t внутренний контроль (HPRT1)

Фиг. 14А

22/71



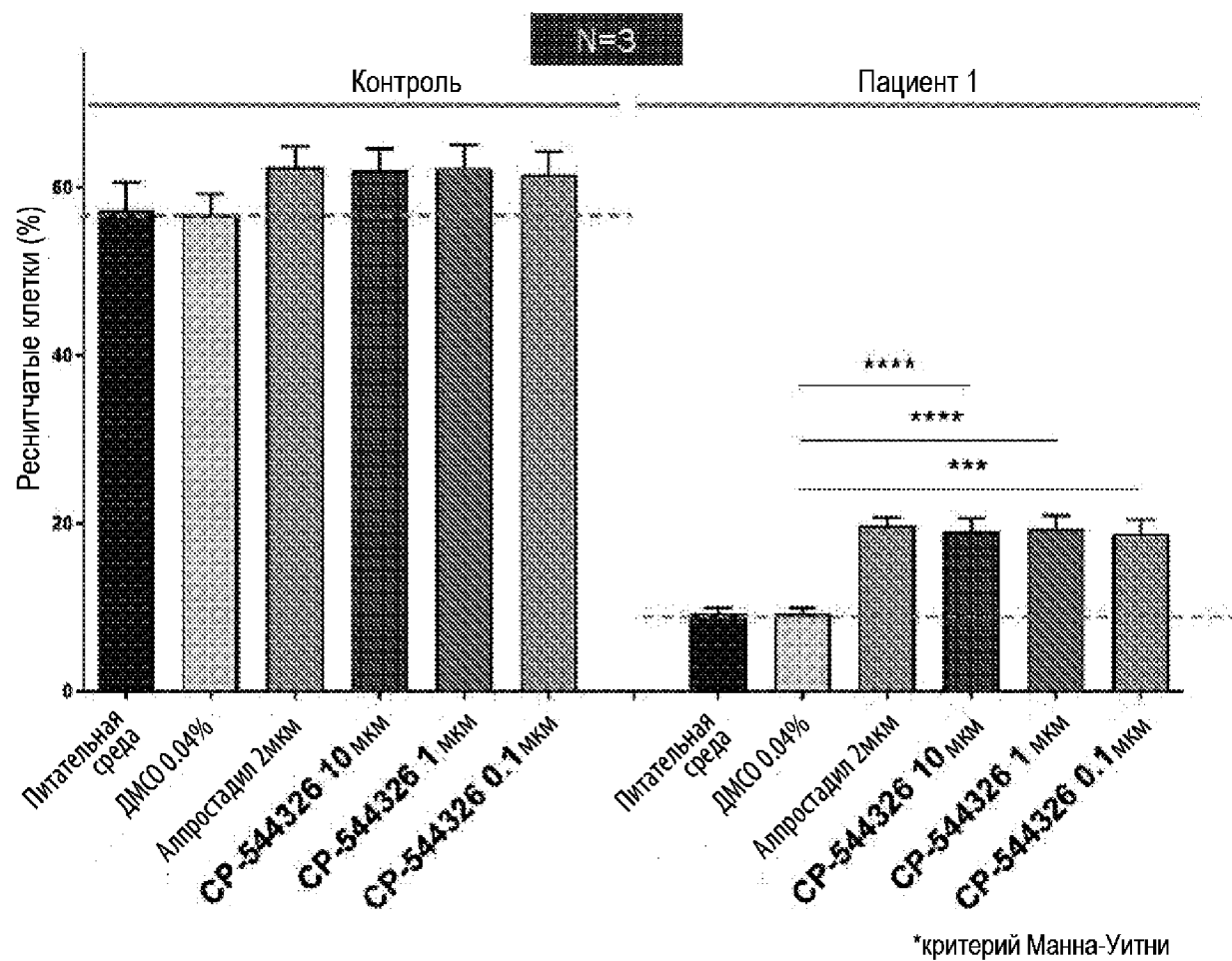
Фиг. 14В



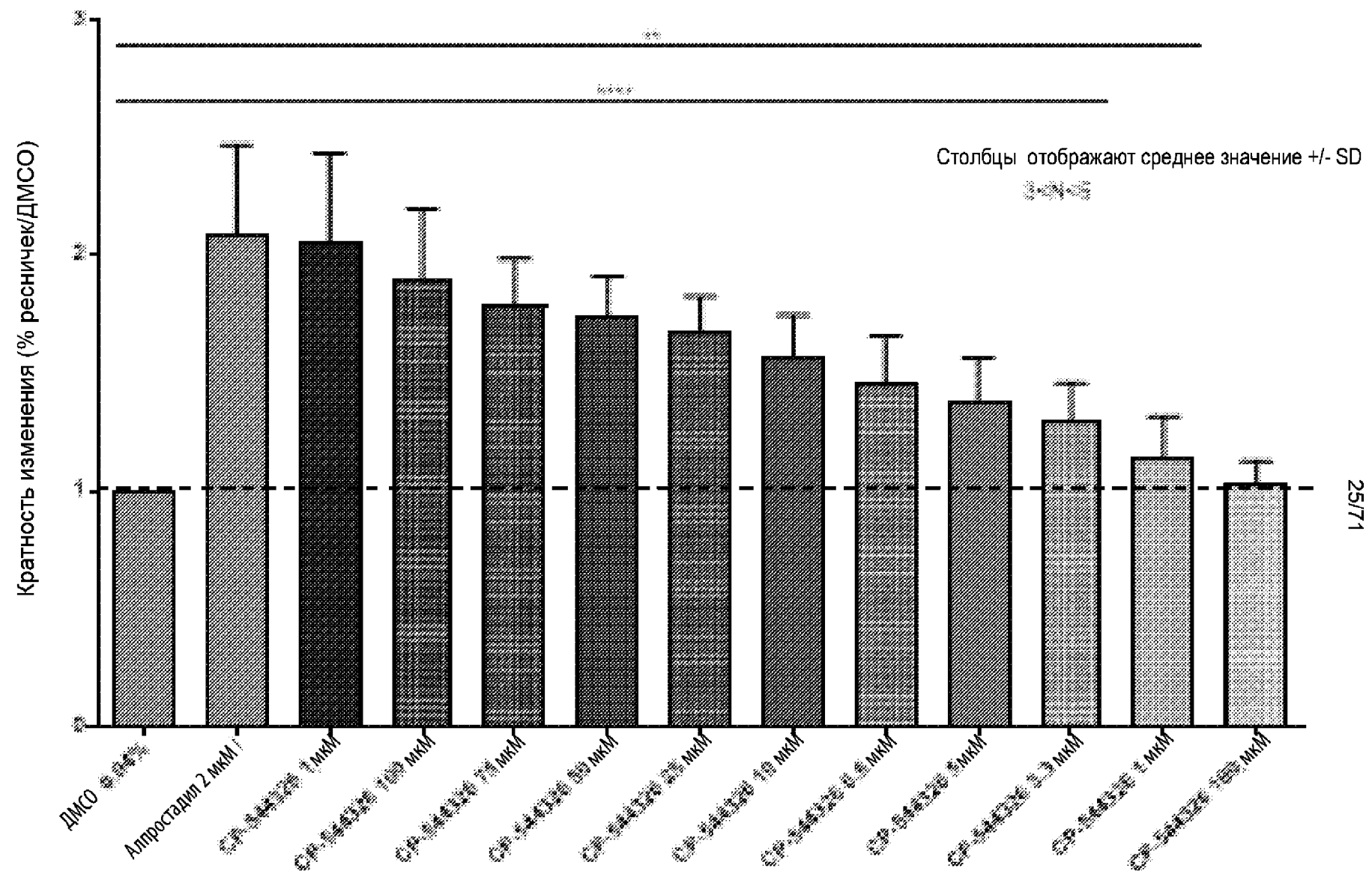
Фиг. 14С

	Агонисты	Антагонисты
ЦОГ1	-	SC-560
ЦОГ2	-	Целекоксиб
ЦОГ1&2	-	Кеторолак
EP1	Илопрост	GW 848687X
EP2	CP-544326	PF-04418948
EP3	Сульпростон	L-798,106
EP4	L-902,688	BGC 20-1531
EP1-4	Динопростон	-
	16,16-диметил-ПГЕ2	

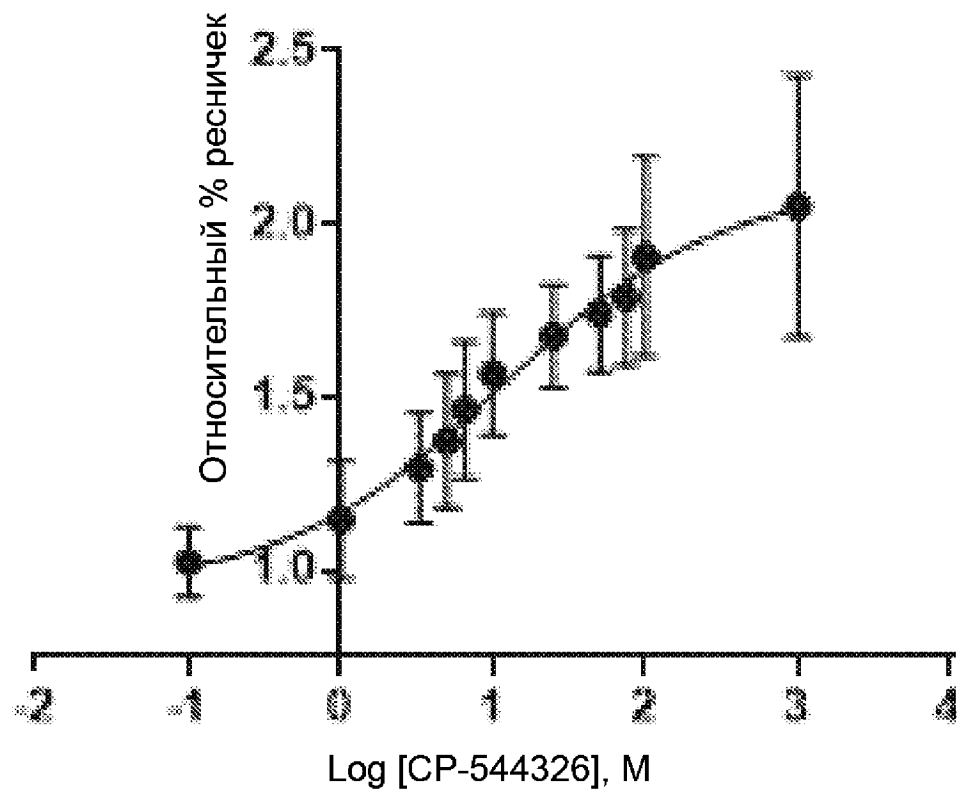
Фиг. 15



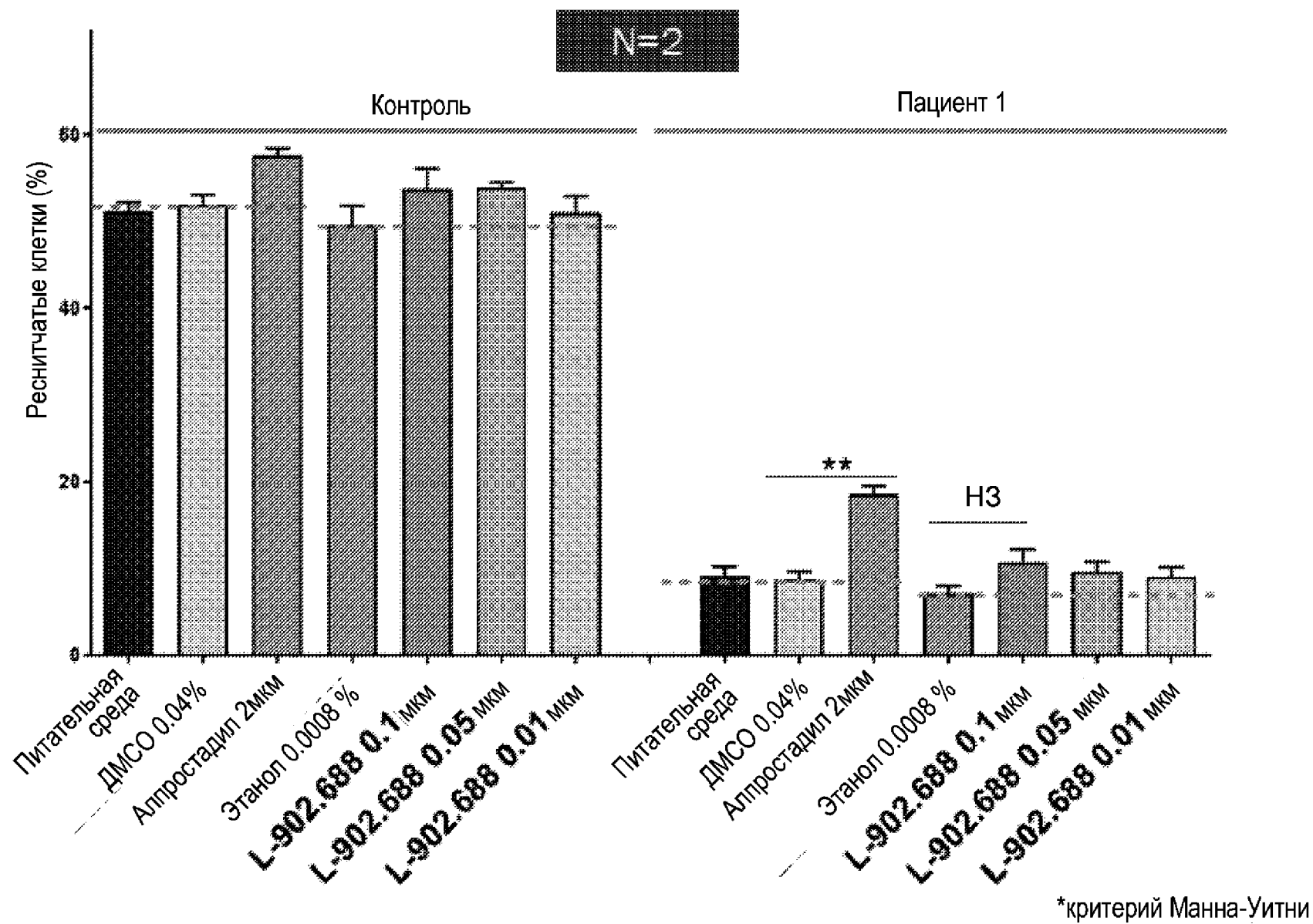
Фиг. 16А



Фиг. 16В



Фиг. 16С

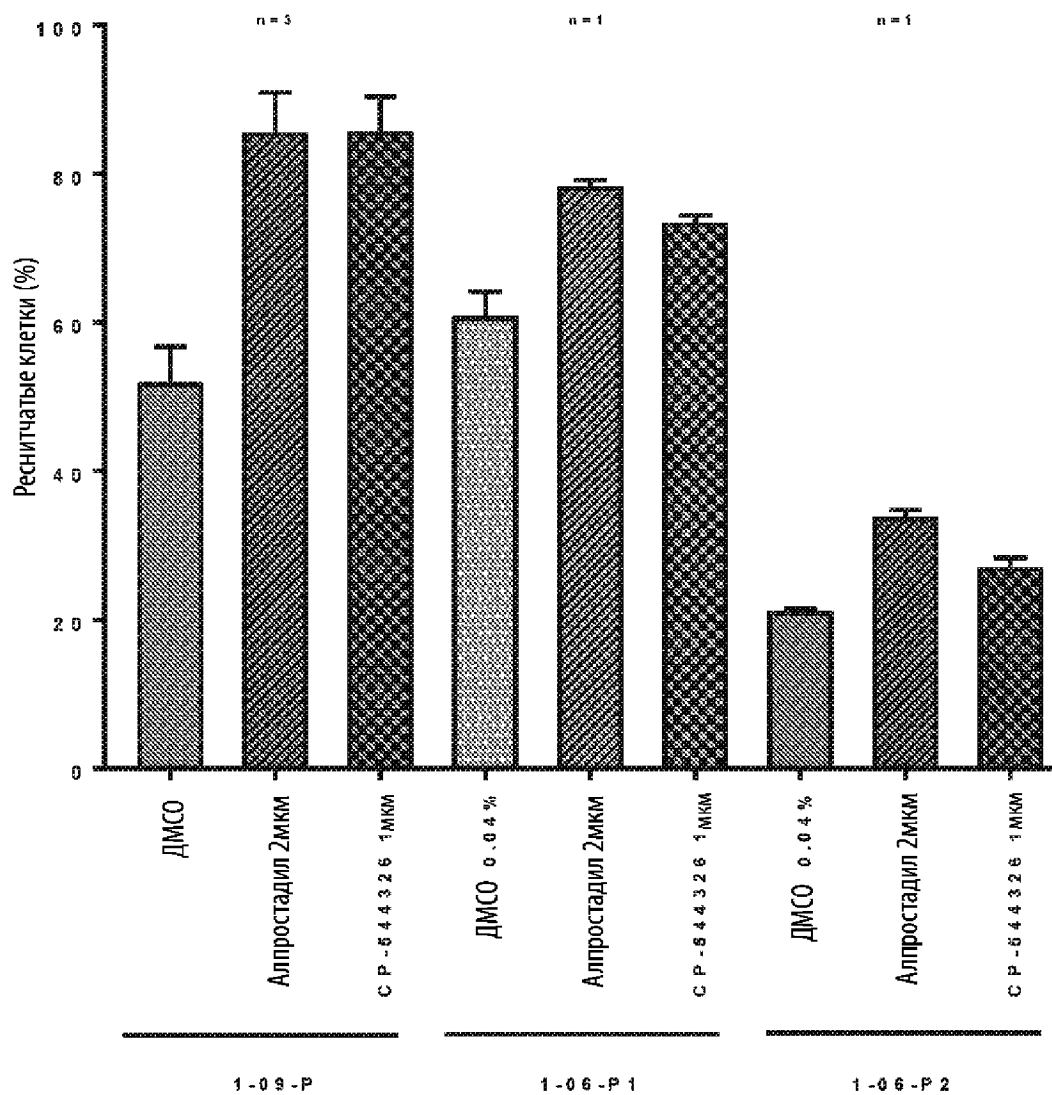


Фиг. 17А

28/71

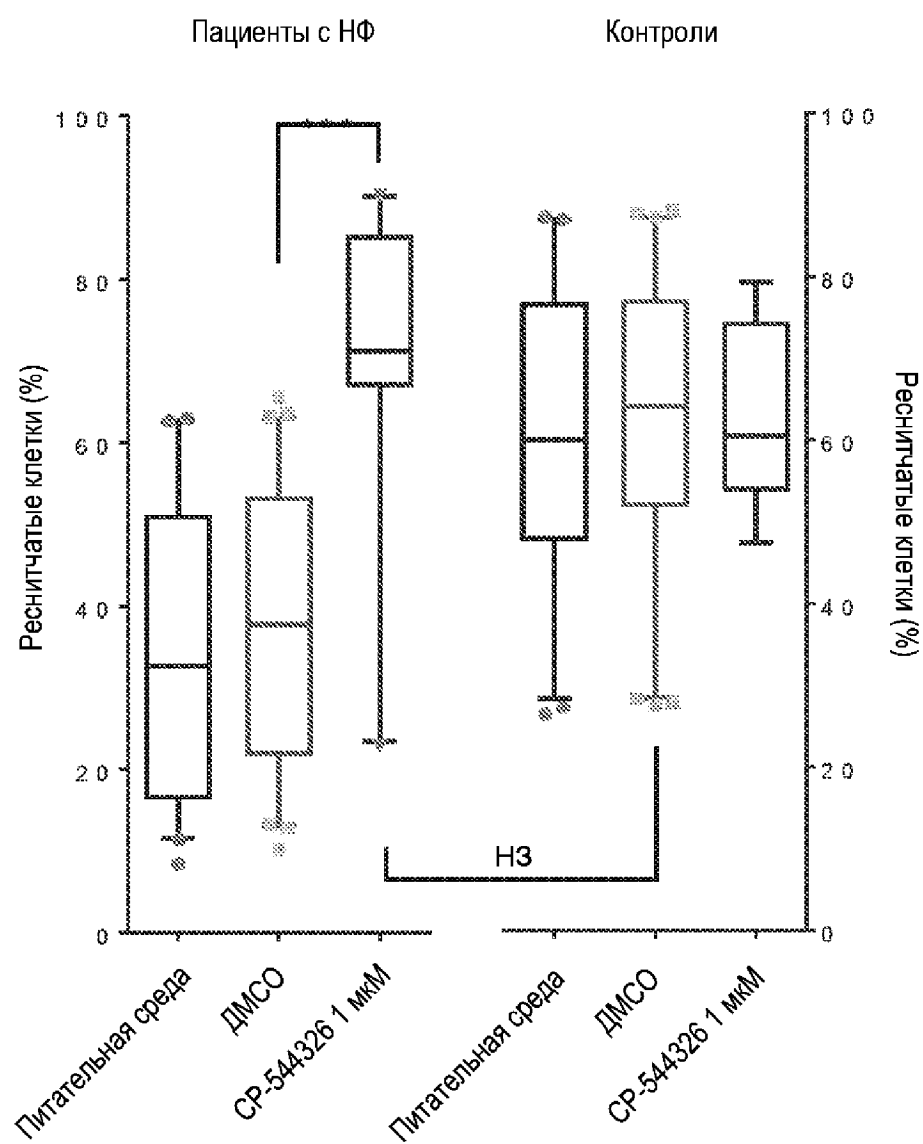
Пациенты NPH1

Столбцы отображают среднее значение $\pm$ SD

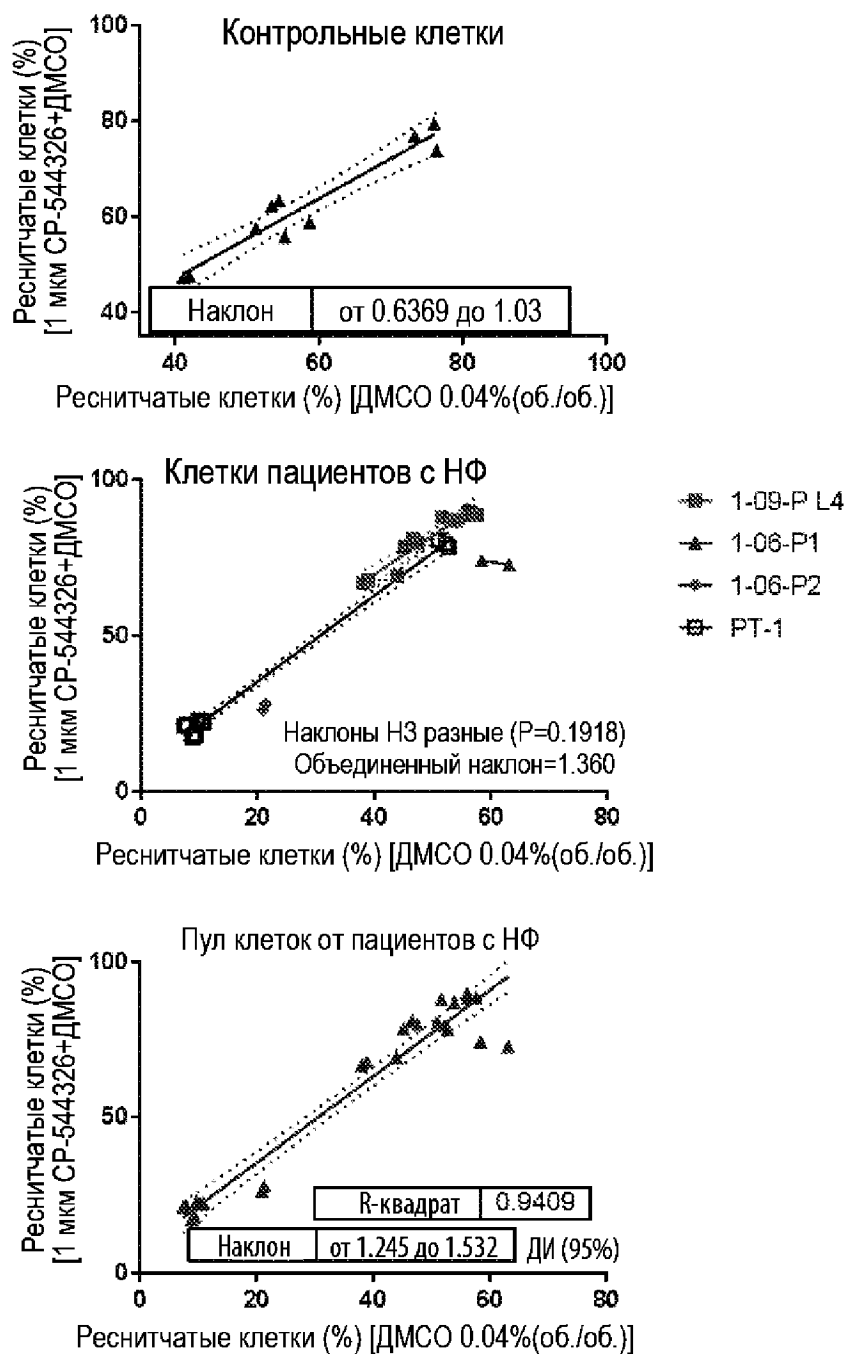


Фиг. 17В

29/71



Фиг. 17С



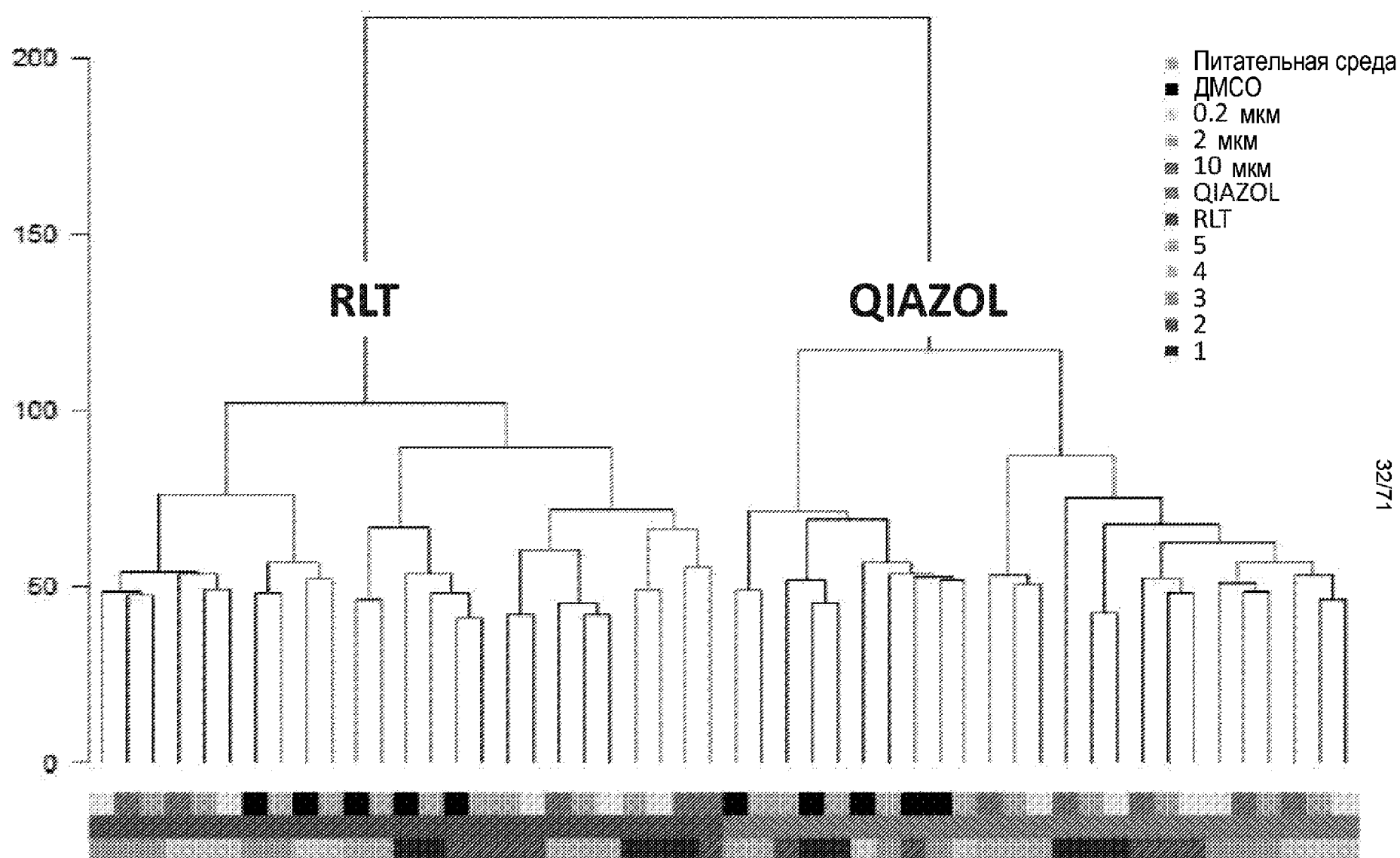
Фиг. 17D

СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ ЗАБОЛЕВАНИЙ, СВЯЗАННЫХ С ЦИЛИОПАТИЯМИ

31/71

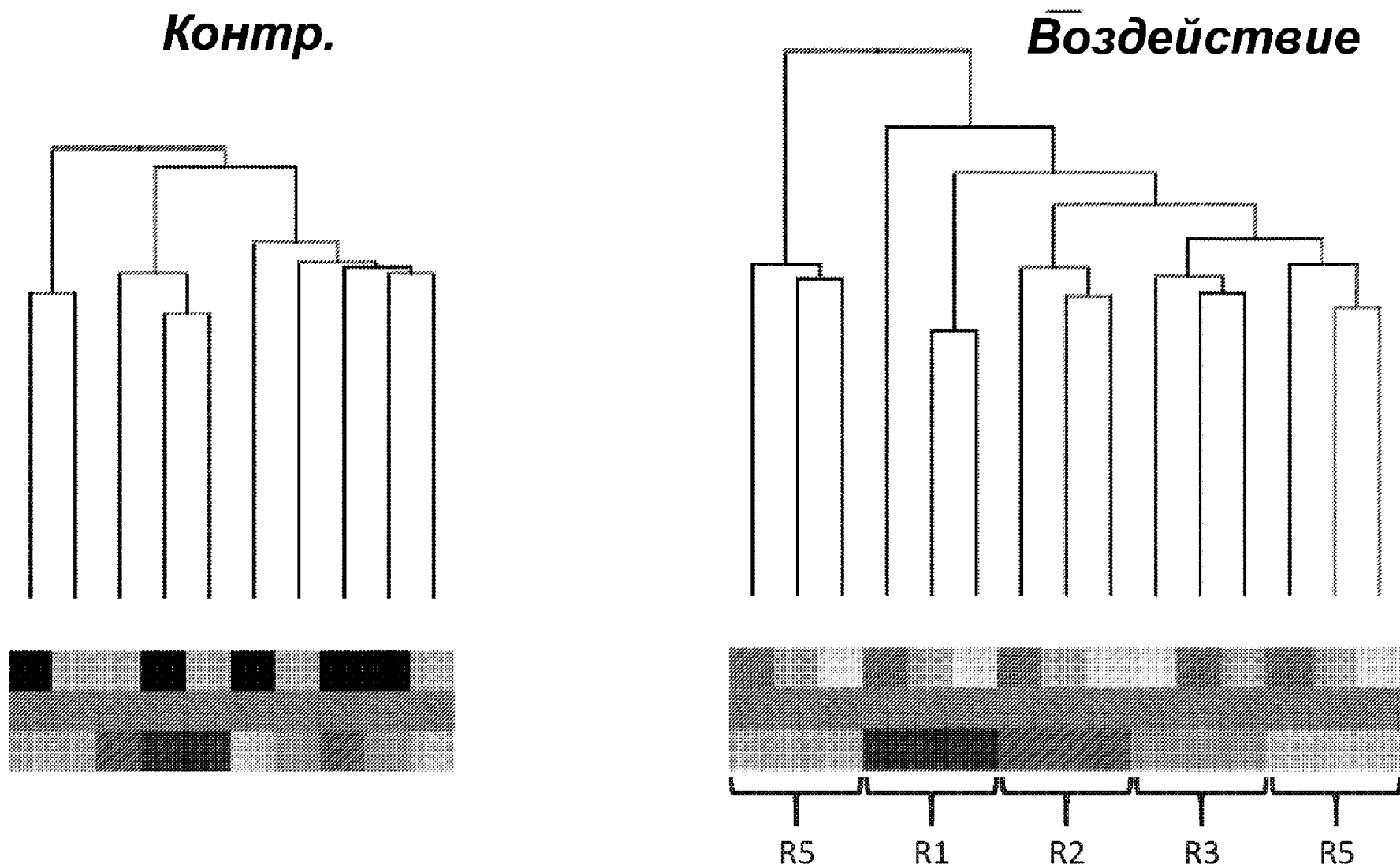
ID Образца	Повторность	Выделение	Условие	ID Образца	Повторность	Выделение	Условие
072	1	RLT	10 мкм	114	1	QIAZOL	10 мкм
073	1	RLT	2 мкм	115	1	QIAZOL	2 мкм
074	1	RLT	0.2 мкм	116	1	QIAZOL	0.2 мкм
076	1	RLT	ДМСО 0.04%	118	1	QIAZOL	ДМСО 0.04%
077	1	RLT	Питательная среда	119	1	QIAZOL	Питательная среда
191	2	RLT	10 мкм	233	2	QIAZOL	10 мкм
192	2	RLT	2 мкм	234	2	QIAZOL	2 мкм
193	2	RLT	0.2 мкм	235	2	QIAZOL	0.2 мкм
195	2	RLT	ДМСО 0.04%	237	2	QIAZOL	ДМСО 0.04%
196	2	RLT	Питательная среда	238	2	QIAZOL	Питательная среда
310	3	RLT	10 мкм	352	3	QIAZOL	10 мкм
311	3	RLT	2 мкм	353	3	QIAZOL	2 мкм
312	3	RLT	0.2 мкм	354	3	QIAZOL	0.2 мкм
314	3	RLT	ДМСО 0.04%	356	3	QIAZOL	ДМСО 0.04%
315	3	RLT	Питательная среда	357	3	QIAZOL	Питательная среда
450	4	RLT	10 мкм	492	4	QIAZOL	10 мкм
451	4	RLT	2 мкм	493	4	QIAZOL	2 мкм
452	4	RLT	0.2 мкм	494	4	QIAZOL	0.2 мкм
454	4	RLT	ДМСО 0.04%	496	4	QIAZOL	ДМСО 0.04%
455	4	RLT	Питательная среда	497	4	QIAZOL	Питательная среда
576	5	RLT	10 мкм	618	5	QIAZOL	10 мкм
577	5	RLT	2 мкм	619	5	QIAZOL	2 мкм
578	5	RLT	0.2 мкм	620	5	QIAZOL	0.2 мкм
580	5	RLT	ДМСО 0.04%	622	5	QIAZOL	ДМСО 0.04%
581	5	RLT	Питательная среда	623	5	QIAZOL	Питательная среда

Фиг. 18

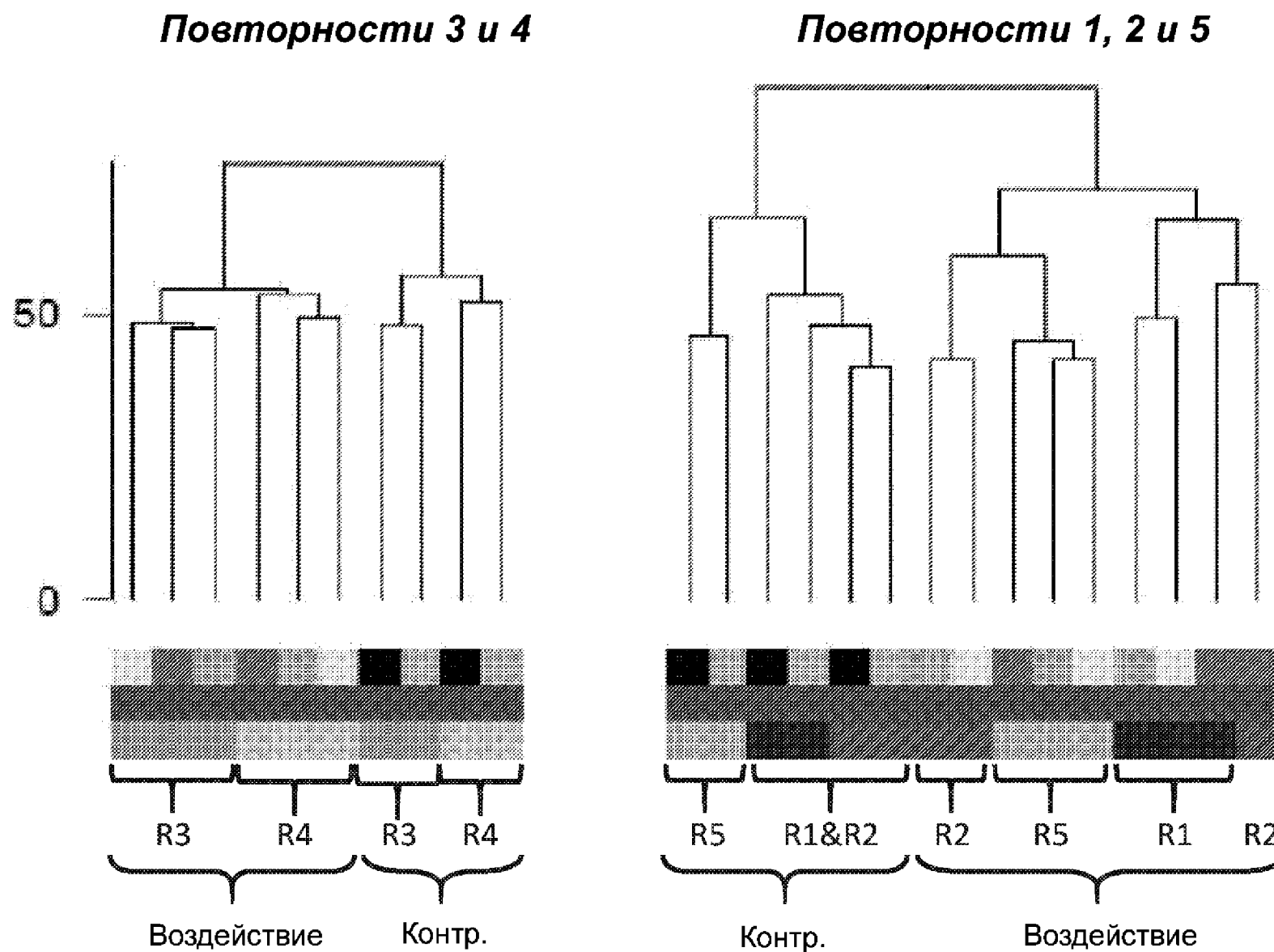


Фиг. 19

33/71



Фиг. 20



Фиг. 21

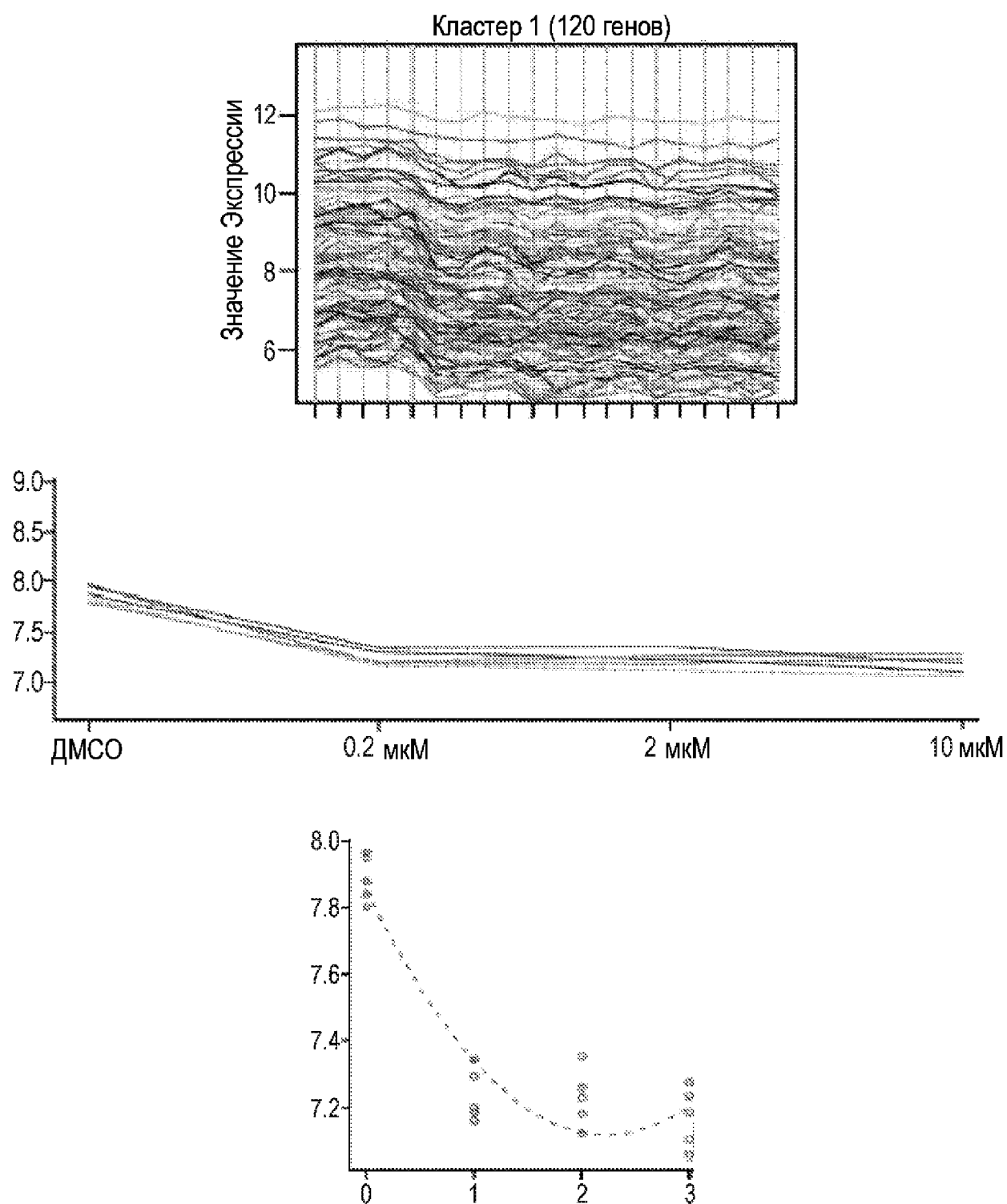
ВЫДЕЛЕНИЕ С ПОМОЩЬЮ RLT						
	10 мкМ по сравнению с ДМСО		2 мкМ по сравнению с ДМСО		0.2 мкМ по сравнению с ДМСО	
Кол-во (#) анализируемых генов	75,641		75,641		75,641	
Кол-во (#) экспрессированных генов	27,282		27,428		27,645	
Кол-во (#) регулируемых генов	460		546		462	
	244 повышение	216 понижение	183 повышение	363 понижение	185 повышение	277 понижение
Наиболее регулируемые гены	1. PCSK1 2. PDK4 3. RBP4	1. TAGLN 2. JD058756 3. ANKRD1	1. PCSK1 2. PDK4 3. RBP4	1. TAGLN 2. ANKRD1 3. GREM2	1. PCSK1 2. PDK4 3. RBP4	1. TAGLN 2. KRT19P2 3. ANKRD1
Наиболее важный путь(и)	Клеточная адгезия и внеклеточный матрикс (понижение)		Клеточная адгезия и внеклеточный матрикс (понижение)		Клеточная адгезия и внеклеточный матрикс (понижение)	

Фиг. 22

ВЫДЕЛЕНИЕ С ПОМОЩЬЮ QIAzol						
	10 мкМ по сравнению с ДМСО		2 мкМ по сравнению с ДМСО		0.2 мкМ по сравнению с ДМСО	
Кол-во (#) анализируемых генов	75,641		75,641		75,641	
Кол-во (#) экспрессированных генов	27,647		28,155		28,047	
Кол-во (#) регулируемых генов	615		638		550	
	302 повышение	313 понижение	397 повышение	241 понижение	355 повышение	195 понижение
Наиболее регулируемые гены	1. RBP4 2. IGFBP3 3. PCSK1	1. TAGLN 2. U88892 3. ANKRD1	1. RBP4 2. IGFBP3 3. PCSK1	1. TAGLN 2. ANKRD1 3. GREM1	1. RBP4 2. PDK4 3. IGFBP3	1. TAGLN 2. ANKRD1 3. U88892
Наиболее важный путь(и)	Клеточная адгезия и внеклеточный матрикс (понижение) Реакция на вирусную инфекцию/ передачу сигналов интерферона (повышение)		Клеточная адгезия и внеклеточный матрикс (понижение) Реакция на вирусную инфекцию/ передачу сигналов интерферона (повышение)		Клеточная адгезия и внеклеточный матрикс (понижение) Реакция на вирусную инфекцию/ передачу сигналов интерферона (повышение)	

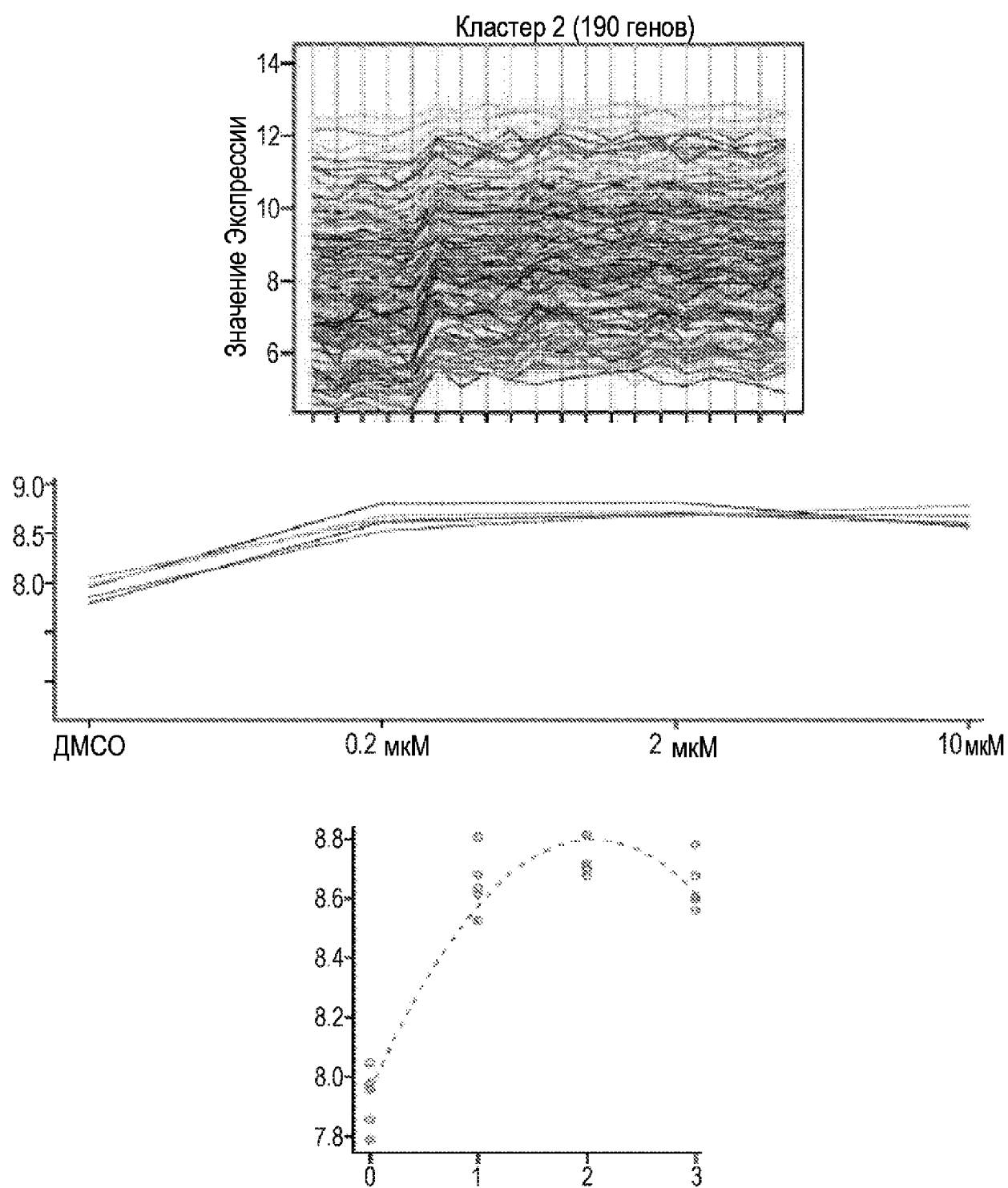
Фиг. 23

37/71

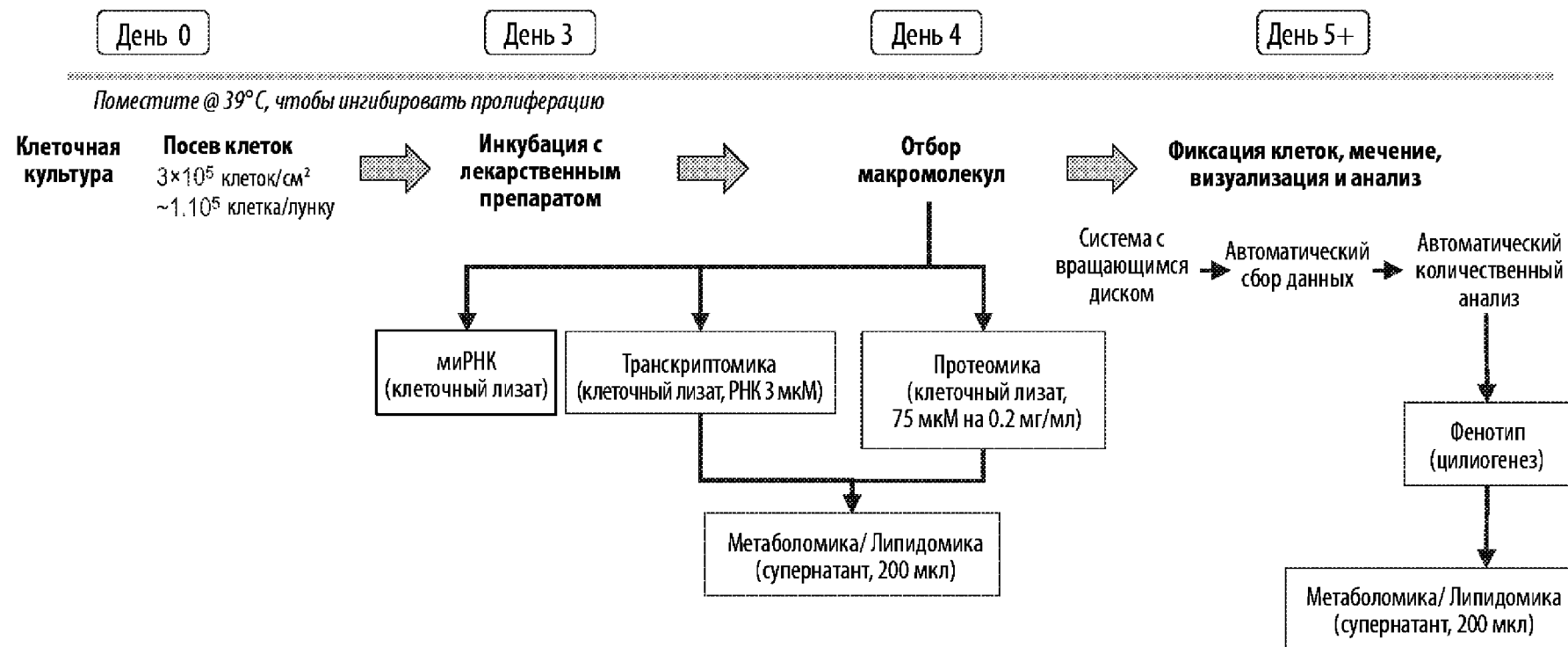


Фиг. 24А

38/71



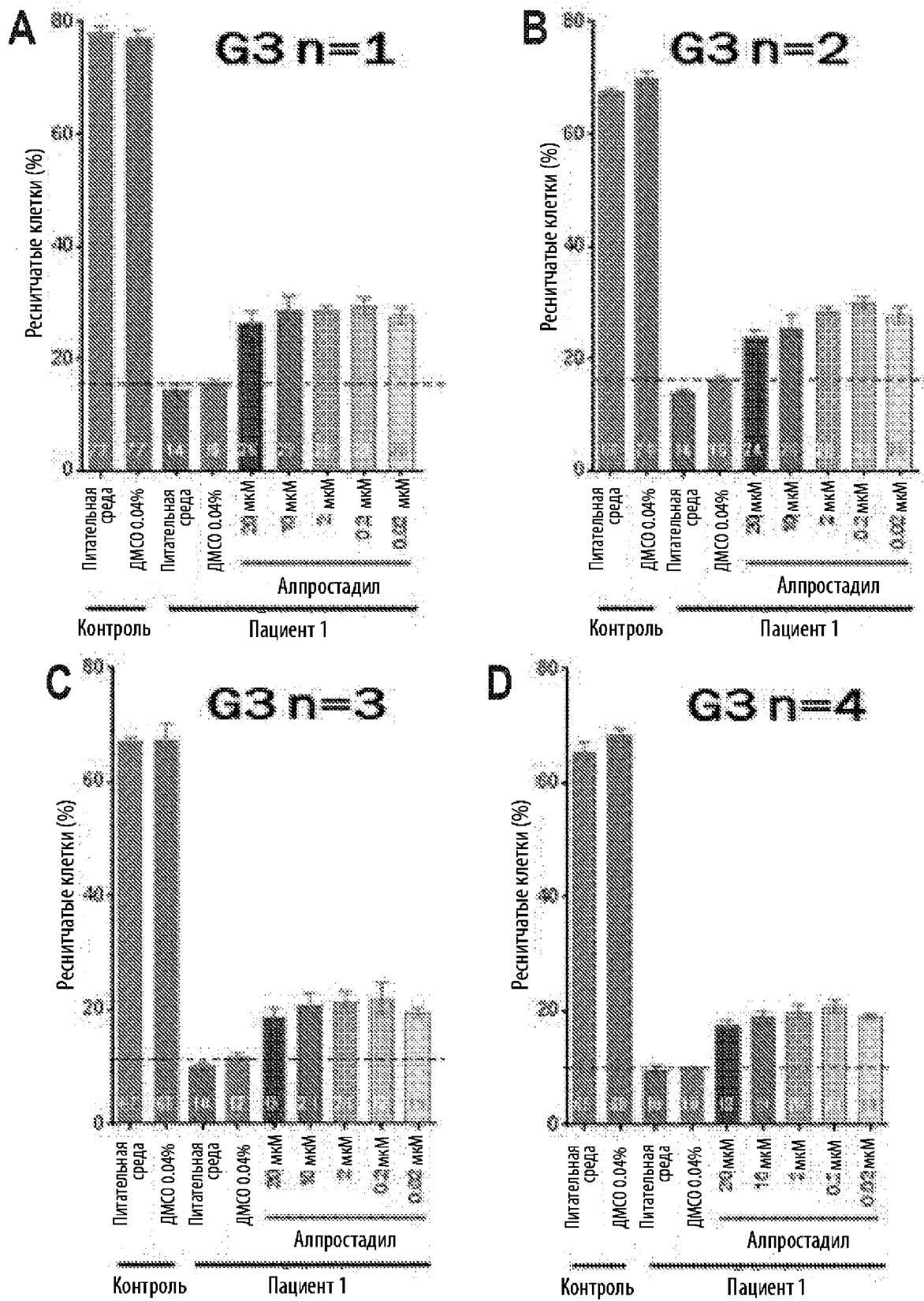
Фиг. 24В



39/71

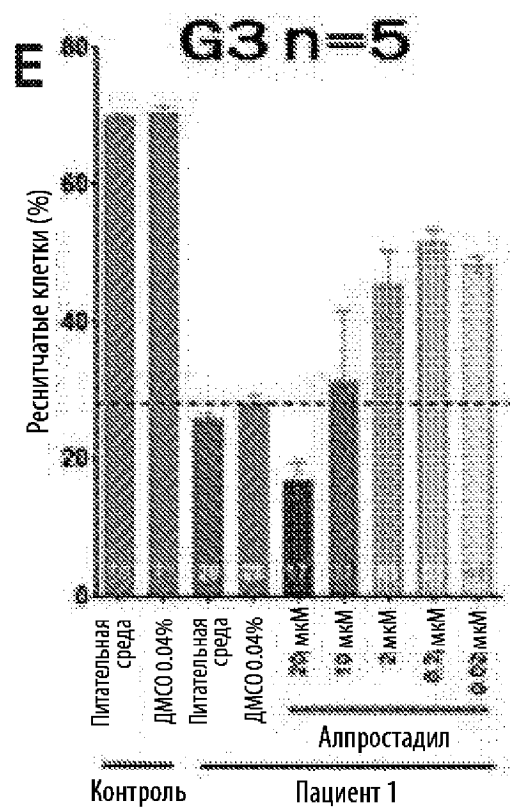
Фиг. 25

40/71



Фиг. 26

41/71

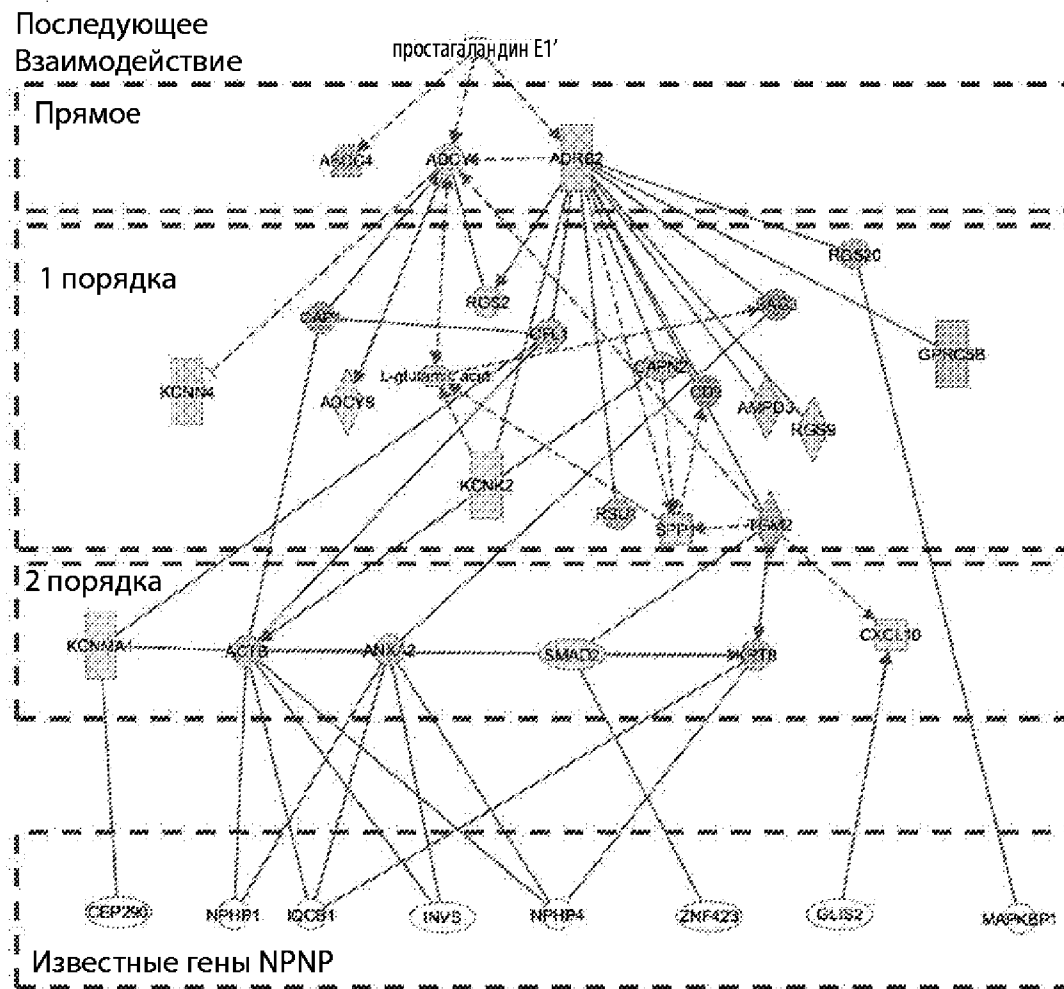


Фиг. 26 (продолж.)

Категория	Количество
Всего WY, $p < 0,05$	31
Есть препараты	9
Потенциально возможны препараты	1
Биофарм	4

- IMPDH1
- CCL2
- MICA
- TYMS
- C1R
- CXCL10
- PLAT
- FGF1
- IL1R1

Фиг. 27

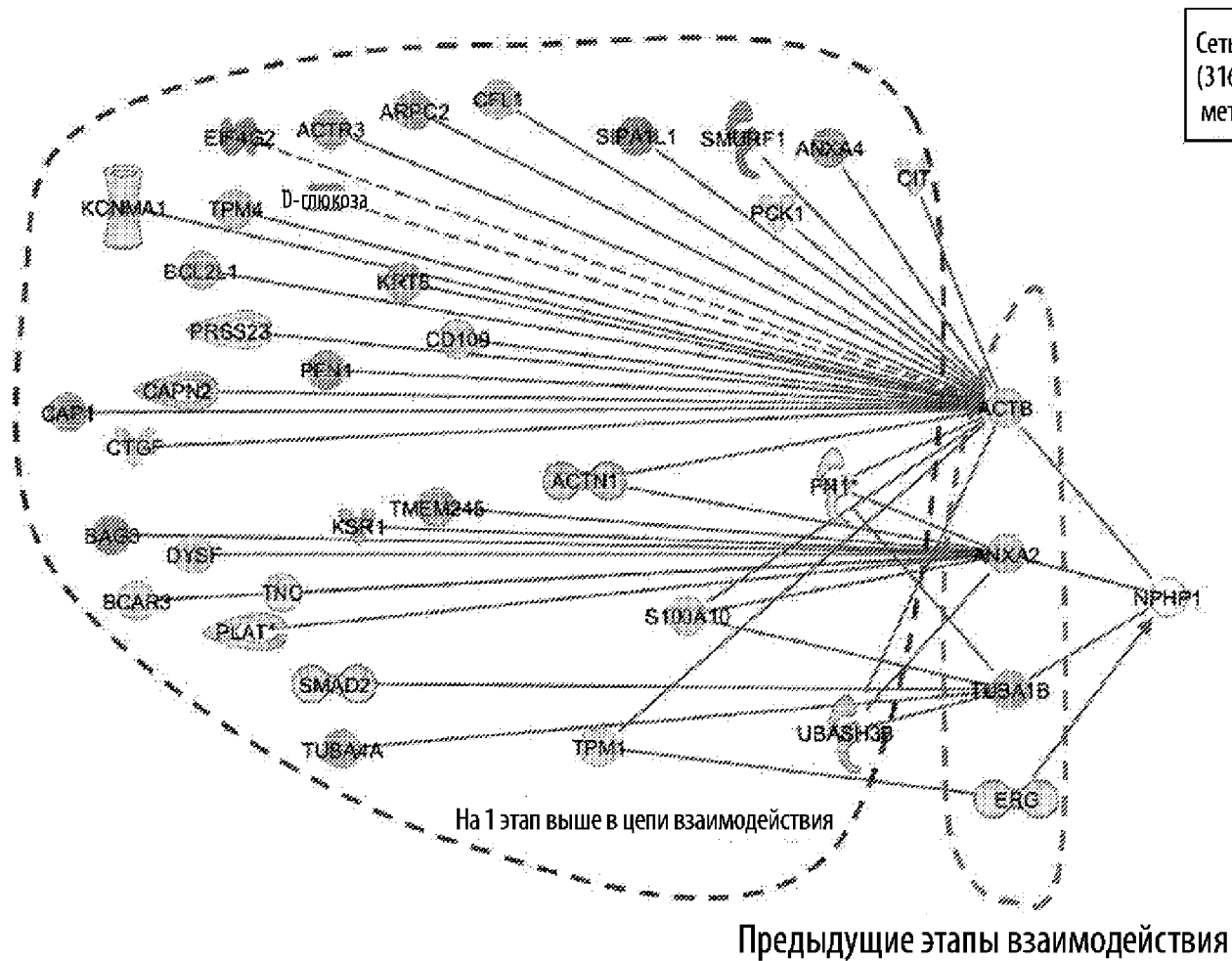


Сеть IPA, построенная с использованием
мРНК (316), белка (29), микроРНК (7),
метаболитов (11)

Целевые возможности

ген	категория	к-во лек. средств
ADRB2	Есть препараты	87
KCNMA1	Есть препараты	17
KCNK4	Есть препараты	11
KCNK2	Есть препараты	9
ABCC4	Есть препараты	3
CXCL10	Есть препараты	1
SPP1	Есть препараты	1
ADCY8	Потенциально возможные препараты	
AMPD3	Потенциально возможные препараты	
CAPN2	Потенциально возможные препараты	
GPRC5B	Потенциально возможные препараты	
TGM2	Потенциально возможные препараты	
ANXA2	Биофарм	
CD9	Биофарм	

Фиг. 28А

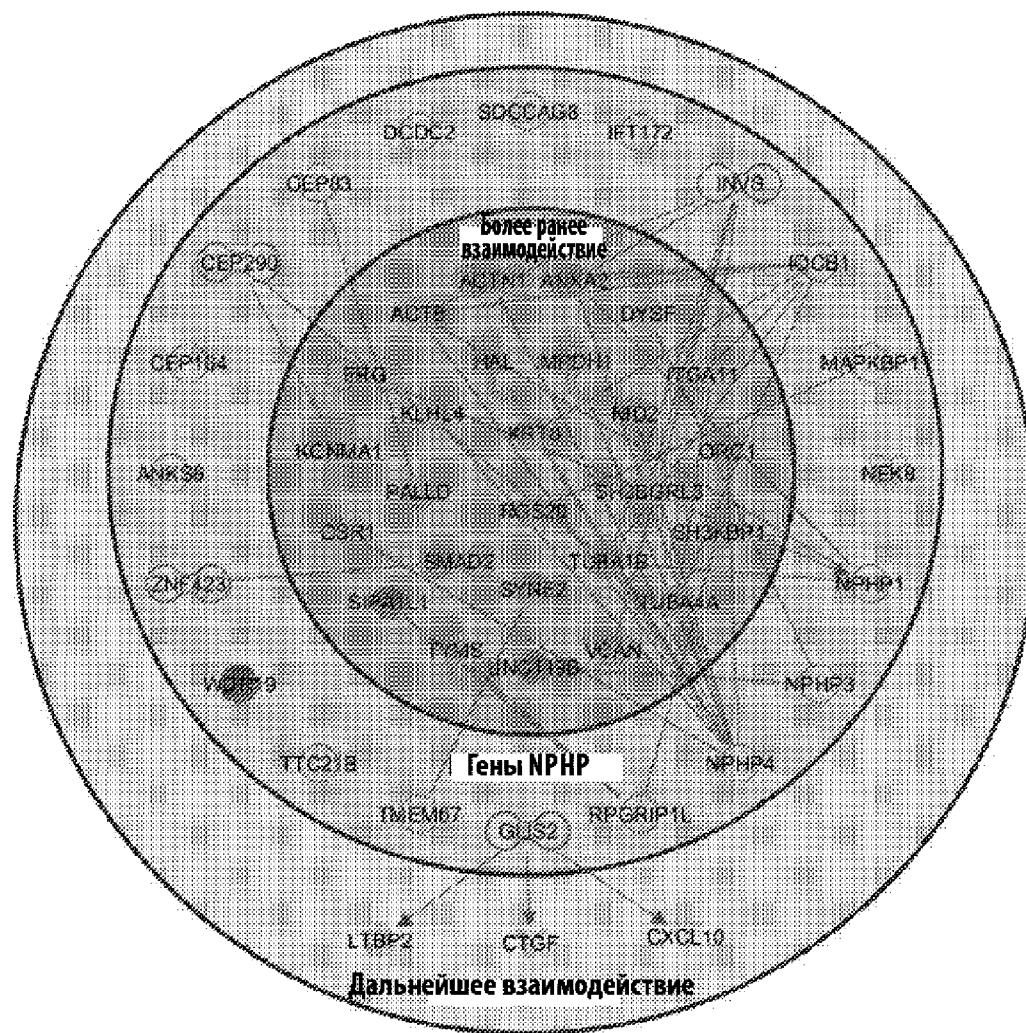


Сеть IPA, построенная с использованием мРНК (316), белка (29), микроРНК (7), метаболитов (11)

Целевые возможности

ген	категория	к-во лек. средств
KCNMA1	Есть препараты	17
TUBA4A	Есть препараты	4
PLAT	Есть препараты	3
TUBA1B	Есть препараты	3
PCK1	Есть препараты	2
ACTR3	Есть препараты	1
ARPC2	Есть препараты	1
BCL2L1	Есть препараты	1
ANXA2	Биофарм	
ANXA4	Биофарм	
CTGF	Биофарм	
CD109	Биофарм	
CIT	Потенциально возможные препараты	
KSR1	Потенциально возможные препараты	
PRSS23	Потенциально возможные препараты	
TNC	Потенциально возможные препараты	
CAPN2	Потенциально возможные препараты	

Фиг. 28В

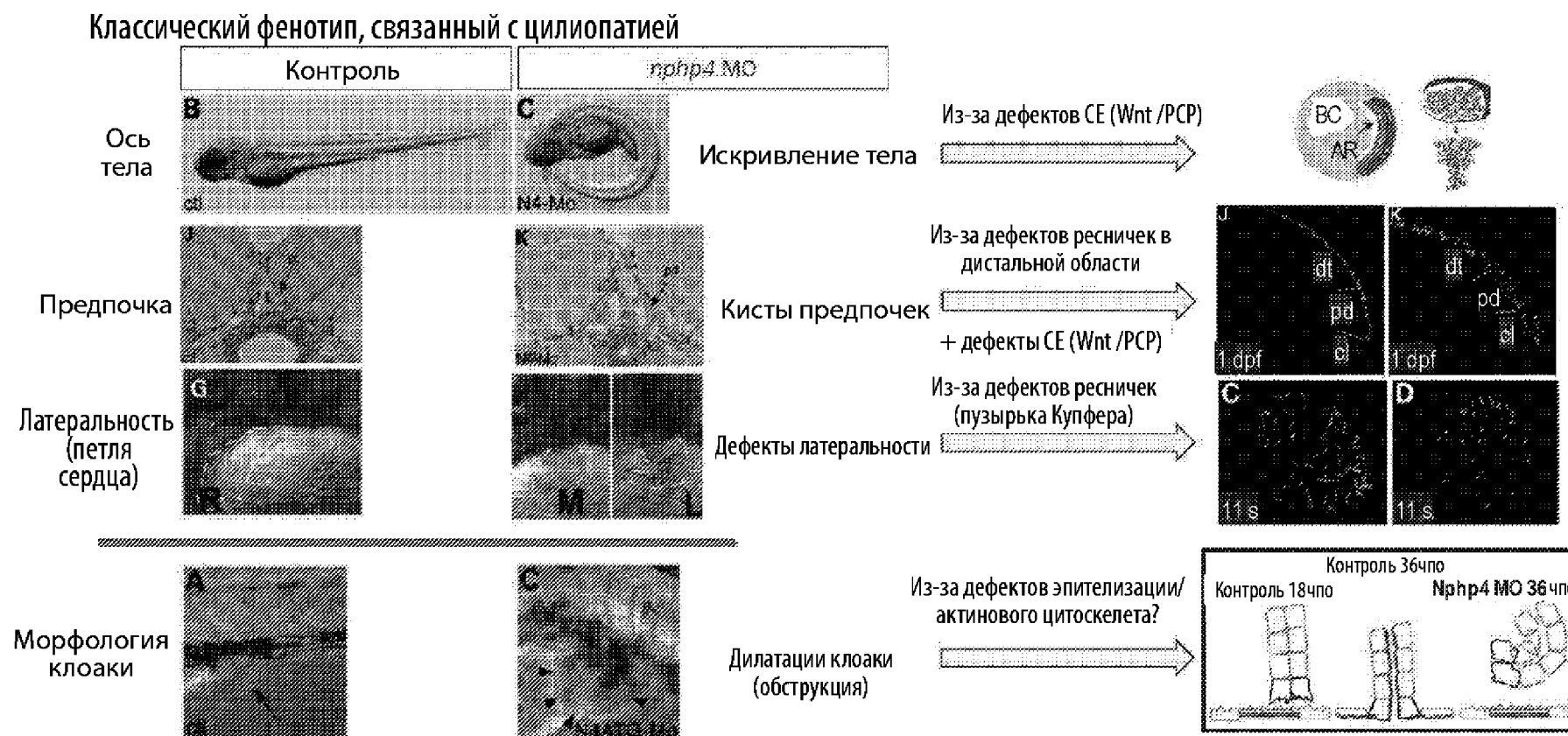


Сеть IPA, построенная с использованием мРНК (316), белка (29), микроРНК (7), метаболитов (11)

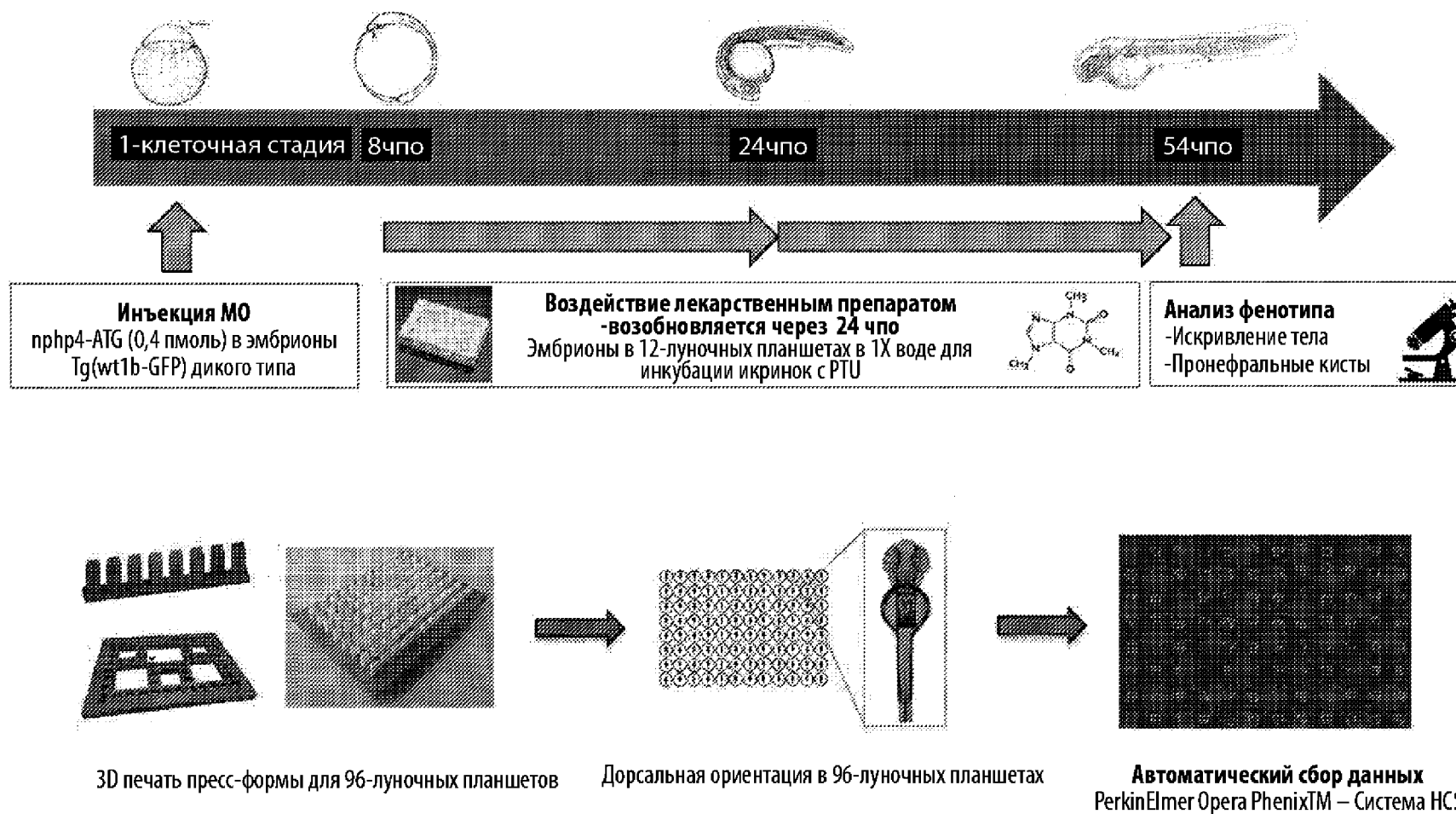
Целевые возможности

ген	категория	к-во лек. средств
TUMS	Есть препараты	19
KCNMA1	Есть препараты	17
IMPDH1	Есть препараты	4
TUBA4A	Есть препараты	4
TUBA18	Есть препараты	3
CXCL10	Есть препараты	1
HAL	Есть препараты	1
ANXA2	Биофарм	
CTGF	Биофарм	
ITGA11	Потенциально возможные препараты	
OSR1	Потенциально возможные препараты	

Фиг. 28С

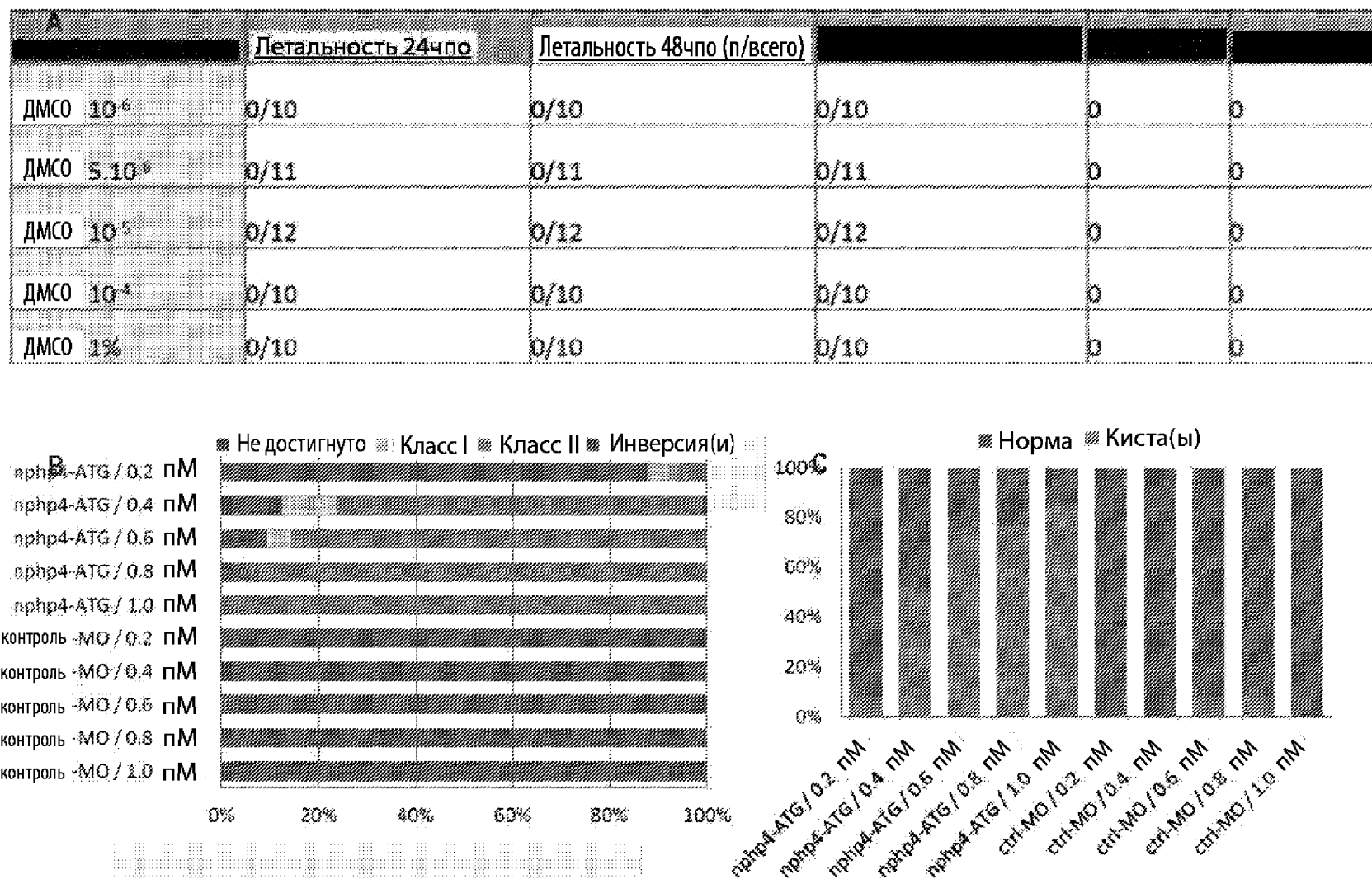


Фиг. 29

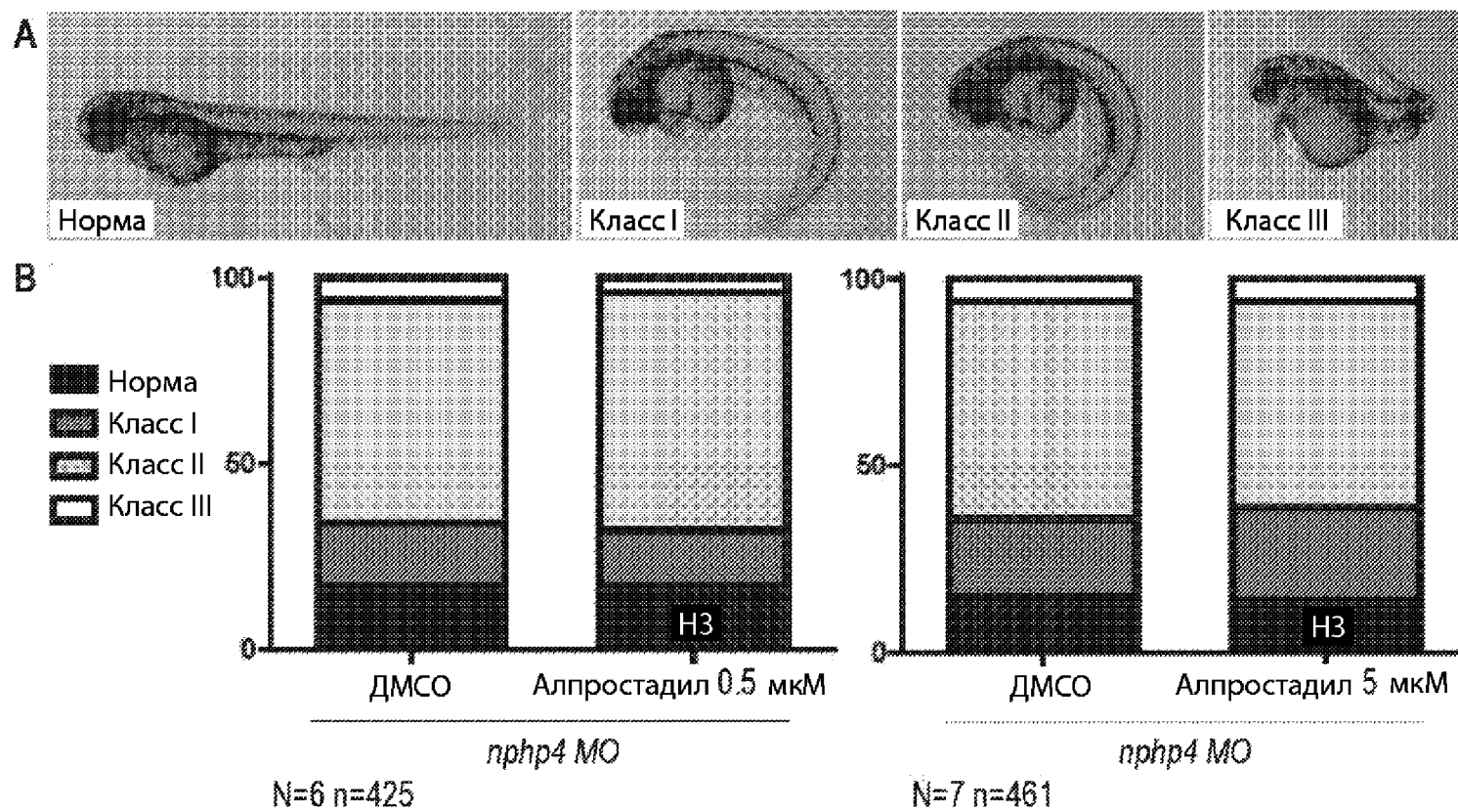


Westhoff et al, 2013; Wittbrodt et al, 2014

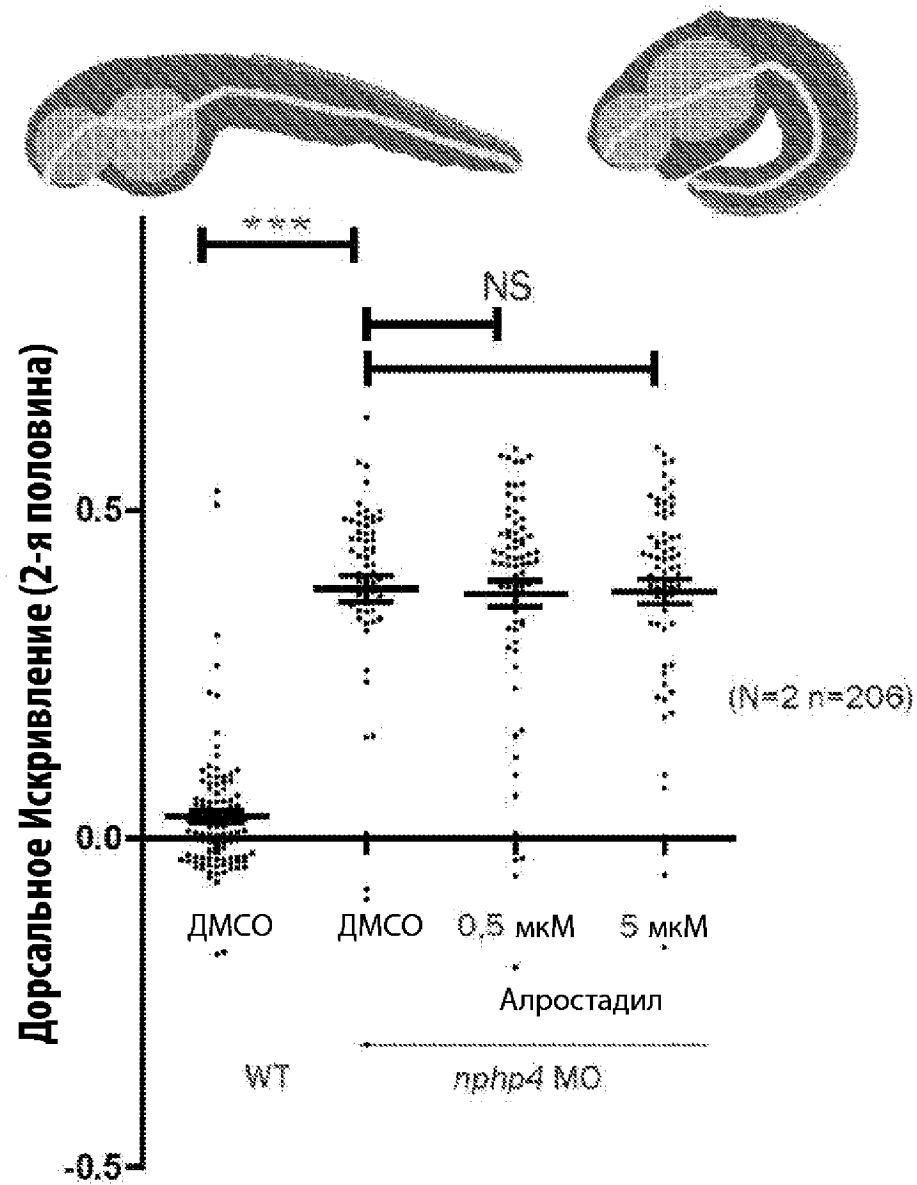
Фиг. 30



Фиг. 31

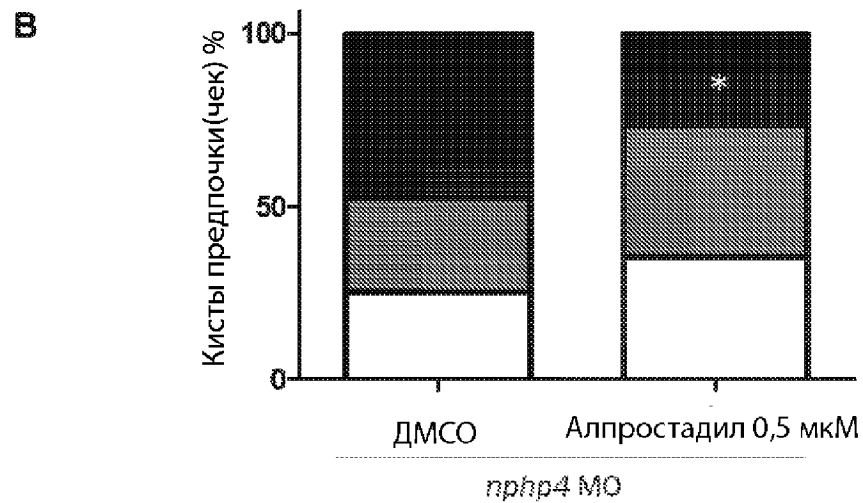
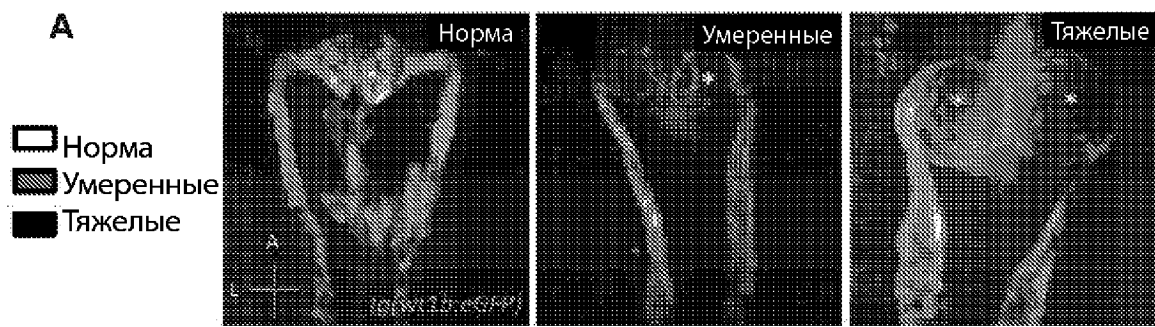


Фиг. 32

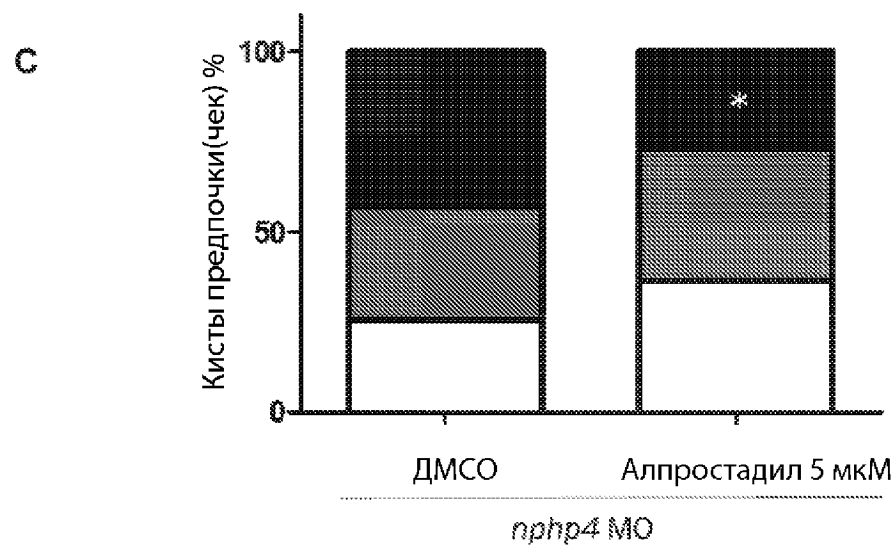


Фиг. 32 (продолж.)

51/71



(N=3 n=130), $p = .017579$ точный тест Фишера

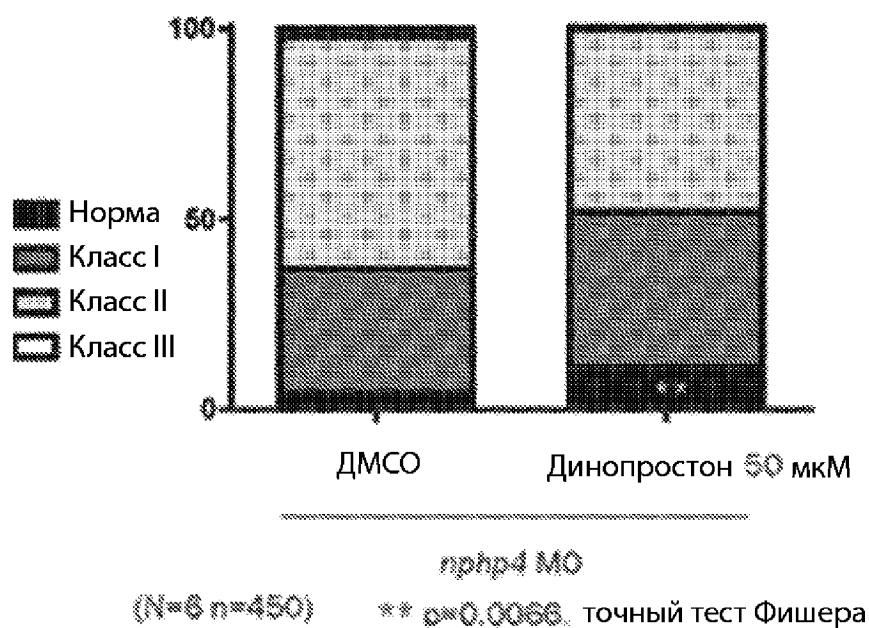


(N=4 n=185), $p = .017579$ точный тест Фишера

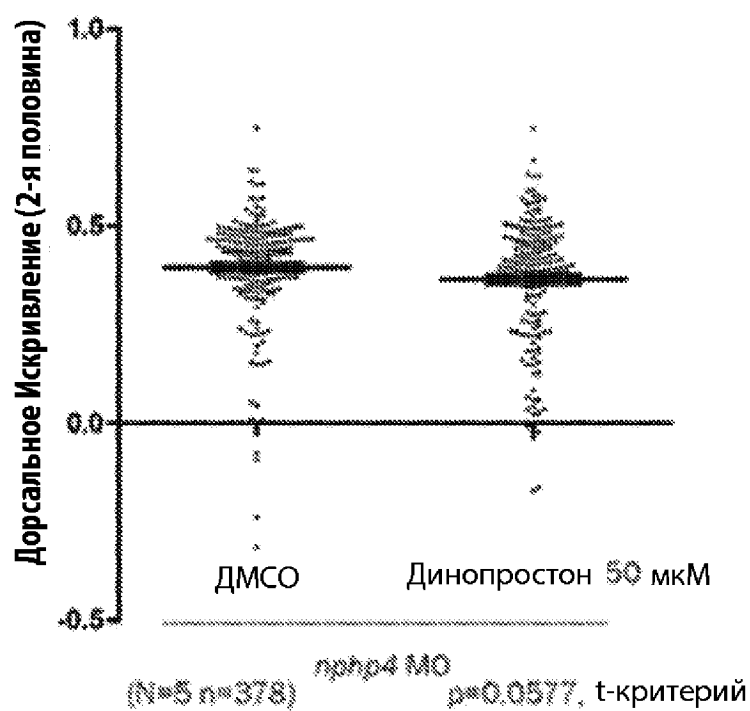
Фиг. 33

52/71

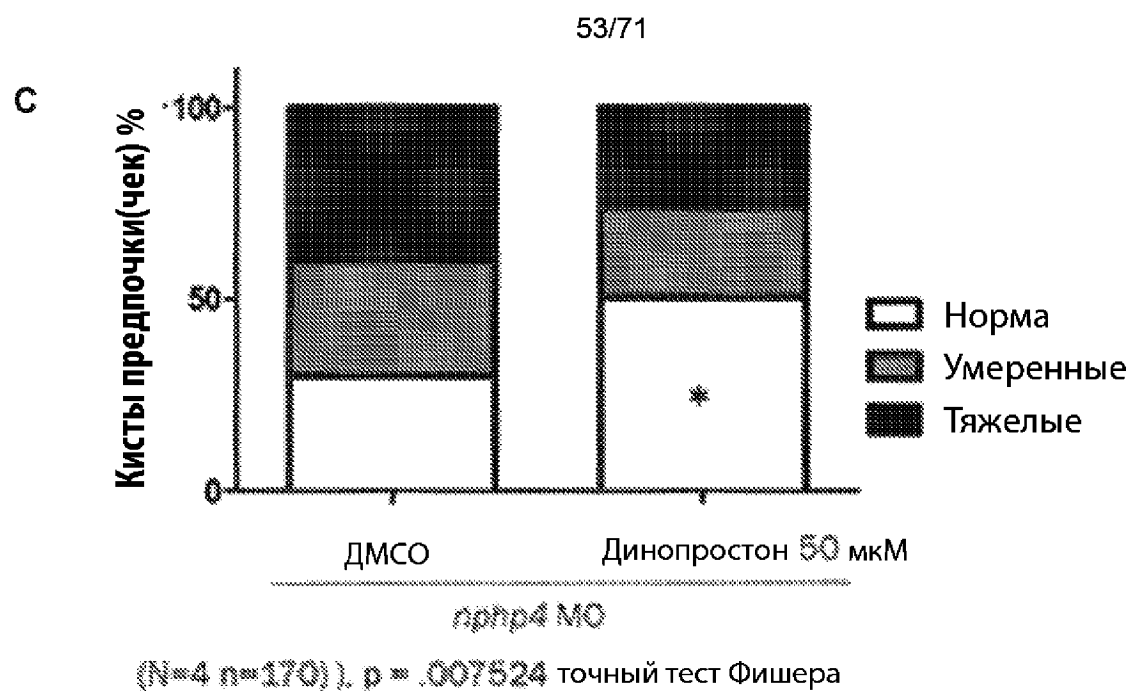
А



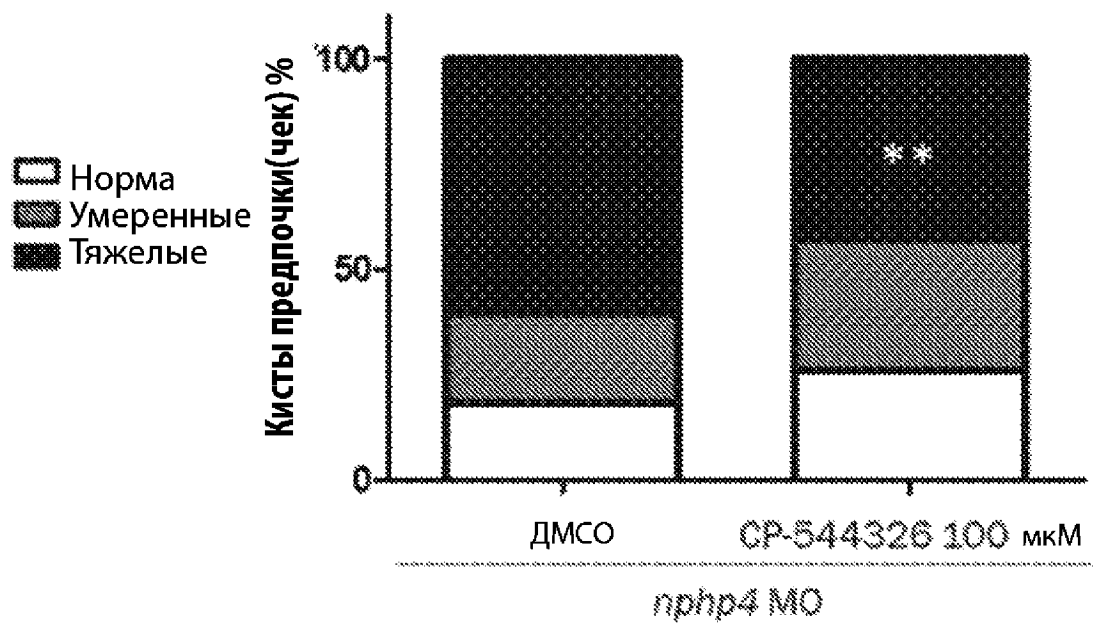
В



Фиг. 34



Фиг. 34 (продолж.)



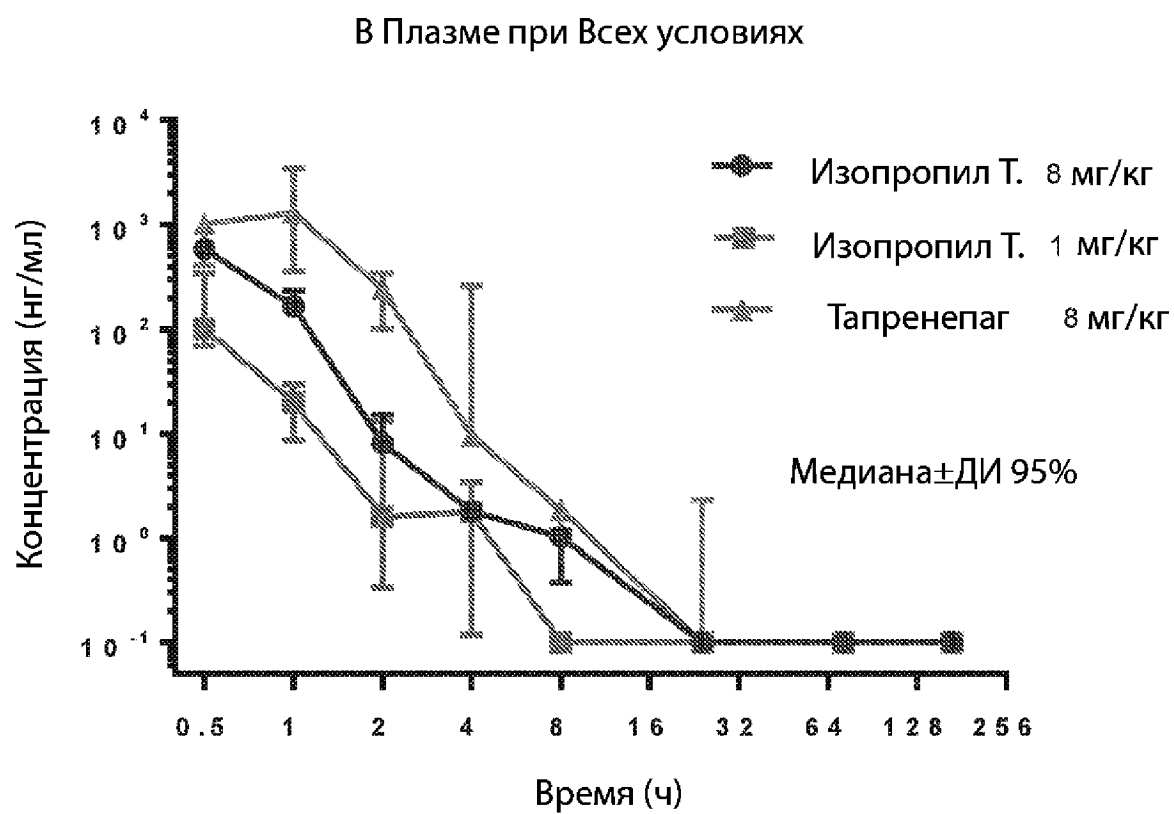
(N=5 n=237). $p = .009371$ точный тест Фишера

Фиг. 35

№ Группы	Воздействие	Режим дозирования	Количество животных/моменты времени после интраперитонеальной инъекции							
			0,5ч ± 3 мин (a)	1ч ± 6 мин (c)	2ч ± 12 мин (b)	4ч ± 24 мин (a)	8ч ± 50 мин (b)	24ч ± 2ч (c)	72ч ± 7ч (a)	168ч ± 16ч (b)
1	Изопропил тапренепага	1 мг/кг в День 0	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
2	Изопропил тапренепага	8 мг/кг в День 0	33, 34, 35, 36	37, 38, 39, 40	41, 42, 43, 44	45, 46, 47, 48	49, 50, 51, 52	53, 54, 55, 56	57, 58, 59, 60	61, 62, 63, 64
3	Тапренепаг	8 мг/кг в День 0	65, 66, 67, 68	69, 70, 71, 72	73, 74, 75, 76	77, 78, 79, 80	81, 82, 83, 84	85, 86, 87, 88	89, 90, 91, 92	93, 94, 95, 96

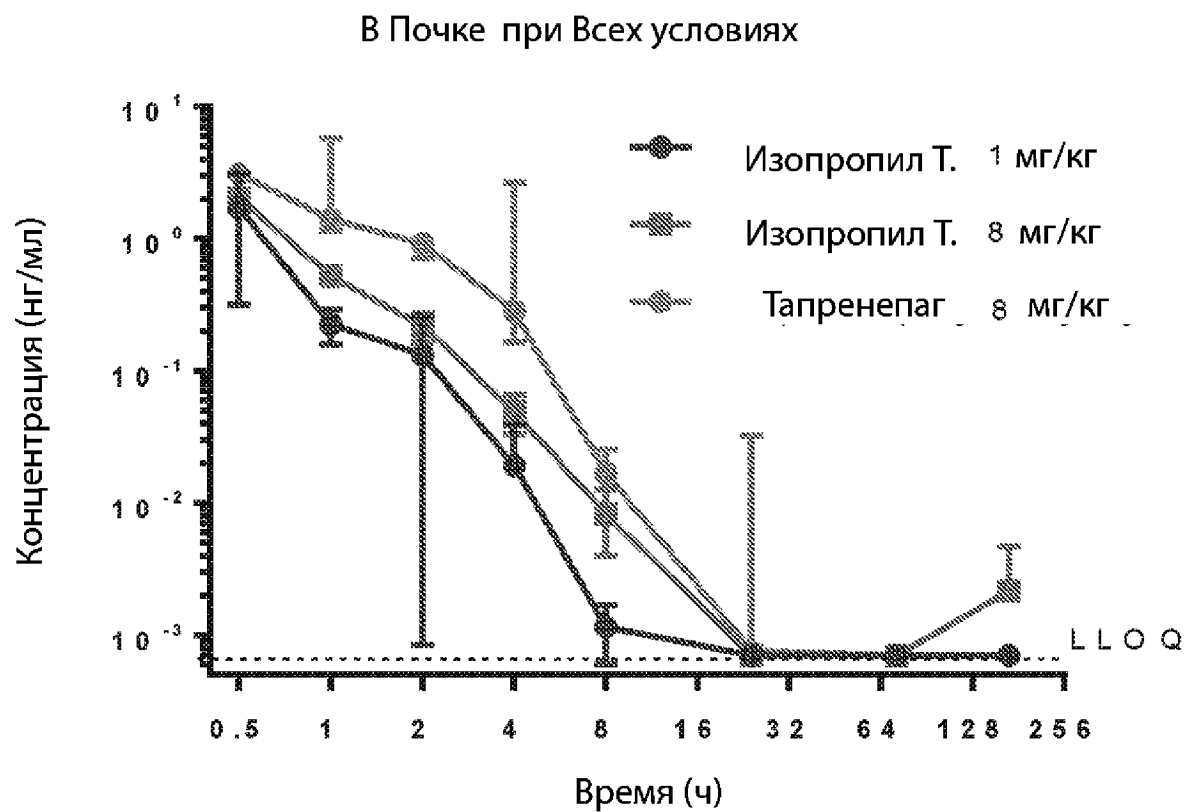
(a) = набор 1 / (b) = set 2 / (c) = set 3

Фиг. 36

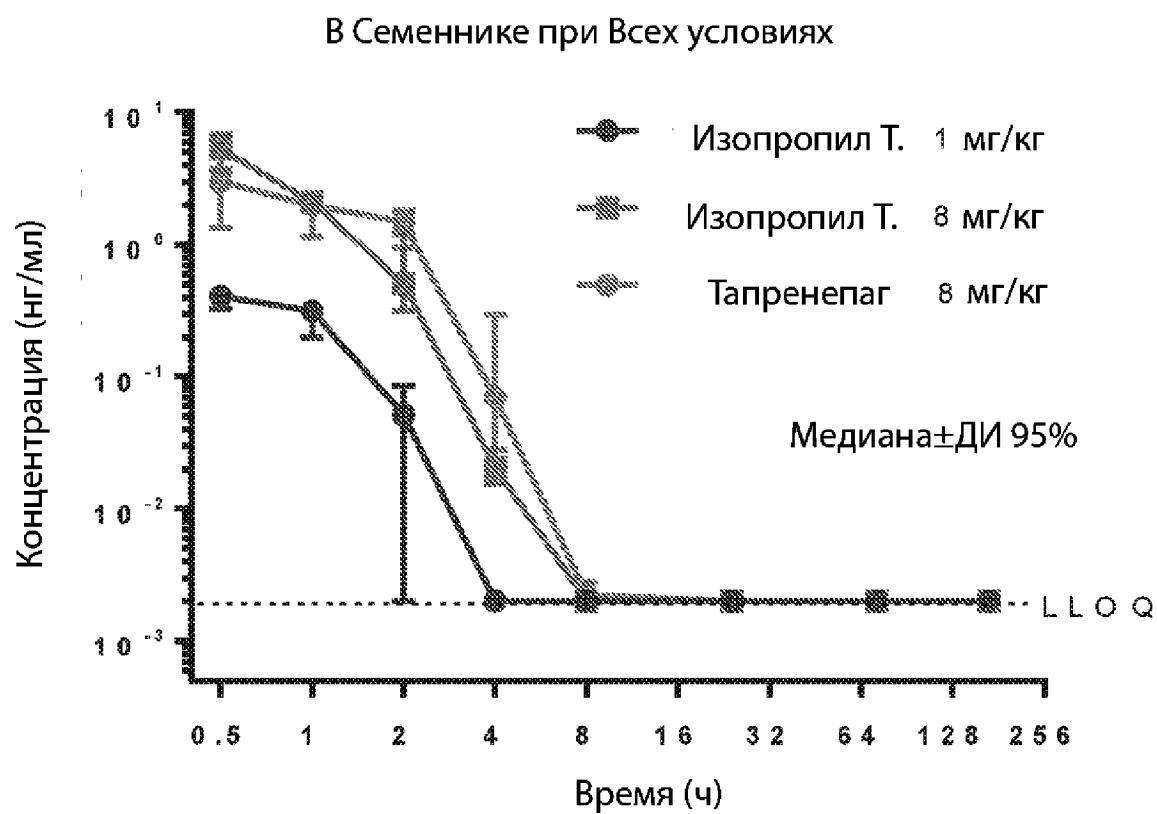


Фиг. 37А

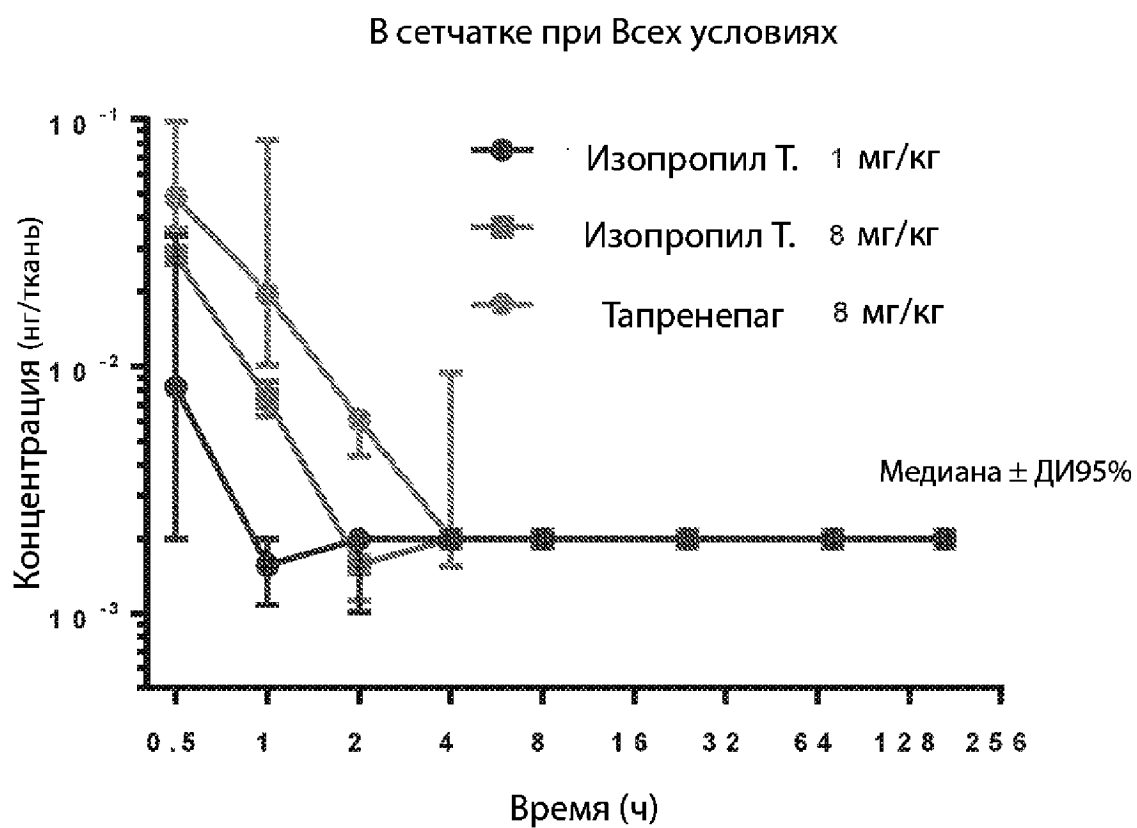
57/71



Фиг. 37В

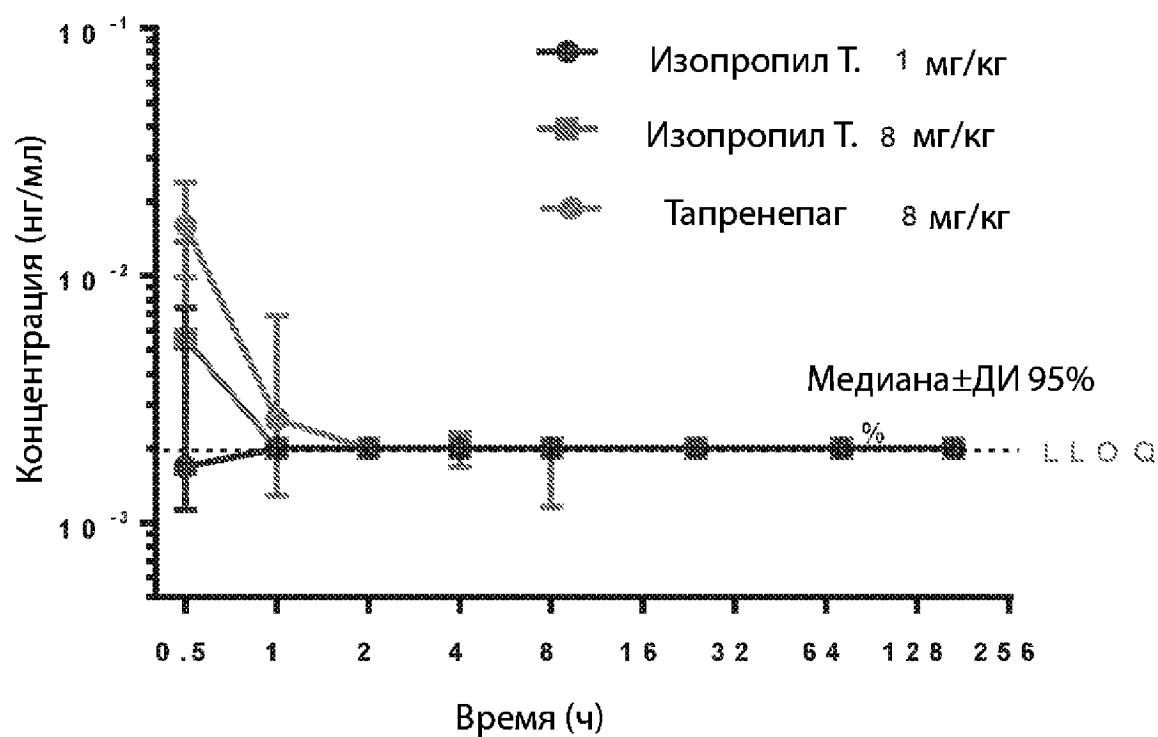


Фиг. 37С

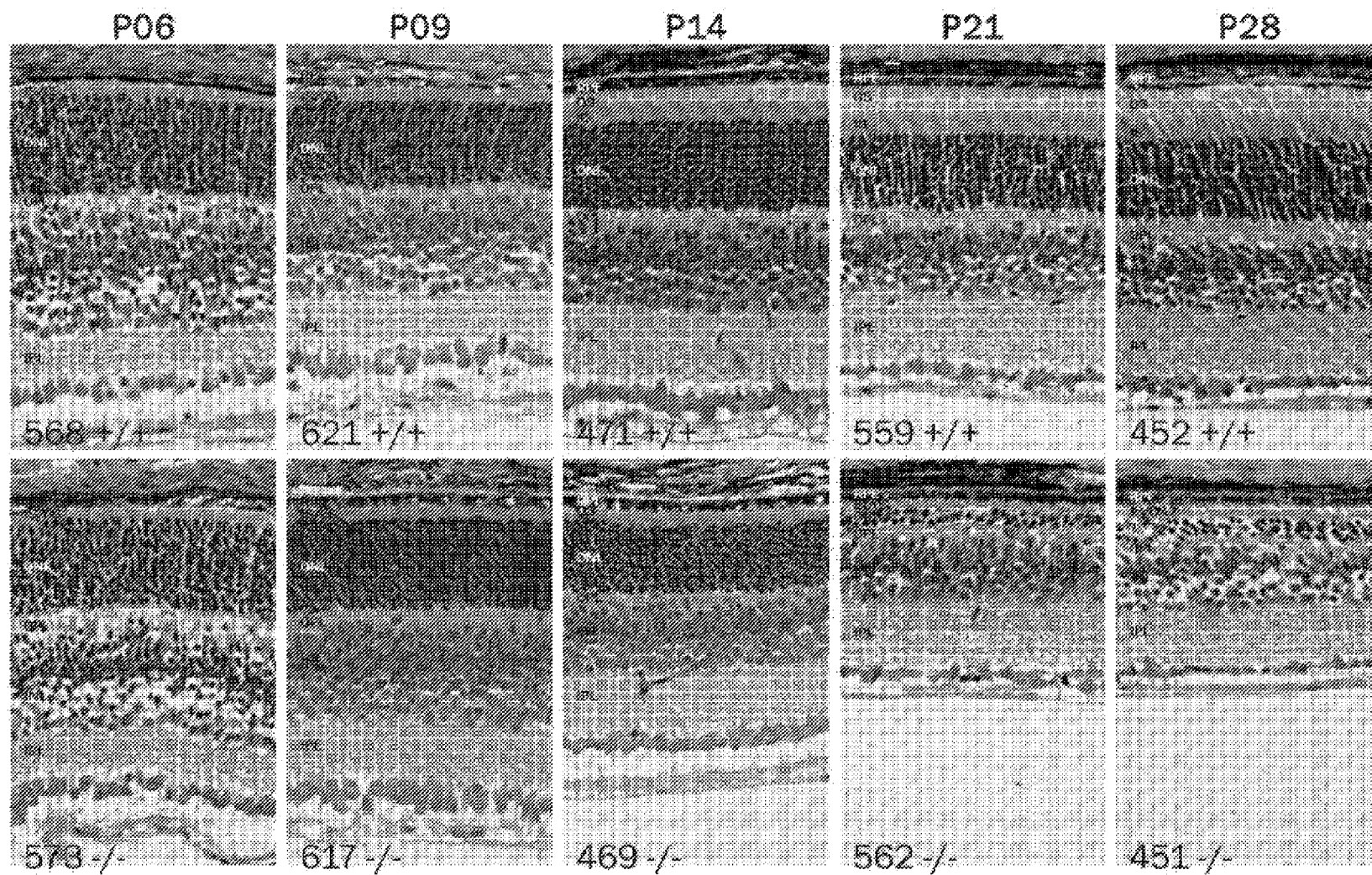


Фиг. 37D

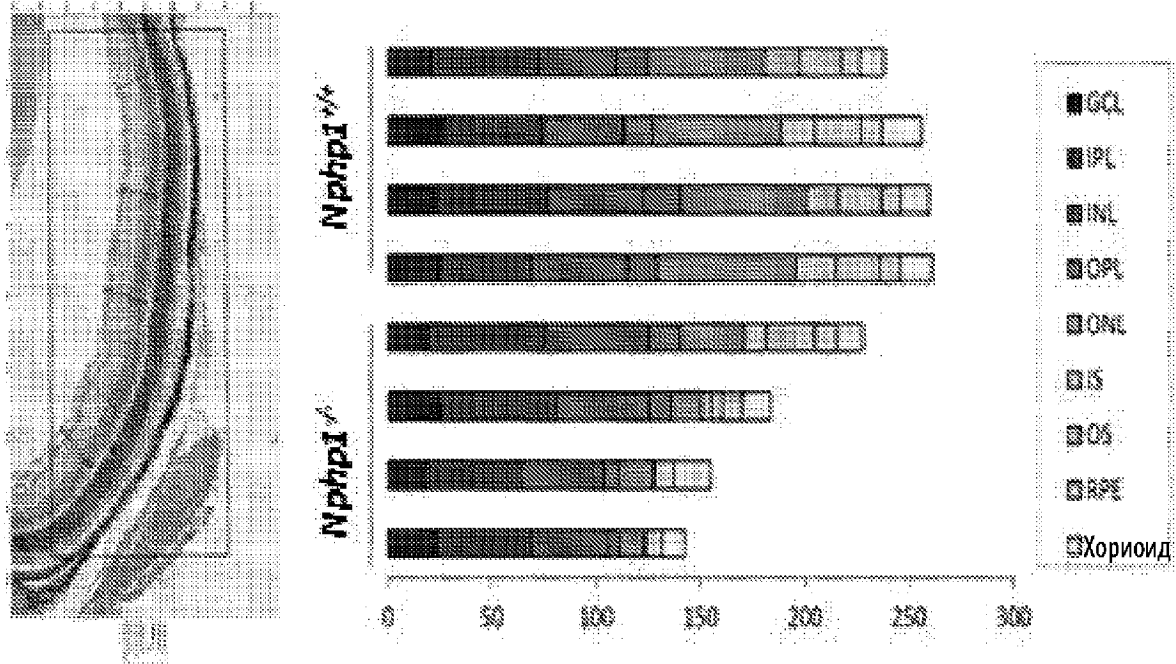
В стекловидном теле при Всех условиях



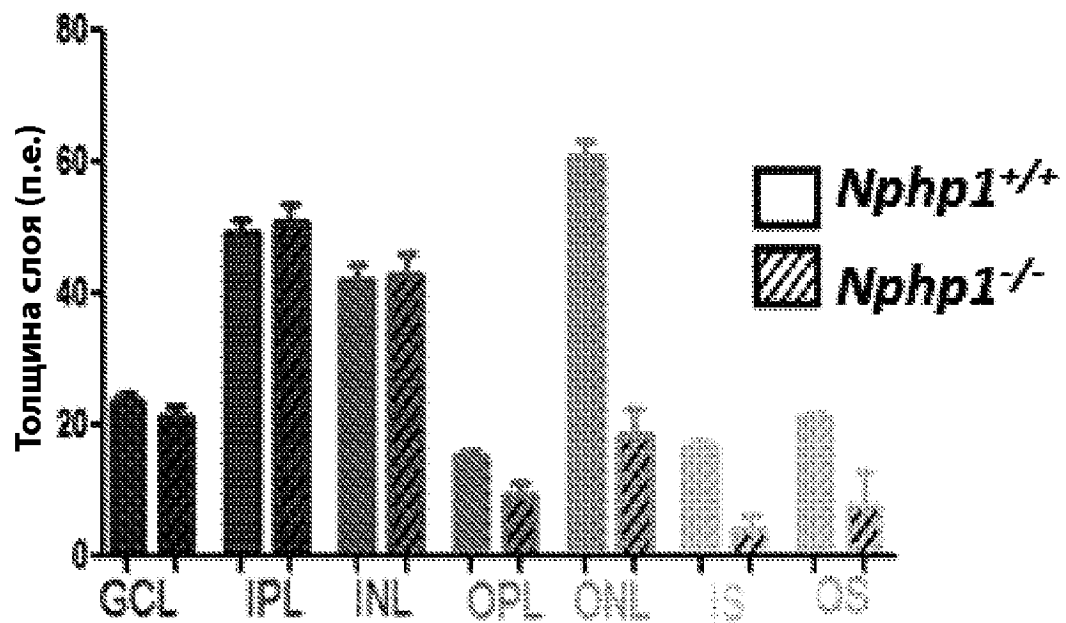
Фиг. 37Е



Фиг. 38А

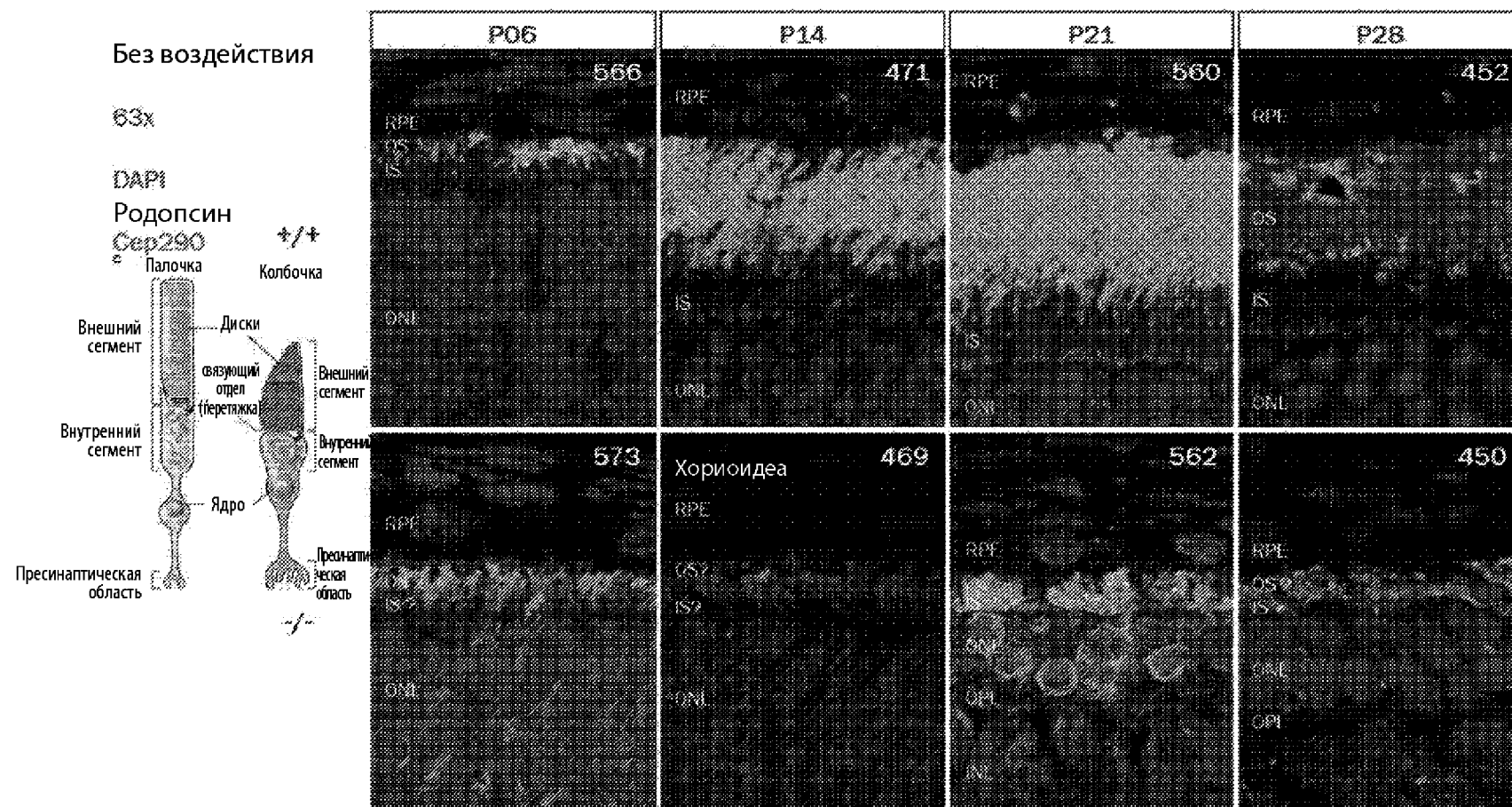


Фиг. 38В

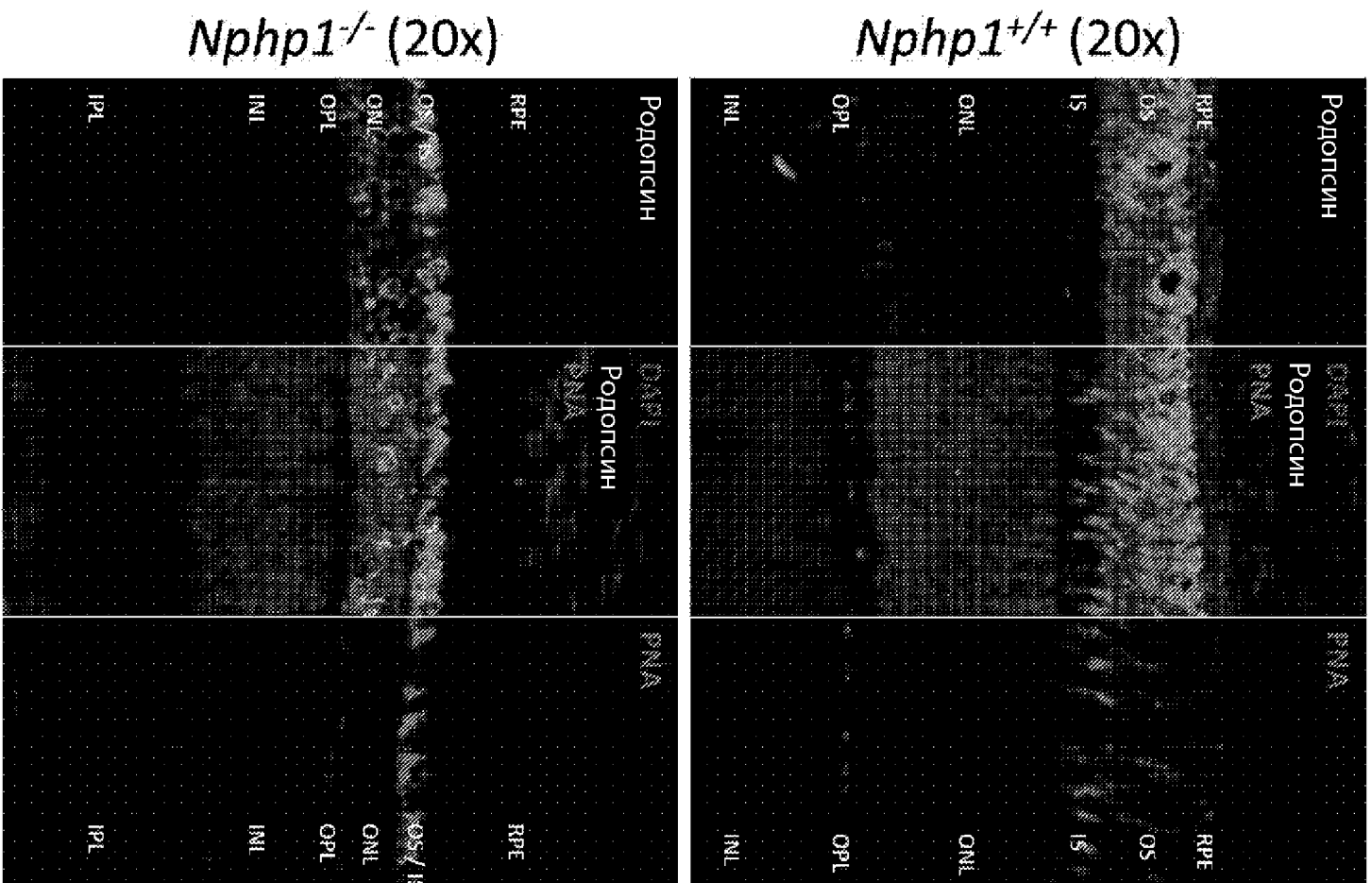


Фиг. 38С

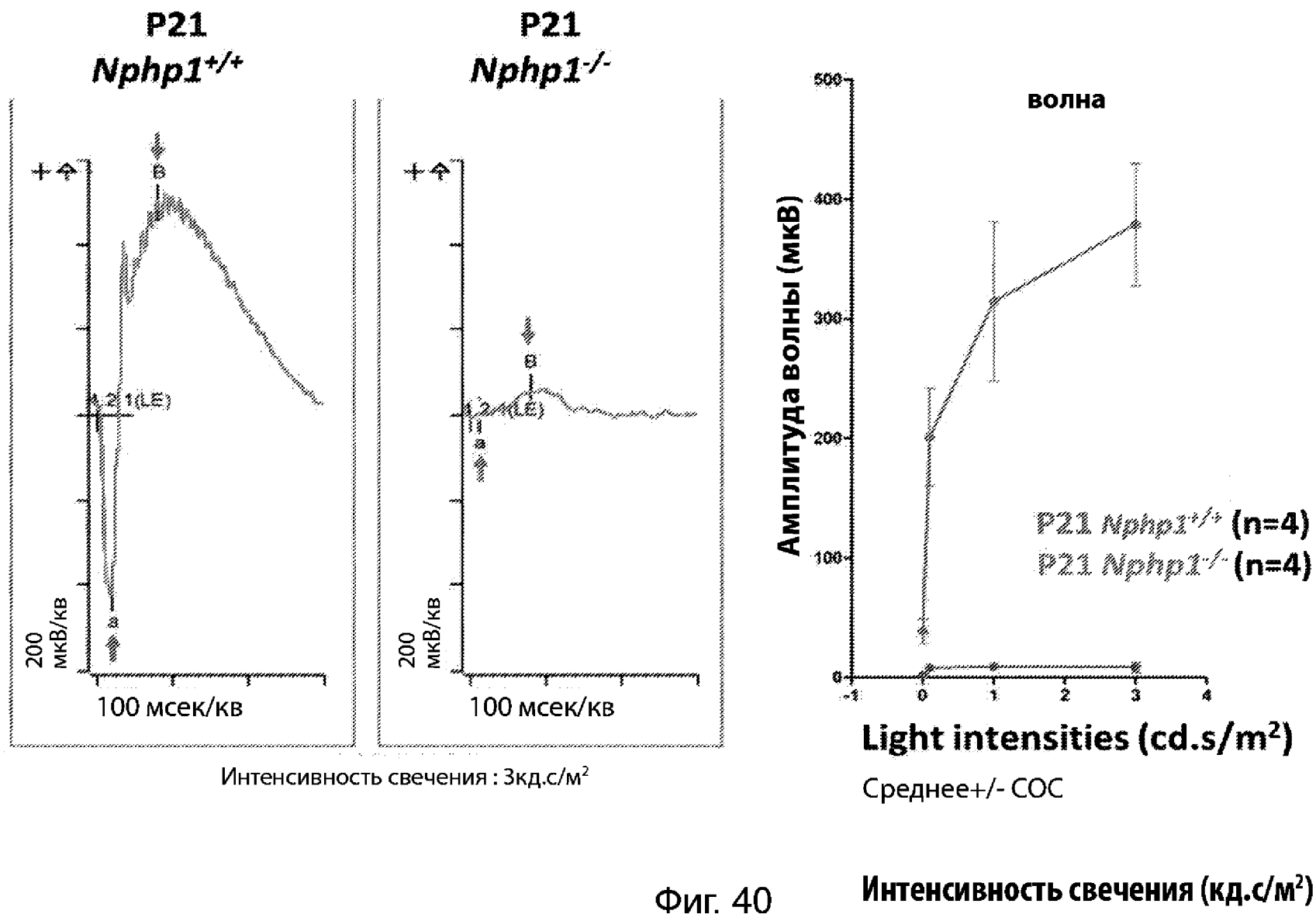
64/71



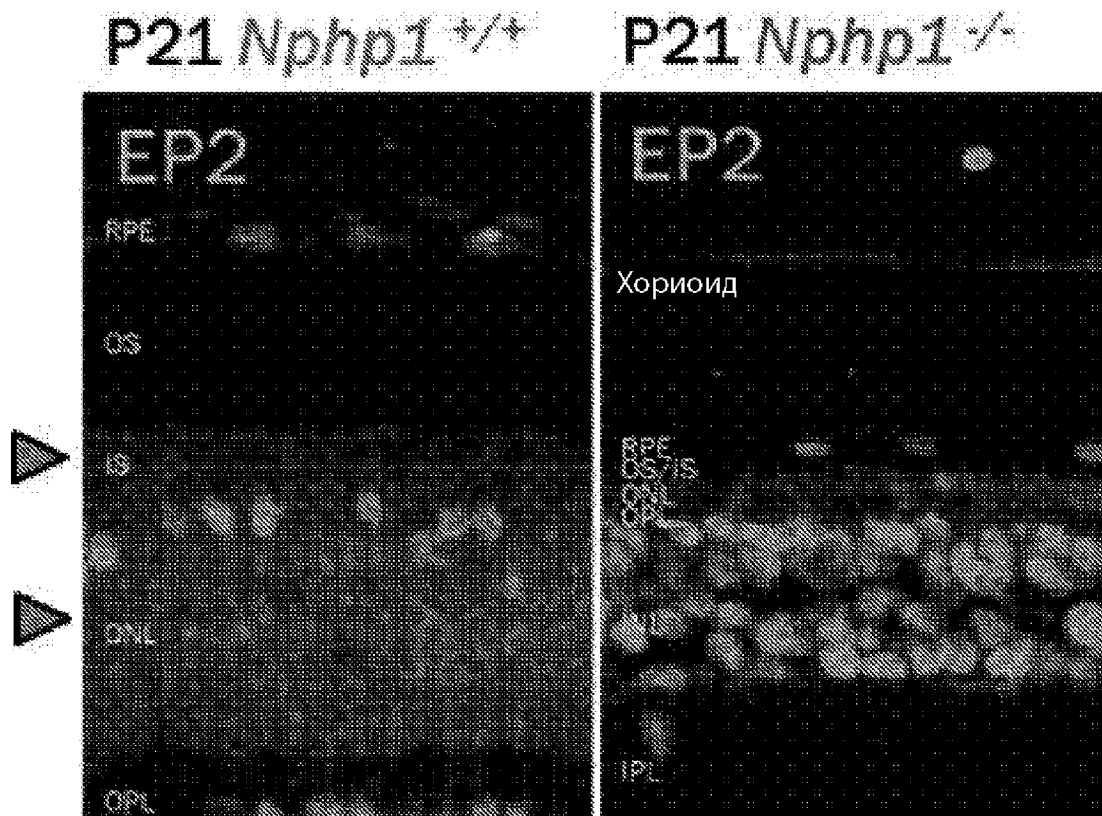
Фиг. 39А



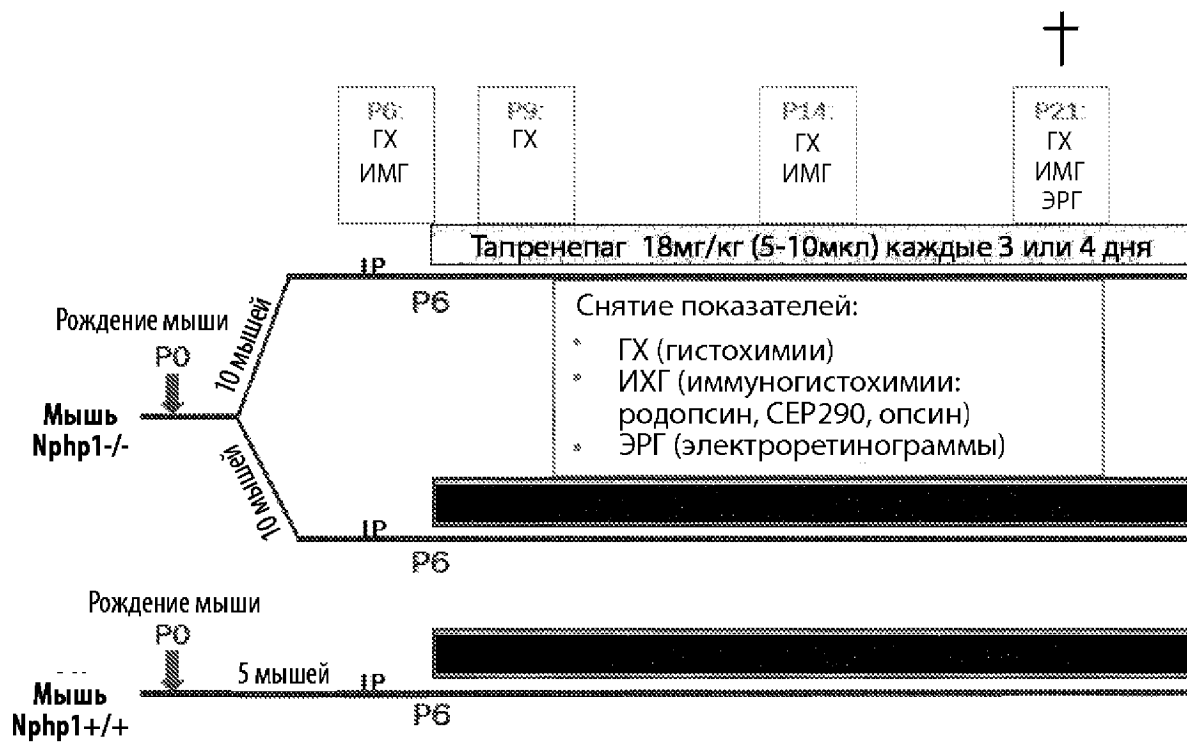
Фиг. 39В



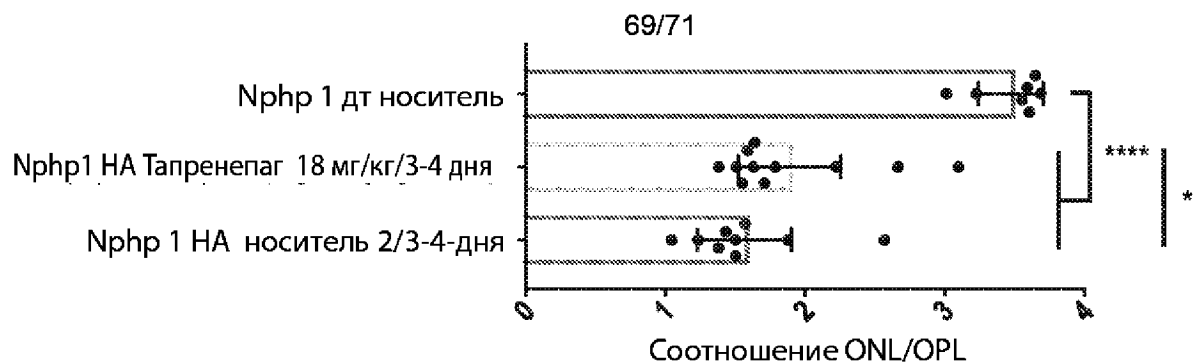
Фиг. 40



Фиг. 41

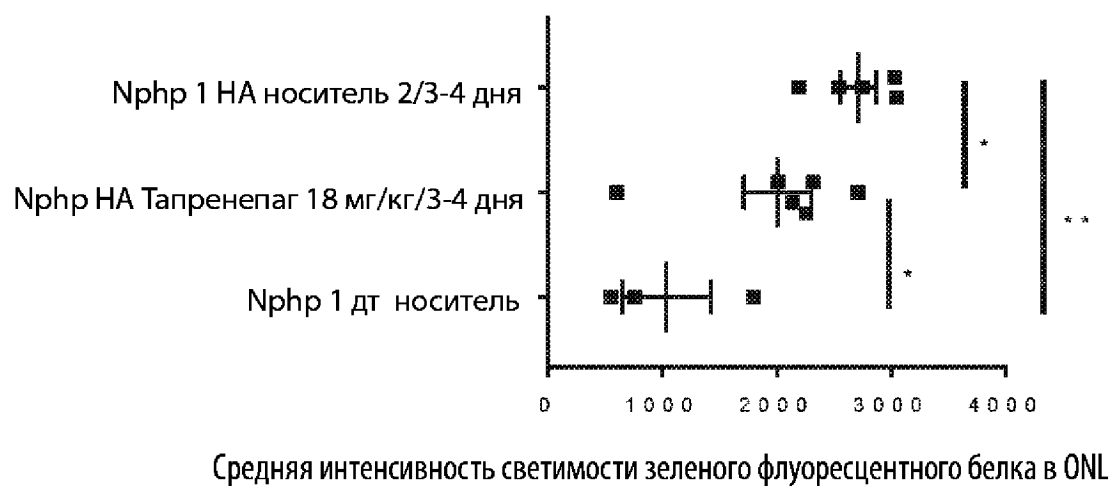


СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ ЗАБОЛЕВАНИЙ, СВЯЗАННЫХ С ЦИЛИОПАТИЯМИ

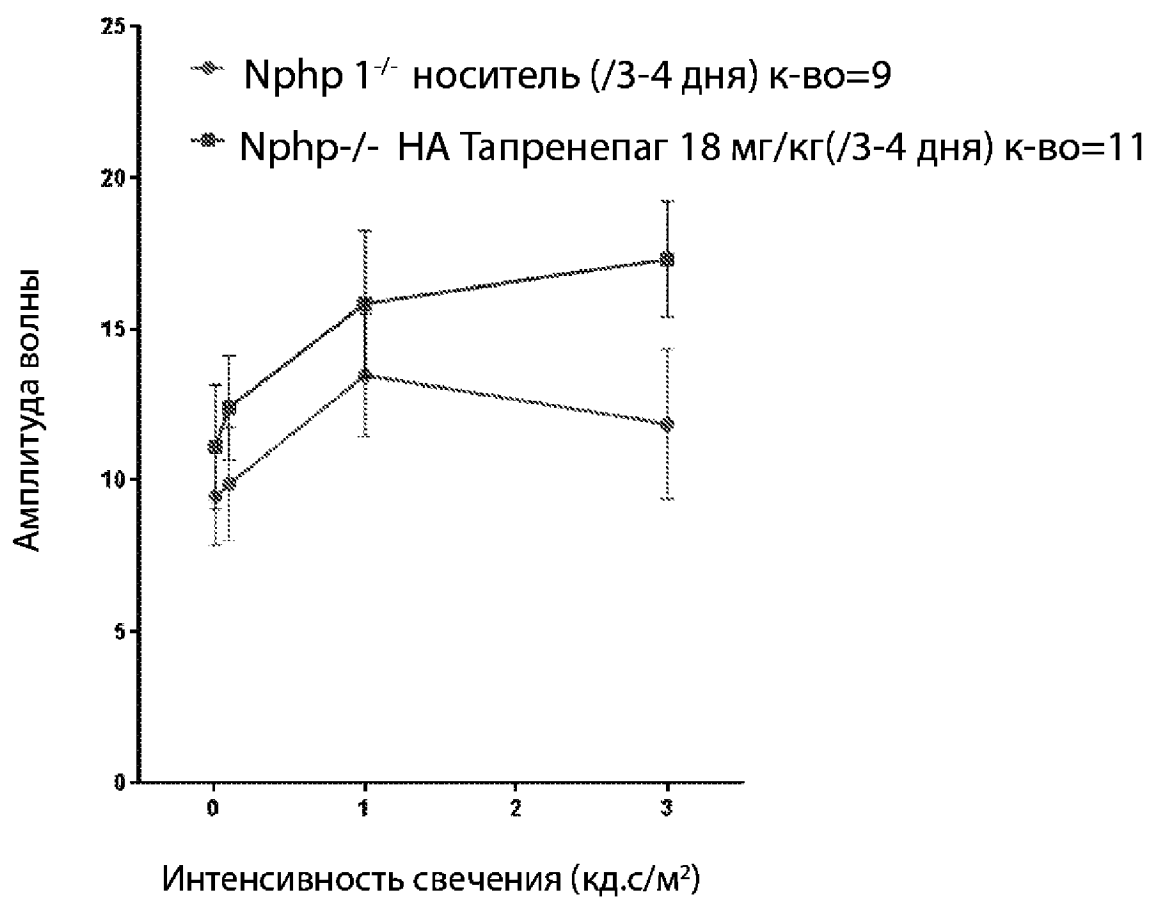


	Дикий тип соллютол 2	nphp1 HA соллютол 2/3- 4 дня	nphp1 HA F00718 мк/кг/3-4 дня
Количество значений	5	8	9
Минимум	3,223	1,045	1,381
Процентиль 25%	3,406	1,272	1,568
Медиана	3,603	1,467	1,639
Процентиль 75%	3,666	1,555	2,004
Максимум	3,684	2,568	3,096
Процентиль 10%	3,223	1,045	1,381
Процентиль 90%	3,684	2,568	3,096
Среднее	3,549	1,53	1,844
Станд. Отклонение	0,1862	0,4525	0,5228
Станд. Ошибка Среднего	0,08327	0,16	0,1743
Ниже ДИ (95%) среднего	3,318	1,152	1,442
Выше ДИ (95%) среднего	3,78	1,908	2,246
Сумма	17,75	12,24	16,6
Тест на нормальность Шапиро-Уилка			
W	0,7417	0,7736	0,743
P-значение	0,0249	0,0148	0,0045
Прошел тест на нормальность (альфа = 0,05)?	Нет	Нет	Нет
Общее P-значение	*	*	**

Фиг. 43



Фиг. 44



Фиг. 45