(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 202193235 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.03.14

(22) Дата подачи заявки
2020.05.22

(51) Int. Cl. ***A61K 45/06*** (2006.01)
A61P 25/04 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)
C12N 15/113 (2010.01)
A61K 31/7088 (2006.01)

(54) РЕГУЛЯТОР ЭКСПРЕССИИ РЕЦЕПТОРА P2X7

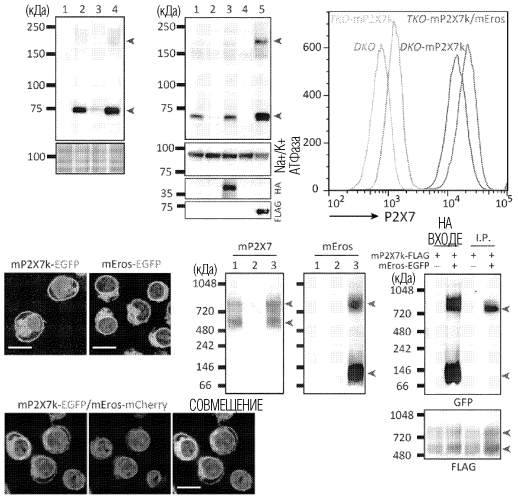
(31) **2019-098049**
(32) **2019.05.24**
(33) **JP**
(86) **PCT/JP2020/020308**
(87) **WO 2020/241499 2020.12.03**

(71) Заявитель:
ОСАКА ЮНИВЕРСИТИ (JP)

(72) Изобретатель:
Нагата Сигеказу, Риоден Юта, Сегава Кацумори (JP)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) Целью изобретения является обеспечение модулятора экспрессии рецептора P2X7. Цели достигают с помощью модулятора экспрессии рецептора P2X7, содержащего по меньшей мере один элемент, выбранный из группы, состоящей из модулятора экспрессии Eros (необходимый для активных форм кислорода) и функционального модулятора Eros.



202193235 A1

202193235 A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-571994EA/018

РЕГУЛЯТОР ЭКСПРЕССИИ РЕЦЕПТОРА P2X7

Область техники

[0001]

Настоящее изобретение относится к модулятору экспрессии рецептора P2X7 и т. п.

Уровень техники

[0002]

Внеклеточный АТФ обычно почти отсутствует в жидкостях организма, но его концентрация увеличивается в очагах воспаления, в микроокружении рака, иммунных синапсах и т. п. Рецептор P2X7 (также обозначаемый в настоящем описании как «P2X7»), который известен как лиганд-управляемый катионный канал для внеклеточного АТФ, представляет собой локализованный на плазматической мембране гомотримерный белок, который обеспечивает прохождение ионов натрия, кальция и калия путем связывания АТФ. P2X7 также известен тем, что обеспечивает прохождение катионов, полученных из органических соединений с молекулярной массой примерно до 900 Да в дополнение к указанным выше ионам металлов во время связывания АТФ, и, как известно, индуцирует скремблирование плазматической мембраны, в котором фосфолипиды мембран транспортируются двунаправленно между внутренним и внешним слоями плазматической мембраны, а также высвобождение (шеддинг) белков плазматической мембраны. Кроме того, известно, что P2X7 вызывает клеточную смерть при сильной стимуляции и воспалительную реакцию в макрофагах, тучных клетках и т. п. (непатентная литература (НПЛ) 1). С другой стороны, также сообщалось, что P2X7 способствует пролиферации клеток и необходим для дифференцировки и поддержания Т-клеток памяти (НПЛ2 - НПЛ3).

Список цитирования

Непатентная литература

[0003]

НПЛ 1: NAT COMMUN 31034 (2012)

НПЛ 2: Nature 559, 264-268 (2018)

НПЛ 3: FASEB J 23 (6), 1685-1693 (2017)

Сущность изобретения

Техническая проблема

[0004]

Целью настоящего изобретения является обеспечение модулятора экспрессии рецептора P2X7.

Решение проблемы

[0005]

В результате масштабных исследований для достижения вышеуказанной цели авторы настоящего изобретения обнаружили, что экспрессию рецептора P2X7 можно

модулировать, используя по меньшей мере один элемент, выбранный из группы, состоящей из модулятора экспрессии Eros (необходимый для активных форм кислорода (essential for reactive oxygen species)) и функционального модулятора Eros. Настоящее изобретение осуществляли путем дальнейшего проведения исследований на основе этого открытия. В частности, настоящее изобретение включает следующие варианты осуществления.

[0006]

Пункт 1. Модулятор экспрессии рецептора P2X7, содержащий по меньшей мере один элемент, выбранный из группы, состоящей из модулятора экспрессии Eros (необходимый для активных форм кислорода) и функционального модулятора Eros.

Пункт 2. Модулятор по пункту 1, который содержит по меньшей мере один элемент, выбранный из группы, состоящей из супрессора экспрессии Eros и супрессора функции Eros, и предназначен для подавления экспрессии рецептора P2X7.

Пункт 3. Модулятор по пункту 2, который содержит супрессор экспрессии Eros.

Пункт 4. Модулятор по пункту 3, где супрессор экспрессии Eros содержит полинуклеотид.

Пункт 5. Модулятор по пункту 3 или 4, где супрессор экспрессии Eros содержит по меньшей мере один элемент, выбранный из группы, состоящей из Eros-специфической siРНК, Eros-специфической miРНК, Eros-специфической антисмысловой нуклеиновой кислоты и их экспрессирующей кассеты, и агента, редактирующего ген Eros.

Пункт 6. Модулятор по любому из пунктов 2-5, который предназначен для предотвращения или улучшения по меньшей мере одного элемента, выбранного из группы, состоящей из воспаления и боли.

Пункт 7. Модулятор по пункту 1, который содержит по меньшей мере один элемент, выбранный из группы, состоящей из промотора экспрессии Eros и промотора функции Eros, и предназначен для стимуляции экспрессии рецептора P2X7.

Пункт 8. Модулятор по пункту 7, который содержит промотор экспрессии Eros.

Пункт 9. Модулятор по пункту 8, где промотор экспрессии Eros содержит экспрессирующую кассету Eros.

Пункт 10. Модулятор по любому из пунктов 7-9, который предназначен для стимуляции дифференцировки и/или поддержания Т-клетки памяти.

Пункт 11. Модулятор по любому из пунктов 1-10, который представляет собой лекарственное средство, реагент или пищевую композицию.

Пункт 12. Т-клетка, в которую введен модулятор по любому из пунктов 7-10.

Пункт 13. Т-клетка по пункту 12, которая способна модулировать экспрессию Eros и/или функцию Eros, так что экспрессия Eros и/или функция Eros временно усиливается.

Пункт 14. Т-клетка по пункту 12 или 13, в которую дополнительно введен модулятор по любому из пунктов 2-5.

Пункт 15. Т-клетка по пункту 14, которая способна модулировать экспрессию Eros и/или функцию Eros таким образом, что экспрессия Eros и/или функция Eros подавляется

после временного усиления экспрессии Eros и/или функции Eros.

Настоящее изобретение также включает следующие варианты осуществления.

[0007]

Пункт 16. Способ модуляции экспрессии рецептора P2X7, включающий введение животному по меньшей мере одного элемента, выбранного из группы, состоящей из модулятора экспрессии Eros и функционального модулятора Eros.

Пункт 17. Композиция для применения для модуляции экспрессии рецептора P2X7 в организме животного, причем композиция содержит по меньшей мере один элемент, выбранный из группы, состоящей из модулятора экспрессии Eros и функционального модулятора Eros.

Пункт 18. Применение по меньшей мере одного элемента, выбранного из группы, состоящей из модулятора экспрессии Eros и функционального модулятора Eros для продукции модулятора экспрессии рецептора P2X7.

Пункт 19. Способ модуляции экспрессии рецептора P2X7 in vitro, включающий контактирование клетки по меньшей мере с одним элементом, выбранным из группы, состоящей из модулятора экспрессии Eros и функционального модулятора Eros.

Пункт 20. Способ ингибирования IL-1β, включающий подавление экспрессии Eros и/или функции Eros.

Полезные эффекты изобретения

[0008]

Настоящее изобретение обеспечивает модулятор экспрессии рецептора P2X7.

Краткое описание чертежей

[0009]

На Фиг. 1 показаны результаты исследования P2X7-опосредованного TMEM16F-независимого экспонирования PtdSer в клетках WR19L. (A) Ca^{2+} не требуется для Bz-АТФ-индуцированного экспонирования PtdSer в клетках WR19L. (B) TMEM16F-зависимое или P2X7-зависимое экспонирование PtdSer в клетках WR19L.

На Фиг. 2 показаны результаты CRISPR-скрининга генов на наличие генов, поддерживающих P2X7-опосредованное экспонирование PtdSer. (A) Преобладающая экспрессия изоформы P2X7k в клетках WR19L. На нижней панели схематично показана структура гена mP2X7 с положениями праймеров. (B) mP2X7k-опосредованное экспонирование PtdSer. Показаны профили окрашивания в SYTOX Blue-отрицательной популяции. (C) Результаты идентификации генов, которые поддерживают mP2X7-опосредованное экспонирование PtdSer. На верхней панели показана процедура скрининга CRISPR. На средней панели показан профиль FACS первой сортировки, в котором выявлена популяция, отсортированная для следующей стадии. На нижней панели показаны профили окрашивания аннексином V в PI-отрицательной популяции.

На Фиг. 3 показана важная роль Eros для P2X7-опосредованной сигнальной трансдукции. (A) Влияние mEros на mP2X7k-опосредованное экспонирование PtdSer. (B и C) Влияние mEros на mP2X7k-опосредованную интернализацию PtdCho и YO-PRO-1. (D)

Влияние mEros на mP2X7k-опосредованный приток Ca^{2+}. (E) Влияние hEros на АТФ-индуцированную секрецию IL-1β в клетках THP-1. (F) Потребность Eros для АТФ-индуцированной секреции IL-1β в макрофагах, происходящих из костного мозга мыши (BMDM).

На Фиг. 4 показана потребность Eros для экспрессии P2X7 на клеточной поверхности. (A) Влияние mEros на экспрессию экзогенно введенного mP2X7k в клетках WR19L. (B) Влияние hEros на экспрессию эндогенного P2X7 в клетках THP-1. (C) Влияние mEros на экспрессию mP2X7k на клеточной поверхности в клетках WR19L. (D и E) Субклеточное распределение mP2X7k и mEros. (F) Результаты анализа BN-PAGE для mP2X7 и mEros. (G) Результаты коиммунопреципитации mEros и mP2X7k.

Описание вариантов осуществления

[0010]

1. Определение

Термины «содержащий» в контексте настоящего описания включают понятия «содержащий», «состоящий по существу из» и «состоящий из».

[0011]

«Идентичность» аминокислотных последовательностей относится к степени согласованности между двумя или более аминокислотными последовательностями, которые можно сравнивать друг с другом. Таким образом, чем выше согласованность между двумя аминокислотными последовательностями, тем выше идентичность или сходство между этими последовательностями. Уровни идентичности аминокислотной последовательности определяют с использованием параметров по умолчанию, используя, например, FASTA, который является инструментом анализа последовательностей.

Альтернативно, уровни идентичности могут быть определены с использованием алгоритма BLAST, разработанного Karlin и Altschul (KarlinS, Altschul SF, «Methods for assessing the statistical significance of molecular sequence features by using general scoring schemes», Proc Natl Acad Sci USA, 87:2264-2268 (1990); KarlinS, Altschul SF, «Applications and statistics for multiple high-scoring segments in molecular sequences», Proc Natl Acad Sci USA, 90:5873-7 (1993)). На основе алгоритма BLAST была разработана программа под названием «BLASTX». Конкретные методы этих методов анализа известны, и можно сделать ссылку на веб-сайт Национального центра биотехнологической информации (NCBI) (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/). «Идентичность» последовательностей оснований также определяется, как описано выше.

[0012]

В настоящем описании «консервативная замена» означает, что аминокислотный остаток заменен аминокислотным остатком, имеющим аналогичную боковую цепь. Примеры консервативных замен включают замену между аминокислотными остатками, имеющими основную боковую цепь, такими как лизин, аргинин и гистидин. Другие консервативные замены включают замену между аминокислотными остатками, имеющими кислую боковую цепь, такими как аспарагиновая кислота и глутаминовая

кислота; замену между аминокислотными остатками, имеющими незаряженную полярную боковую цепь, такими как глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин и цистеин; замену между аминокислотными остатками, имеющими неполярную боковую цепь, такими как аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин и триптофан; замену между аминокислотными остатками, имеющими β-разветвленную боковую цепь, такими как треонин, валин и изолейцин; и замену между аминокислотными остатками, имеющими ароматическую боковую цепь, такими как тирозин, фенилаланин, триптофан и гистидин.

[0013]

В настоящем описании термины «нуклеиновая кислота» и «полинуклеотид» особо не ограничиваются и охватывают как их природные, так и искусственные варианты. В настоящем описании термины «нуклеиновая кислота» и «полинуклеотид» особо не ограничиваются и охватывают как их природные, так и искусственные варианты. Для предотвращения деградации гидролазами, такими как нуклеазы, фосфатный остаток (фосфат) каждого нуклеотида может быть заменен химически модифицированным фосфатным остатком, таким как фосфоротиоат (PS), метилфосфонат или фосфородитионат. Гидроксильная группа в положении 2 сахара (рибозы) каждого рибонуклеотида может быть заменена на -OR (R представляет собой, например, CH_3(2'-O-Me), $CH_2CH_2OCH_3$(2'-O-MOE), $CH_2CH_2NHC(NH)NH_2$, $CH_2CONHCH_3$ или CH_2CH_2CN). Более того, основная часть (пиримидин, пурин) может быть химически модифицирована; например, метильная группа или катионная функциональная группа может быть введена в положение 5 пиримидинового основания, или карбонильная группа в положении 2 может быть заменена на тиокарбонильную группу. Кроме того, фосфатный фрагмент или гидроксильный фрагмент можно модифицировать, например, биотином, аминогруппой, группой низшего алкиламина или ацетильной группой. Однако химическая модификация этим не ограничивается. Также можно использовать BNA (LNA) и т. п., в которых конформация сахарного фрагмента иммобилизована в N-форме за счет связывания 2'-кислорода и 4'-углерода в сахарном фрагменте нуклеотида.

[0014]

2. Модулятор экспрессии рецептора P2X7

В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к модулятору экспрессии рецептора P2X7, содержащему по меньшей мере один элемент, выбранный из группы, состоящей из модулятора экспрессии Eros (необходимый для активных форм кислорода) и функционального модулятора Eros (также называемого «модулятором» по настоящему изобретению» в настоящем описании). Это описано ниже.

[0015]

2-1. Мишень модуляции (Eros)

Белок Eros и мРНК Eros, экспрессия или функция которых подлежит модуляции, продуцируются из гена Eros (также называемого CYBC1: шаперон 1 цитохрома b-245) и экспрессируются в организмах или клетках, в которых экспрессия рецептора P2X7

подлежит модулЯции. Таким образом, белок Eros и мРНК Eros, подлежащие подавлению, различаются в зависимости от вида организма-мишени. Примеры видов организмов включают, но не ограничиваются ими, животных, включая различных млекопитающих, таких как человек, обезьяны, мыши, крысы, собаки, кошки, кролики, свиньи, лошади, коровы, овцы, козы и олени.

[0016]

Известны аминокислотные последовательности белков Eros, происходящие из различных видов организмов, и последовательности оснований мРНК Eros, происходящие из различных видов организмов. В частности, примеры белка Eros человека включают белок, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12 (эталонная последовательность NCBI: NP_001093877.1), примеры белка Eros мыши включают белок, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13 (эталонная последовательность NCBI: NP_659081.1), примеры мРНК Eros человека включают мРНК, содержащую последовательность оснований SEQ ID NO: 14 (эталонная последовательность NCBI: NM_001100407.2), и примеры мРНК Eros мыши включают мРНК, содержащую последовательность оснований SEQ ID NO: 15 (эталонная последовательность NCBI: NM_144832.2). Белок Eros и мРНК Eros также могут охватывать варианты сплайсинга вышеперечисленных.

[0017]

Белок Eros, подлежащий модуляции, может иметь аминокислотные мутации, такие как замена, делеция, добавление и вставка, при условии, что он обладает своей исходной активностью, т. е. активностью молекулярного шаперона. Например, мутация предпочтительно представляет собой замену и более предпочтительно консервативную замену с точки зрения меньшей подверженности потере активности.

[0018]

мРНК Eros, подлежащая модуляции, может иметь основные мутации, такие как замена, делеция, добавление и вставка, при условии, что белок, транслируемый с мРНК, обладает своей исходной активностью, т. е. активностью молекулярного шаперона. Мутация предпочтительно представляет собой мутацию, которая не вызывает аминокислотную замену в белке, транслируемом с мРНК, или мутацию, которая вызывает консервативную аминокислотную замену в белке, транслируемом с мРНК.

[0019]

Предпочтительные конкретные примеры белка Eros, подлежащего модуляции, включают по меньшей мере один элемент, выбранный из группы, состоящей из белка, описанного в (a) ниже, и белка, описанного в (b) ниже:

(a) белок, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12 или 13; и

(b) белок, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую 85% или более идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 12 или 13, и обладающий активностью молекулярного шаперона.

[0020]

В приведенном выше пункте (b) идентичность более предпочтительно составляет 90% или более, даже более предпочтительно 95% или более и еще более предпочтительно 98% или более.

[0021]

Примеры белка, описанного в пункте (b) выше, включают следующее:

(b') белок, содержащий аминокислотную последовательность с заменой, делецией, добавлением или вставкой одной или более аминокислот в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 12 или 13, и обладающий активностью молекулярного шаперона.

[0022]

В приведенном выше пункте (b') количество «дополнительных аминокислот» составляет, например, 2-20, предпочтительно 2-10, более предпочтительно 2-5 и еще более предпочтительно 2-3.

[0023]

Предпочтительные конкретные примеры мРНК Eros, подлежащей модуляции, включают по меньшей мере один элемент, выбранный из группы, состоящей из мРНК, описанной в (c) ниже, и мРНК, описанной в (d) ниже:

(c) мРНК, содержащая последовательность оснований SEQ ID NO: 14 или 15; и

(d) мРНК, содержащая последовательность оснований, имеющую 85% или более идентичности с последовательностью оснований SEQ ID NO: 14 или 15, и кодирующую белок, обладающий активностью молекулярного шаперона.

[0024]

В приведенном выше пункте (d) идентичность составляет более предпочтительно 90% или более, еще более предпочтительно 95% или более и еще более предпочтительно 98% или более.

[0025]

Примеры мРНК, описанной в пункте (d) выше, включают следующее:

(d') мРНК, содержащая последовательность оснований с заменой, делецией, добавлением или вставкой одного или более оснований в последовательность оснований SEQ ID NO: 14 или 15, и кодирующая белок, обладающий активностью молекулярного шаперона.

[0026]

В приведенном выше (d') количество «дополнительных оснований» составляет, например, 2-200, предпочтительно 2-100, более предпочтительно 2-50 и еще более предпочтительно 2-10.

[0027]

2-2. Модулятор экспрессии Eros

Модулятор экспрессии Eros особо не ограничивается при условии, что он может модулировать экспрессию белка Eros или мРНК Eros, экспрессируемых в организме или

клетке, в которых экспрессия рецептора P2X7 подлежит модуляции. Модулятор экспрессии Eros включает, например, супрессоры экспрессии Eros и промоторы экспрессии Eros. Модуляторы экспрессии Eros можно использовать по отдельности или в комбинации двух или более.

[0028]

2-2-1. Супрессор экспрессии Eros

Супрессор экспрессии Eros особо не ограничивается при условии, что он может подавлять уровень экспрессии белка Eros, мРНК Eros или т. п. Примеры включают Eros-специфичные короткие интерферирующие РНК (siРНК), Eros-специфические микроРНК (miРНК), Eros-специфические антисмысловые нуклеиновые кислоты и их экспрессирующие векторы;, Eros-специфические рибозимы; агенты, редактирующие ген Eros, используемые в системе CRISPR/Cas; и тому подобное.

[0029]

Подавление экспрессии означает, что уровни экспрессии белка Eros, мРНК Eros и т. п. снижаются, например, до 1/2, 1/3, 1/5, 1/10, 1/20, 1/30, 1/50, 1/100, 1/200, 1/300, 1/500, 1/1000 или 1/10000 или менее, и включает снижение этих уровней экспрессии до 0.

[0030]

2-2-1-1. siРНК, miРНК, антисмысловая нуклеиновая кислота и рибозим

Eros-специфическая siРНК особо ничем не ограничена, при условии что она представляет собой двухцепочечную молекулу РНК, которая специфически подавляет экспрессию гена, кодирующего Eros. В одном варианте осуществления siРНК предпочтительно имеет длину, например, 18 оснований или более, 19 оснований или более, 20 оснований или более, или 21 основание или более. siРНК также предпочтительно имеет длину, например, 25 оснований или менее, 24 основания или менее, 23 основания или менее, или 22 основания или менее. Предполагается, что верхний и нижний пределы длины упомянутой здесь siРНК комбинируются произвольно. Например, предусмотрены следующие комбинации: длина, в которой нижний предел составляет 18 оснований, а верхний предел 25 оснований, 24 основания, 23 основания или 22 основания; длина, нижний предел которой составляет 19 оснований, а верхний предел 25 оснований, 24 основания, 23 основания или 22 основания; длина, нижний предел которой составляет 20 оснований, а верхний предел 25 оснований, 24 основания, 23 основания или 22 основания; и длина, в которой нижний предел составляет 21 основание, а верхний предел составляет 25 оснований, 24 основания, 23 основания или 22 основания.

[0031]

siРНК может представлять собой shРНК (короткая шпилечная РНК). shРНК можно сконструировать так, чтобы часть ее образовывала структуру стебель-петля. Например, если предположить, что последовательность определенной области обозначена как последовательность «a», а цепь, комплементарная последовательности «a», обозначена как последовательность «b», то shРНК может быть сконструирована так, что будет содержать последовательность «a», спейсер и последовательность «b» в этом порядке на

одной цепи РНК и иметь общую длину 45-60 оснований. Последовательность «а» представляет собой последовательность частичной области последовательности оснований, кодирующей Eros-мишень. Область-мишень особо не ограничивается, и в качестве кандидата можно использовать любую область. Длина последовательности а составляет 19-25 оснований и предпочтительно 19-21 оснований.

[0032]

Eros-специфическая miРНК может иметь дополнительные основания на 5'- или 3'-конце. Длина дополнительных оснований обычно составляет 2-4 основания. Дополнительные основания могут быть ДНК или РНК. Когда используется ДНК, стабильность нуклеиновой кислоты может улучшиться. Примеры последовательностей дополнительных оснований включают, но не ограничиваются ими, такие последовательности, как ug-3', uu-3', tg-3', tt-3', ggg-3', guuu-3', gttt-3', ttttt-3' и uuuuu-3'.

[0033]

siРНК может иметь выступающую последовательность на 3'-конце. В частности, например, может быть добавлен dTdT (где dT представляет собой дезокситимидин). siРНК может иметь тупой конец без добавления конца. В siРНК количество оснований в смысловой цепи может отличаться от количества оснований в антисмысловой цепи. Например, siРНК может быть асимметричной интерферирующей РНК (aiРНК), в которой антисмысловая цепь имеет выступающие последовательности на 3'-конце и 5'-конце. Типичная aiРНК имеет антисмысловую цепь, состоящую из 21 основания, и смысловую цепь, состоящую из 15 оснований, с выступом из 3 оснований на каждом конце антисмысловой цепи.

[0034]

Положение последовательности-мишени для Eros-специфической siРНК особо не ограничивается. В одном варианте осуществления желательно выбрать последовательность-мишень из области, отличной от области между 5'-UTR и примерно 50 оснований от инициирующего кодона, и отличной от области 3'-UTR. Предпочтительно, чтобы отобранные кандидаты последовательности-мишени проверялись на гомологию с непрерывной последовательностью из 16-17 оснований в мРНК, отличной от мишени, с использованием программного обеспечения для поиска гомологии, такого как BLAST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/), чтобы подтвердить специфичность выбранных последовательностей-мишеней. Для последовательности-мишени, специфичность которой подтверждена, двухцепочечная РНК, состоящая из смысловой цепи, имеющей выступающий 3'-конец TT или UU в 19-21 основаниях после AA (или NA), и антисмысловой цепи, имеющей последовательность комплементарную 19-21 основанию и выступающий 3'-конец TT или UU, может быть сконструированы в виде siРНК. Более того, shРНК, которая является предшественником siРНК, может быть сконструирована путем подходящего выбора любой линкерной последовательности (например, примерно 5-25 оснований), которые могут образовывать петлевую структуру и затем соединять указанную выше смысловую цепь и антисмысловую цепь через

линкерную последовательность.

[0035]

Последовательность siРНК и/или shРНК можно искать с помощью поискового программного обеспечения, которое бесплатно предоставляется на различных веб-сайтах. Примеры таких сайтов включают следующее:

Целевой Поиск siРНК (http://www.ambion.com/jp/techlib/misc/siRNA_finder.html) предоставлено Ambion; и

инструмент дизайна вставки для pSilencer (зарегистрированная торговая марка); Expression Vector (http://www.ambion.com/jp/techlib/misc/psilencer_converter.html) предоставлено Ambion; и

GeneSeer (http://codex.cshl.edu/scripts/newsearchhairpin.cgi) предоставлено RNAi Codex.

[0036]

siРНК может быть получена путем синтеза смысловой цепи и антисмысловой цепи последовательности-мишени на мРНК с использованием автоматического синтезатора ДНК/РНК и денатурации цепей в соответствующем буфере для отжига примерно при 90-95°С в течение примерно 1 минуты с последующим отжигом при температуре от 30 до 70°С в течение от 1 до 8 часов. siРНК также может быть получена путем синтеза shРНК, которая является предшественником siРНК, и расщепления shРНК с помощью белка расщепления РНК Dicer. В качестве таковой можно приобрести и использовать Eros-специфическую siРНК, например, SASI_Hs01_00242324, SASI_Hs02_00307980 или SASI_Mm01_00134930, которые продаются компанией Merck.

[0037]

Eros-специфическая miРНК может быть любой miРНК, если она ингибирует трансляцию гена, кодирующего Eros. Например, miРНК может ингибировать трансляцию гена путем спаривания с 3'-нетранслируемой областью (UTR) мишени, а не расщепления мРНК-мишени, как в siРНК. miРНК может представлять собой pri-miРНК (первичная miРНК), pre-miРНК (предшественни miРНК) или зрелая miРНК. Длина miРНК особо не ограничивается. Длина pri-miРНК обычно составляет от нескольких сотен до нескольких тысяч оснований, длина pre-miРНК обычно составляет от 50 до 80 оснований, а длина зрелой miРНК обычно составляет от 18 до 30 оснований. В одном варианте осуществления Eros-специфическая miРНК предпочтительно представляет собой pre-miРНК или зрелую miРНК, а более предпочтительно зрелую miРНК. Eros-специфическая miРНК может быть синтезирована известным методом или может быть куплена у компании, которая предоставляет синтетическую РНК.

[0038]

Eros-специфическая антисмысловая нуклеиновая кислота содержит последовательность оснований, комплементарную или по существу комплементарную последовательности оснований мРНК гена, кодирующего Eros, или его части, и имеет функцию подавления синтеза белка Eros путем специфического связывания с мРНК с

образованием стабильного дуплекса. Антисмысловая нуклеиновая кислота может представлять собой ДНК, РНК или химерную ДНК/РНК. Когда антисмысловая нуклеиновая кислота представляет собой ДНК, гибрид РНК:ДНК, образованный РНК-мишенью и антисмысловой ДНК, распознается эндогенной рибонуклеазой Н (РНКаза Н), вызывая селективную деградацию РНК-мишени. Следовательно, в случае антисмысловой ДНК, которая управляет деградацией РНКазой Н, последовательность-мишень может быть не только последовательностью в мРНК, но также последовательностью интронной области в раннем продукте транскрипции гена Eros. Последовательность интрона может быть определена путем сравнения последовательности генома с последовательностью оснований кДНК гена Eros с использованием программы поиска гомологии, такой как BLAST или FASTA.

[0039]

Длина области-мишени для Eros-специфической антисмысловой нуклеиновой кислоты не ограничивается при условии, что трансляция в белок Eros ингибируется в результате гибридизации антисмысловой нуклеиновой кислоты. Область-мишень для Eros-специфической антисмысловой нуклеиновой кислоты может быть полной или частичной последовательностью мРНК, кодирующей Eros. Принимая во внимание легкость синтеза, антигенность, переносимость в клетки и другие вопросы, олигонуклеотид из примерно 10-40 оснований, в частности, примерно 15-30 оснований, является предпочтительным, но это не следует рассматривать как ограничение. Более конкретно, например, 5'-концевая петля шпилька, 5'-концевая нетранслируемая область, кодон инициации трансляции, кодирующая область белка, кодон терминации трансляции ORF, 3'-концевая нетранслируемая область, 3'-концевая область палиндрома или 3'-концевая петля шпилька гена Eros может быть выбрана в качестве предпочтительной области-мишени для антисмысловой нуклеиновой кислоты; однако область-мишень этим не ограничивается.

[0040]

Eros-специфическая антисмысловая нуклеиновая кислота может быть такой, которая способна не только гибридизоваться с мРНК или ранним продуктом транскрипции гена Eros для ингибирования трансляции в белок, но также связываться с геном, который представляет собой двухцепочечную ДНК, с образованием триплекса, тем самым подавляя транскрипцию РНК (антигена).

[0041]

Eros-специфическая siРНК, Eros-специфическая miРНК, Eros-специфическая антисмысловая нуклеиновая кислота и т. п. могут быть получены путем определения последовательности-мишени мРНК или раннего продукта транскрипции на основе последовательности кДНК или последовательности геномной ДНК гена Eros и синтез комплементарной ей последовательности с использованием коммерчески доступного автоматического синтезатора ДНК/РНК. Все антисмысловые нуклеиновые кислоты, содержащие различные модификации, также можно химически синтезировать известными

методами.

[0042]

Экспрессирующая кассета Eros-специфической siРНК, Eros-специфической miРНК или Eros-специфической антисмысловой нуклеиновой кислоты особо не ограничивается, при условии, что это полинуклеотид, в котором Eros-специфическая киРК, Eros-специфическая miРНК или Eros-специфическая антисмысловая нуклеиновая кислота включена в экспрессируемом состоянии. Обычно экспрессирующая кассета включает полинуклеотид, содержащий промоторную последовательность и кодирующую последовательность для Eros-специфической siРНК, Eros-специфической miРНК или Eros-специфической антисмысловой нуклеиновой кислоты (и дополнительно содержащий, необязательно, сигнальную последовательность терминации транскрипции), и необязательно содержит одну или более других последовательностей. Промотор особо не ограничивается, и примеры включают промоторы РНК-полимеразы II (polII), такие как промотор CMV, промотор EF-1α, промотор SV40, промотор MSCV, промотор hTERT, промотор β-актина и промотор CAG; промоторы РНК-полимеразы III (polIII), такие как промоторы U6-snРНК мыши и человека, промотор H1 РНК РНКазы P человека и промотор тРНК валина человека; и тому подобное. Среди них промоторы polIII предпочтительны с точки зрения достижения точной транскрипции короткой РНК. Также можно использовать различные промоторы, индуцируемые агентами. Другие последовательности особо не ограничиваются, и можно использовать различные известные последовательности, которые могут содержаться в экспрессирующих векторах. Примеры таких последовательностей включают последовательность начала репликации, ген устойчивости к лекарственному средству и т. п. Примеры типа гена устойчивости к лекарственному средству и типа вектора включают описанные выше.

[0043]

Другим примером супрессора экспрессии Eros является Eros-специфический рибозим или тому подобное. Хотя «рибозим» относится в узком смысле к РНК, обладающей ферментативной активностью по расщеплению нуклеиновых кислот, термин «рибозим», используемый в настоящем описании, также охватывает ДНК, если она обладает специфической для последовательности активностью расщепления нуклеиновых кислот. Самая универсальная нуклеиновая кислота рибозима представляет собой самосплайсирующуюся РНК, обнаруженную в инфекционной РНК, такой как вироид или вирусоид, и известны такие типы, как «hammerhead», тип шпильки и тому подобное. Тип «hammerhead» проявляет ферментативную активность с длиной примерно 40 оснований и может специфически расщеплять только мРНК-мишень, делая несколько оснований на обоих концах, прилегающих к части структуры «hammerhead» (всего примерно 10 оснований), комплементарной желаемому сайту расщепления мРНК. Этот тип нуклеиновой кислоты рибозима использует только РНК в качестве субстрата и, таким образом, имеет то преимущество, что он не атакует геномную ДНК. Когда мРНК гена Eros сама по себе имеет двухцепочечную структуру, может быть сделано так, чтобы

последовательность-мишень являлась одноцепочечной, с использованием гибридного рибозима, в котором мотив РНК происходит из вирусной нуклеиновой кислоты и способен специфически связываться с РНК-хеликазой (Proc. Natl. Acad. Sci. USA,98 (10): 5572-5577 (2001)). Кроме того, когда рибозим используется в форме экспрессирующего вектора, содержащего ДНК, кодирующую рибозим, рибозим может быть гибридным рибозимом, с которым последовательность, полученная путем модификации тРНК, дополнительно связана, чтобы способствовать переносу продукта транскрипции в цитоплазму (Nucleic Acids Res., 29 (13): 2780-2788 (2001)).

[0044]

2-2-1-2. Агент, редактирующий ген

Агент, редактирующий ген Eros, особо не ограничивается при условии, что экспрессия гена Eros может подавляться системой нуклеаз, специфичной для последовательности-мишени (например, системой CRISPR/Cas). Экспрессия гена Eros может подавляться, например, нарушением гена Eros или подавлением активности промотора гена Eros путем модификации промотора.

[0045]

Когда, например, используется система CRISPR/Cas, вектор (вектор для редактирования гена Eros), содержащий экспрессирующую кассету направляющей РНК (guide RNA), которая нацелена на ген Eros или его промотор, и экспрессирующая кассета белка Cas обычно может использоваться в качестве агента, редактирующего ген Eros; однако агент, редактирующий ген Eros, этим не ограничивается. В дополнение к этому типичному примеру, например, комбинация вектора, содержащего направляющую РНК, нацеленную на ген Eros или его промотор, и/или его экспрессирующую кассету, и вектора, содержащего экспрессирующую кассету белка Cas и/или его экспрессирующую кассету, может использоваться как агент, редактирующий ген Eros.

[0046]

Экспрессирующая кассета направляющей РНК особо не ограничивается при условии, что это полинуклеотид, используемый с целью экспрессии направляющей РНК в организме, подлежащему метаболическому улучшению. Типичные примеры экспрессирующей кассеты включают полинуклеотид, содержащий промотор и кодирующую последовательность для части или всей направляющей РНК, находящейся под контролем промотора. Выражение «помещена под контроль промотора» означает, другими словами, что кодирующая последовательность для направляющей РНК помещена так, что транскрипция последовательности контролируется промотором. В конкретном варианте осуществления, например, кодирующая последовательность для направляющей РНК расположена непосредственно после 3’-области промотора (например, количество пар оснований (п. о.) между основанием на 3'-конце промотора и основанием на 5'-конце кодирующей последовательности для направляющей РНК составляет, например, 100 п. о. или меньше, и предпочтительно 50 п. о. или меньше).

[0047]

Промотор экспрессирующей кассеты направляющей РНК особо не ограничивается. Можно использовать промоторы Pol II, но промоторы pol III предпочтительнее с точки зрения достижения более точной транскрипции относительно короткой РНК. Примеры используемых промоторов pol III включают, но не ограничиваются ими, промоторы U6-snРНК мыши и человека, промотор РНК H1-РНКазы P человека, промотор тРНК валина человека и т. п. Также можно использовать различные промоторы, индуцируемые агентами.

[0048]

Кодирующая последовательность для направляющей РНК особо не ограничивается, если она является последовательностью оснований, кодирующей направляющую РНК.

[0049]

Направляющая РНК особо не ограничивается при условии, что она используется в системе CRISPR/Cas. Например, могут использоваться различные направляющие РНК, способные связываться с сайтом-мишенью геномной ДНК (например, геном Eros или его промотором) и с белком Cas для направления белка Cas к сайту-мишени геномной ДНК.

[0050]

Выражение «сайт-мишень» в контексте настоящего описания означает сайт на геномной ДНК, который состоит из цепи ДНК (цепи-мишени), состоящей из последовательности PAM (смежный мотив протоспейсера) и последовательности длиной примерно 17-30 оснований (предпочтительно длиной 18-25 оснований, более предпочтительно, длиной 19-22 основания и особенно предпочтительно длиной до 20 оснований), смежной с его 5'-областью; и его комплементарную цепь ДНК (цепь, не являющаяся мишенью).

[0051]

Последовательность PAM варьируется в зависимости от типа используемого белка Cas. Например, последовательность PAM, соответствующая белку Cas9, полученному из S. pyogenes (тип II) представляет собой 5'-NGG, последовательность PAM, соответствующая белку Cas9, полученному из S. solfataricus (тип I-A1), представляет собой 5'-CCN, последовательность PAM соответствующая белку Cas9, полученному из S. solfataricus (тип I-A2), представляет собой 5'-TCN, последовательность PAM, соответствующая белку Cas9, полученному из H. walsbyl (тип IB), представляет собой 5'-TTC, последовательность PAM, соответствующая белку Cas9, полученному из E. coli (тип IE), представляет собой 5'-AWG, последовательность PAM, соответствующая белку Cas9, полученному из E. coli (тип IF), представляет собой 5'-CC, последовательность PAM, соответствующая белку Cas9, полученному из P. aeruginosa (тип IF), представляет собой 5'-CC, последовательность PAM, соответствующая белку Cas9, полученному из S. thermophilus (тип II-A), представляет собой 5'-NNAGAA, последовательность PAM, соответствующая белку Cas9, полученному из S. agalactiae (тип II-A), представляет собой 5'-NGG, последовательность PAM, соответствующая белку Cas9, полученному из S.

aureus, представляет собой 5'-NGRRT или 5'-NGRRN, последовательность PAM, соответствующая белку Cas9, полученному из N. meningitidis, представляет собой 5'-NNNNGATT, а последовательность PAM, соответствующая белку Cas9, полученному из T. denticola, представляет собой 5'-NAAAAC.

[0052]

Направляющая РНК имеет последовательность, участвующую в связывании с сайтом-мишенью геномной ДНК (иногда называемую «последовательностью crРНК (CRISPR РНК)»). Когда последовательность crРНК комплементарно связывается (предпочтительно комплементарным и специфическим образом) с последовательностью нецелевой цепи, за исключением последовательности, комплементарной последовательности PAM, направляющая РНК может связываться с сайтом-мишенью геномной ДНК.

[0053]

Связывание «комплементарно» включает не только случай связывания на основе полной комплементарности (A и T, и G и C), но также случай связывания на основе комплементарности до степени, которая позволяет гибридизацию в жестких условиях. Жесткие условия могут быть определены на основе температуры плавления (Tm) нуклеиновой кислоты, связывающей комплекс или зонд, как указано в Berger and Kimmel (1987, Guide to Molecular Cloning Techniques Methods in Enzymology, Vol. 152, Academic Press, San Diego CA). Например, условия отмывки после гибридизации обычно включают примерно «1×SSC, 0, 1% SDS, 37°C». Предпочтительно, чтобы состояние гибридизации сохранялось даже при выполнении отмывки в таких условиях. Примеры условий отмывки также включают, но не ограничиваются ими, более жесткие условия гибридизации примерно «0,5×SSC, 0,1% SDS, 42°C» и даже более жесткие условия гибридизации примерно «0,1×SSC, 0,1% SDS, 65 °C».

[0054]

В частности, в последовательности crРНК последовательность, которая связывается с последовательностью-мишенью, имеет, например, 90% или более, предпочтительно 95% или более, более предпочтительно 98% или более, еще более предпочтительно 99% или более и особенно предпочтительно 100% идентичности с цепью-мишенью. Утверждается, что в последовательности crРНК 12 оснований в 3'-области последовательности, которая связывается с последовательностью-мишенью, важны для связывания направляющей РНК с сайтом-мишенью. Таким образом, в последовательности crРНК, когда последовательность, которая связывается с последовательностью-мишенью, не полностью идентична цепи-мишени, основание(я), отличное от таковых цепи-мишени, предпочтительно представляет собой основание(я), отличное от 12 оснований в 3'-области последовательности, которая связывается с последовательностью-мишенью, в последовательности crРНК.

[0055]

Направляющая РНК имеет последовательность, участвующую в связывании с

белком Cas (иногда называемую «последовательностью tracrРНК (трансактивирующей crРНК)»). Когда последовательность tracrРНК связывается с белком Cas, направляющая РНК может направлять белок Cas к сайту-мишени геномной ДНК.

[0056]

Последовательность tracrРНК особо не ограничивается. Последовательность tracrРНК обычно представляет собой РНК, состоящую из последовательности длиной примерно 50-100 оснований, способной образовывать множество (обычно три) структур стебель-петля, и последовательность варьируется в зависимости от типа используемого белка Cas. В качестве последовательности tracrРНК можно использовать различные известные последовательности в зависимости от типа используемого белка Cas.

[0057]

Направляющая РНК обычно содержит последовательность crРНК и последовательность tracrРНК. Вариантом направляющей РНК может быть одноцепочечная РНК (sgРНК), содержащая последовательность crРНК и последовательность tracrРНК, или может быть комплекс РНК, образованный комплементарным связыванием РНК, содержащей последовательность crРНК, и РНК, содержащей последовательность tracrРНК.

[0058]

Экспрессирующая кассета белка Cas особо не ограничивается при условии, что это полинуклеотид, используемый с целью экспрессии белка Cas в организмах-мишенях, метаболизм которых подлежит улучшению. Типичные примеры экспрессирующей кассеты включают полинуклеотид, содержащий промотор и кодирующую последовательность для белка Cas, находящиеся под контролем промотора. Выражение «помещен под контроль промотора» определена в объяснении экспрессирующей кассеты направляющей РНК.

[0059]

Промотор экспрессирующей кассеты белка Cas особо не ограничивается, и, например, можно использовать различные промоторы pol II. Примеры промоторов pol II включают, но не ограничиваются ими, промотор CMV, промотор EF-1α, промотор SV40, промотор MSCV, промотор hTERT, промотор β-актина, промотор CAG и т. п. Также можно использовать различные промоторы, индуцируемые агентами.

[0060]

Кодирующая последовательность для белка Cas особо не ограничивается при условии, что это последовательность оснований, кодирующая аминокислотную последовательность белка Cas.

[0061]

Белок Cas особо не ограничивается, при условии, что он используется в системе CRISPR/Cas. Например, можно использовать различные белки Cas, способные связываться с сайтом-мишенью геномной ДНК при образовании комплекса с направляющей РНК и расщеплении сайта-мишени. Известны белки Cas, полученные из

различных организмов, и примеры включают белок Cas9, полученный из S. pyogenes (тип II), белок Cas9, полученный из S. solfataricus (тип I-A1), белок Cas9, полученный из S. solfataricus (тип I-A2), белок Cas9, полученный из H. walsbyl (тип IB), белок Cas9, полученный из E. coli (тип IE), белок Cas9, полученный из E. coli (тип IF), белок Cas9, полученный из P . aeruginosa (тип IF), белок Cas9, полученный из S. thermophilus (тип II-A), белок Cas9, полученный из S. agalactiae (тип II-A), белок Cas9, полученный из S. aureus, белок Cas9, полученный из из N. meningitidis, белок Cas9, полученный из T. denticola, белок Cpf1, полученный из F. novicida (тип V), и т. п. Из них белки Cas9 являются предпочтительными, и, например, белки Cas9, эндогенно присутствующие в бактериях, принадлежащих к роду Streptococcus, более предпочтительны. Информацию об аминокислотных последовательностях различных белков Cas и их кодирующих последовательностях можно легко получить из различных баз данных, таких как NCBI.

[0062]

Белок Cas может быть белком Cas дикого типа, порождающим двухцепочечные разрывы, или белком Cas никазного типа. Белок Cas может иметь мутации (например, замену, делецию, вставку или добавление) в аминокислотной последовательности при условии, что его активность не нарушена. К белку Cas может быть добавлена известная белковая метка, сигнальная последовательность или белок, такой как ферментный белок. Примеры белковых меток включают биотин, метку His, метку FLAG, метку Halo, метку MBP, метку HA, метку Myc, метку V5, метку PA и т. п. Примеры сигнальных последовательностей включают сигналы транслокации цитоплазмы и т. п.

[0063]

Вектор, редактирующий ген Eros, может иметь другие последовательности. Другие последовательности особо не ограничиваются, и можно использовать различные известные последовательности, которые могут содержаться в экспрессирующих векторах. Примеры таких последовательностей включают последовательность начала репликации, ген устойчивости к лекарственному средству и т. п.

[0064]

Примеры генов устойчивости к лекарственным средствам включают гены устойчивости к хлорамфениколу, гены устойчивости к тетрациклину, гены устойчивости к неомицину, гены устойчивости к эритромицину, гены устойчивости к спектиномицину, гены устойчивости к канамицину, гены устойчивости к гигромицину, гены устойчивости к пуромицину и т. п.

[0065]

Тип вектора особо не ограничивается, и примеры включают плазмидные векторы, такие как экспрессирующие плазмиды животных клеток; вирусные векторы, такие как на основе ретровирусов, лентивирусов, аденовирусов, аденоассоциированных вирусов, герпесвирусов и вирусов Сендай; Векторы Agrobacterium; и т. п.

[0066]

Агент, редактирующий ген Eros, может быть легко приготовлен в соответствии с

известным методом генной инженерии. Например, агент, редактирующий ген Eros, может быть получен с использованием ПЦР, расщепления ферментом рестрикции, методом лигирования ДНК, методом транскрипции/трансляции in vitro, методом получения рекомбинантного белка и т. д.

[0067]

2-2-2. Промотор экспрессии Eros

Промотор экспрессии Eros особо не ограничивается, при условии, что он может увеличивать количество Eros в клетках.

[0068]

Примеры промотора экспрессии Eros включают экспрессирующую кассету Eros. Экспрессирующая кассета Erose особо не ограничивается, при условии, что Eros включен в экспрессируемом состоянии. Обычно экспрессирующая кассета Eros содержит полинуклеотид, содержащий промоторную последовательность и кодирующую последовательность для Eros (и дополнительно необязательно содержащая сигнальную последовательность терминации транскрипции). Экспрессирующая кассета также может быть в форме вектора.

[0069]

Экспрессирующий вектор конкретно не ограничен, и примеры включают плазмидные векторы, такие как экспрессирующие плазмиды животных клеток; вирусные векторы, такие как на основе ретровирусов, лентивирусов, аденовирусов, аденоассоциированных вирусов, герпесвирусов и вирусов Сендай; и тому подобное.

[0070]

Промотор особо не ограничивается, и примеры включают промотор CMV, промотор EF-1α, промотор SV40, промотор MSCV, промотор hTERT, промотор β-актина, промотор CAG и т. п. Также можно использовать различные промоторы, индуцируемые агентами.

[0071]

Экспрессирующий вектор может также содержать другие элементы, которые могут содержаться в экспрессирующий векторах, помимо указанных выше. Примеры других элементов включают последовательность начало репликации, ген устойчивости к лекарственным средствам и т. п. Примеры генов устойчивости к лекарственным средствам включают, но не ограничиваются ими, гены устойчивости к хлорамфениколу, гены устойчивости к тетрациклину, гены устойчивости к неомицину, гены устойчивости к эритромицину, гены устойчивости к спектиномицину, гены устойчивости к канамицину, гены устойчивости к гигромицину, гены устойчивости к пуромицину и т.п.

[0072]

Экспрессирующий вектор Eros можно легко получить в соответствии с известным методом генной инженерии. Например, экспрессирующий вектор Eros может быть получен с использованием ПЦР, расщепления ферментом рестрикции, метода лигирования ДНК и т. д.

[0073]

Другие примеры промотора экспрессии Eros включают активатор транскрипции для Eros и его экспрессирующий вектор, низкомолекулярное соединение, способное активировать транскрипцию Eros, и т.п. Вариант осуществления экспрессирующего вектора описан в объяснении экспрессирующего вектора Eros.

[0074]

2-3. Функциональный модулятор Eros

Функциональный модулятор Eros особо не ограничивается при условии, что он может модулировать функцию белка Eros или мРНК Eros, экспрессируемых в организме или клетке, которые подлежат модуляции экспрессии рецептора P2X7. Функциональный модулятор Eros включает, например, супрессоры функции Eros, промоторы функции Eros и т. п. Функциональные модуляторы Eros могут использоваться по отдельности или в комбинации из двух или более.

[0075]

Функциональный модулятор Eros особо не ограничивается при условии, что он может снижать активность молекулярных шаперонов, особенно активность молекулярных шаперонов для рецептора P2X7.

[0076]

Примеры функционального модулятора Eros включают нейтрализующие Eros антитела и т. п. Антитело, нейтрализующее Eros, относится к антителу, которое имеет свойство ингибировать активность молекулярного шаперона Eros путем связывания с Eros.

[0077]

Антитело включает поликлональные антитела, моноклональные антитела, химерные антитела, одноцепочечные антитела и часть антител, обладающих антигенсвязывающим свойством, например Fab-фрагменты и фрагменты, продуцируемые экспрессирующей библиотекой Fab. Антитело по настоящему изобретению также включает антитела, которые показывают связывание антигена с полипептидом, состоящим, как правило, по меньшей мере из 8 смежных аминокислот, предпочтительно по меньшей мере из 15 смежных аминокислот, более предпочтительно по меньшей мере из 20 смежных аминокислот аминокислотной последовательности Eros.

[0078]

Чтобы более надежно проявлять нейтрализующую активность, антитело предпочтительно представляет собой антитело, которое демонстрирует связывание антигена с аминокислотной последовательностью сайта связывания Eros с рецептором P2X7. Сайт связывания может быть определен на основе известной информации и/или выведен на основе известной информации (например, путем построения модели стыковки).

[0079]

Способы получения этих антител известны, и антитело по настоящему

изобретению можно получить с использованием таких обычных методов (Current Protocols in Molecular Biology, Chapter 11. 12-11. 13 (2000)). В частности, когда антитело по настоящему изобретению представляет собой поликлональное антитело, антитело может быть получено обычным способом из сыворотки иммунизированного животного, полученного путем иммунизации животного, не являющегося человеком, такого как домашний кролик, с помощью Eros, очищенного после экспрессии, например, в Escherichia coli с использованием обычного метода или с использованием олигопептида, синтезированного с использованием обычного метода и включающего частичную аминокислотную последовательность Eros. В случае моноклонального антитела антитело может быть получено из клеток гибридомы, полученных путем слияния клеток селезенки и клеток миеломы, полученных путем иммунизации животного, не являющегося человеком, такого как мышь, с Eros, очищенным после экспрессии, например, в Escherichia coli с использованием обычного метода или с использованием олигопептида, включающего частичную аминокислотную последовательность Eros (Current Protocols in Molecular Biology, edited By Ausubel et al. (1987) Published by John Wiley and Sons. Section 11. 4-11. 11). Более того, доступно множество антител. Например, известно антитело против Eros ab150936, продаваемое Abcam, антитело против C17orf62 HPA045696, продаваемое Atlas Antibodies, и т. п.

[0080]

Eros, используемый в качестве иммуногена для продукции антитела, может быть получен в соответствии с такими процедурами, как клонирование ДНК, конструирование плазмид, трансфекция в хозяина, культивирование трансформанта и сбор белка из культуры, на основе известной информации о последовательности гена. Эти процедуры могут выполняться способами, известными специалистам в данной области техники, или способами, описанными в публикациях (например, Molecular Cloning, T. Maniatis et al., CSH Laboratory (1983), DNA Cloning, DM. Glover, IRL PRESS (1985)).

[0081]

В частности, белок в качестве иммуногена для продукции антитела по настоящему изобретению может быть получен путем получения рекомбинантной ДНК (экспрессирующего вектора), которая позволяет гену, кодирующему Eros, экспрессироваться в желаемой клетке-хозяине, путем введения рекомбинантной ДНК в клетку-хозяин для получения трансформанта, культивирования трансформанта и сбора целевого белка из полученной культуры. Частичный пептид Eros может быть получен обычным методом химического синтеза (пептидного синтеза) в соответствии с известной информацией о последовательности генов.

[0082]

Антитело по настоящему изобретению может быть получено с использованием олигопептида, имеющего частичную аминокислотную последовательность Eros. Олиго(поли)пептид, используемый для получения антитела, не обязательно должен обладать функциональной биологической активностью, но желательно должен иметь

иммуногенные характеристики, аналогичные характеристикам Eros. Предпочтительным примером является олиго(поли)пептид, который имеет такие иммуногенные характеристики и который содержит по меньшей мере 8 смежных аминокислот, предпочтительно 15 смежных аминокислот, более предпочтительно 20 смежных аминокислот аминокислотной последовательности Eros.

[0083]

Антитело против олиго(поли)пептида также может быть получено путем усиления иммунологической реакции с помощью различных адъювантов, выбранных в соответствии с типом хозяина. Примеры адъювантов включают, но не ограничиваются ими, адъювант Фрейнда, минеральный гель, такой как гидроксид алюминия, поверхностно-активные материалы, такие как лизолецитин, плюроновый полиол, полианион, пептид, масляная эмульсия, гемоцианин лимфы улитки и динитрофенол, а также адъюванты для человека, такие как БЦЖ (бацилла Кальметта-Герена) и Corynebacterium parvum.

[0084]

В дополнение к вышеуказанным нейтрализующим антителам Eros, антагонисты Eros, агонисты Eros, доминантно-отрицательные мутанты Eros и т. п. могут быть использованы в качестве функционального модулятора Eros. Когда белок, такой как нейтрализующее антитело, используется в качестве функционального модулятора Eros, его экспрессирующая кассета также может использоваться вместо белка. Экспрессирующая кассета определена в «2-2. Модулятор экспрессии Eros» выше.

[0085]

2-4. Применение и другие компоненты

Как будет пояснено в примерах, описанных ниже, Eros, мембранный белок, локализованный в мембране эндоплазматического ретикулума, является шаперонной молекулой, необходимой для стабильной экспрессии гомотримеров P2X7, и функционирует путем физического взаимодействия с P2X7, синтезируемым в эндоплазматическом ретикулуме. В клетках, в которых взаимодействие Eros-P2X7 нарушено, P2X7 трудно правильно сворачиваться, что приводит к заметному снижению уровня экспрессии P2X7. С другой стороны, в клетках, экспрессирующих Eros в большом количестве, обеспечивается правильное сворачивание P2X7, что приводит к увеличению общего количества P2X7 и уровня экспрессии P2X7 на плазматической мембране.

[0086]

Таким образом, по меньшей мере, один элемент (активный ингредиент), выбранный из группы, состоящей из модулятора экспрессии Eros и функционального модулятора Eros, оказывает модулирующее действие на экспрессию рецептора P2X7 и, следовательно, может использоваться в качестве активного ингредиента в модуляторах экспрессии рецептора P2X7 (например, лекарственные средства, реагенты, пищевые композиции, пероральные композиции, усилители здоровья и пищевые добавки (например, добавки)). Активный ингредиент можно применять к животным, человеку и

различным клеткам (например, путем введения, приема внутрь или инокуляции) непосредственно или в виде различных композиций, образованных вместе с общими компонентами.

[0087]

Модулятор по настоящему изобретению можно использовать для модуляции различных явлений, связанных с модуляцией рецептора P2X7. Например, модулятор по настоящему изобретению может подавлять экспрессию рецептора P2X7 путем подавления экспрессии и/или функции Eros, тем самым подавляя продукцию IL-1β. Например, модулятор по настоящему изобретению может подавлять экспрессию рецептора P2X7 путем подавления экспрессии и/или функции Eros, тем самым предотвращая или уменьшая воспаление (в одном варианте осуществления, воспаление, не зависящее от оксида азота, хотя нет конкретных ограничений), боль и т. п., более конкретно, например, суставной ревматизм, остеоартрит, интерстициальный цистит, интерстициальный фиброз, псориаз, септический шок, сепсис, аллергический дерматит, астма, аллергическую астму, астму от легкой до тяжелой, астму, резистентную к стероидам, идиопатический аллергический фиброз легких, аллергический ринит, хроническую обструктивную болезнь легких, гиперреактивность дыхательных путей, острую и хроническую боль, невропатическую боль, воспалительную боль, мигрень, спонтанную боль, боль, вызванную опиоидами, диабетическую невропатию, постгерпетическую невралгию, боль в пояснице, невропатическую боль, вызванную химиотерапией, фибромиалгию, невропатическую боль, расстройство настроения, большую депрессию, большое депрессивное расстройство, резистентные к лечению депрессии, биполярное расстройство, тревожную депрессию, беспокойство, когнитивные функции, нарушение сна, рассеянный склероз, эпилептический припадок, болезнь Паркинсона, шизофрению, болезнь Альцгеймера, болезнь Хантингтона, боковой амиотрофический склероз, аутизм, повреждение спинного мозга, церебральную ишемию/черепно-мозговую травму, расстройство, связанное со стрессом, диабет, сахарный диабет, тромбоз, воспалительное заболевание кишечника, заболевание раздраженного кишечника, синдром раздраженного кишечника, болезнь Крона, сердечно-сосудистые заболевания (примеры сердечно-сосудистых заболеваний включают гипертензию, инфаркт миокарда, ишемическую болезнь сердца, ишемию и тому подобное), обструкцию мочеточника, синдром нижних мочевыводящих путей, дисфункцию нижних мочевыводящих путей (например, недержание мочи), заболевание после трансплантации сердца, остеопороз/остеопетроз, заболевания секреторной функции экзокринных желез, глаукому, нефрит, гломерулонефрит, болезнь Шагаса, хламидиоз, нейробластома, туберкулез, поликистоз почек, рак, угри и т. п. В качестве другого примера, модулятор по настоящему изобретению может стимулировать экспрессию рецептора P2X7, стимулируя экспрессию и/или функцию Eros, тем самым способствуя дифференцировке и/или поддержанию Т-клеток памяти.

[0088]

Клетки-мишени для модулятора по настоящему изобретению особо не ограничиваются при условии, что они экспрессируют рецептор P2X7 (экзогенный или эндогенный). Примеры включают иммунные клетки (например, Т-клетки), эндотелиальные клетки сосудов, эндотелиальные клетки-предшественники, стволовые клетки (например, стволовые клетки костного мозга, стволовые клетки жировой ткани, мезенхимальные стволовые клетки, плюрипотентные стволовые клетки (iPS-клетки, ES-клетки и т. п.), мышечные клетки (клетки скелетных мышц, клетки гладких мышц и кардиомиоциты), мышечные клетки-предшественники (например, сердечные клетки-предшественники и миобласты), нервные клетки и т. п.

[0089]

Организм-мишень для модулятора по настоящему изобретению особо не ограничивается, и примеры включают различных млекопитающих, таких как человек, обезьяны, мыши, крысы, собаки, кошки, кролики, свиньи, лошади, коровы, овцы, козы и олени.

[0090]

Форма модулятора по настоящему изобретению конкретно не ограничена и может принимать форму, обычно используемую при каждом использовании, в зависимости от предполагаемого использования модулятора по настоящему изобретению.

[0091]

Примеры формы модулятора по настоящему изобретению для использования в качестве лекарственных средств, усилителя здоровья, пищевых добавок (например, добавок) и тому подобное, включают лекарственные формы, подходящие для перорального введения (пероральные препараты), такие как таблетки (включая таблетки, распадающиеся при пероральном введении, жевательные таблетки, шипучие таблетки, пастилки, желеобразные капли и т. д.), пилюли, гранулы, мелкие гранулы, порошки, твердые капсулы, мягкие капсулы, сухие сиропы, жидкости (включая питьевые препараты, суспензии и сиропы) и желе; и лекарственные формы, подходящие для парентерального введения (парентеральные препараты), такие как капли для носа, средства для ингаляции, ректальные суппозитории, вкладыши, клизмы, желе, инъекции, пластыри, лосьоны и кремы.

[0092]

Примеры формы модулятора по настоящему изобретению для использования в качестве пищевых композиций включают жидкие, гелевые или твердые пищевые продукты, такие как соки, безалкогольные напитки, чаи, супы, соевое молоко, салатные масла, заправки, йогурты, желе, пудинги, фурикаке (сухая японская приправа), сухое детское молоко, смеси для тортов, сухие или жидкие молочные продукты, хлеб, печенье и тому подобное.

[0093]

Примеры формы модулятора по настоящему изобретению для использования в качестве пероральных композиций включают жидкости (например, растворы, эмульсии и

суспензии), полутвердые вещества (например, гели, кремы и пасты), твердые вещества (например, таблетки, гранулы, капсулы, пленочные агенты, пластицированные материалы, расплавленные твердые вещества, воскоподобные твердые вещества и эластичные твердые вещества) и любые подобные формы. Конкретные примеры включают средства для ухода за зубами (например, зубные пасты, ополаскиватели для зубов, жидкие средства для чистки зубов и зубной порошок), жидкости для полоскания рта, мази, пластыри, дезодоранты для полости рта, продукты питания (например, жевательная резинка, таблетки, леденцы, мармеладные конфеты, пленки и пастилки) и т. п.

[0094]

Модулятор настоящего изобретения может дополнительно содержать другие компоненты, если необходимо. Другие компоненты особо не ограничиваются при условии, что они могут быть включены в лекарственные средства, пищевые композиции, композиции для ухода за полостью рта, усилители здоровья, пищевые добавки (например, добавки) и т. д. Примеры включают основы, носители, растворители, диспергаторы, эмульгаторы, буферы, стабилизаторы, вспомогательные вещества, связующие средства, дезинтеграторы, лубриканты, загустители, увлажнители, красители, ароматизаторы, хелатирующие агенты и тому подобное.

[0095]

Содержание активного ингредиента в модуляторе по настоящему изобретению варьируется в зависимости, например, от типа активного ингредиента, применения, режима использования, цели применения и состояния мишени, и не ограничивается. Содержание активного ингредиента составляет, например, 0,0001-100 масс.%, и предпочтительно 0,001-50 масс.%.

[0096]

Количество применения (например, введение, проглатывание или инокуляция) модулятора по настоящему изобретению особо не ограничивается, при условии, что оно представляет собой фармацевтически эффективное количество. В пересчете на массу активного ингредиента количество обычно составляет 0,1-1000 мг/кг массы тела в сутки. Эту дозу предпочтительно вводить один раз в день или двумя или тремя порциями в сутки, и ее можно соответствующим образом увеличить или уменьшить в зависимости от возраста, состояния заболевания и симптомов.

[0097]

3. Клетка

В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к клетке, в которую был введен модулятор по настоящему изобретению, (также называемой «клеткой по настоящему изобретению» в настоящем описании).

[0098]

Как описано выше, в одном варианте осуществления модулятор по настоящему изобретению может способствовать дифференцировке и/или поддержанию Т-клеток памяти, стимулируя экспрессию и/или функцию Eros. Таким образом, когда клетка по

настоящему изобретению, содержащая по меньшей мере один элемент, выбранный из группы, состоящей из промотора экспрессии Eros и промотора функции Eros, является Т-клеткой (Т-клеткой по настоящему изобретению), клетка по настоящему изобретению может быть подходящей для использования в качестве Т-клетки для использования в CAR-T-терапии.

[0099]

Чтобы предотвратить сохранение CAR-T-клеток в организме пациента в течение длительного периода времени после терапии, Т-клетка по настоящему изобретению предпочтительно представляет собой клетку, которая может модулировать экспрессию Eros и/или функцию Eros, так что экспрессия Eros и/или функция Eros временно усиливается. В качестве метода такой модуляции может использоваться, например, экспрессирующая кассета, в которой экспрессия модулируется с помощью промотора, чувствительного к лекарственному средству, в качестве промотора экспрессии Eros и/или промотора функции Eros для временного усиления экспрессии Eros и/или функции Eros путем добавления лекарственного средства.

[0100]

Более того, с той же точки зрения, предпочтительно, чтобы в Т-клетку по настоящему изобретению был дополнительно введен модулятор по настоящему изобретению, содержащий по меньшей мере один элемент, выбранный из группы, состоящей из супрессора экспрессии Eros и супрессора функции Eros. Это позволяет модулировать экспрессию Eros и/или функцию Eros таким образом, чтобы экспрессия Eros и/или функция Eros подавлялись после временного усиления экспрессии Eros и/или функции Eros, например, с помощью зависимого от лекарственного средства промотора.

Примеры

[0101]

Настоящее изобретение подробно описано ниже со ссылкой на Примеры; однако настоящее изобретение не ограничивается этими примерами.

[0102]

Материалы и методы

Материалы и методы экспериментов, выполненных в следующих примерах экспериментов, показаны ниже, если не указано иное.

[0103]

Материал и метод 1: клеточная линия, плазмида, антитело и реагент

Клетки WR19L мыши (ATCC TIB-52) выращивали в среде RPMI 1640 с добавлением 10% FCS. Клетки THP-1 человека (ATCC TIB-202) культивировали в RPMI 1640 с добавлением 10% FCS и 55 мкМ β-меркаптоэтанола. Клетки HEK293T (ATCC CRL-1573) выращивали в среде DMEM, содержащей 10% FCS.

[0104]

Вектор pNEF-BOS был получен из pEF-BOS (Nucleic Acids Res. 18, 1990: 5322), в который из pSV2-neo был введен ген устойчивости к неомицину, управляемый ранним

промотором SV40 (Nature 302,1983: 340-342). Вектор LentiCas9-Blast (Nat. Meth. 11,2014: 783-784), объединенная CRISPR-нокаутная библиотека мыши (GeCKO v2) (Nat. Meth. 11,2014: 783-784) и плазмиды pX330 и pX459v2 (Nat. Protoc. 8,2013: 2281-2308) были получены от Addgene. pCMV-VSV-G-RSV-rev и pCMV-VSV-G (J. Virol. 72,1998: 8150-8157) были предоставлены Центром биоресурсов Riken. Ретровирусный вектор pMXspuro (Exp. Hematol. 31,2003: 1007-1014) и упаковывающая плазмида pGag-pol-IRES-bsr (Gene Ther. 7,2000: 1063-1066) были получены из Института медицинских наук Токийского университета. Лентивирусные векторы pAdVAntage и pLVSIN-EF-1 были приобретены у Thermo Fisher Scientific и Takara Bio, соответственно.

[0105]

Конъюгированные с Alexa 488 крысиные mAb против P2X7 мыши (клон Hano 43) были получены от Bio-Rad. mAb против FLAG M2 с HRP, микросферы, конъюгированные с антителом против FLAG M2, и пептид 3×FLAG были получены от Merck. HRP-кроличьи антитела против GFP получали из медицинских и биологических лабораторий. Мышиные mAb против HA с HRP (клон 16B12) были получены от BioLegend. Кроличьи антитела против P2X7 были получены от Alomone Labs. HRP-конъюгированные козьи Ab против кроличьего Ig получали от Agilent Technologies. 2’(3’)-O-(4-Бензоилбензоил)аденозин-5’-трифосфат (BzATP) и АТФ были приобретены у Wako Pure Chemical и Nacalai Tesque, соответственно. O, O'-бис(2-аминофенил)этиленгликоль-N, N,N',N'-тетрауксусная кислота, тетраацетоксиметиловый эфир (BAPTA-AM) и 1-[2-амино-5-(2,7-дифтор)-6-ацетоксиметокси-3-оксо-9-ксантенил)фенокси]-2-(2-амино-5-метилфенокси)этан-N, N,N',N'-тетрауксусная кислота, тетра(ацетоксиметиловый) эфир (Fluo 4-AM) были получены от Dojindo. Меченый Cy5 аннексин V был получен от BioVision. Иономицин и иодид пропидия (PI) были получены от Merck. SYTOX Blue, YO-PRO-1 и Hoechst 33342 были получены от Thermo Fisher Scientific. 1-Олеоил-2-{6-[(7-нитро-2-1,3-бензоксадиазол-4-ил)амино]гексаноил}-глицеро-3-фосфохолин (NBD-PC) получали от Avanti Polar Lipids.

[0106]

Материал и метод 2: редактирование генома и трансформация клеточной линии

Гены TMEM16F, P2X7 и Eros были отключены с использованием системы CRISPR-Cas9 и плазмиды pX330 или pX459v2, как сообщалось ранее (Science 344, 2014: 1164-1168, Nat. Protoc. 8, 2013: 2281-2308). Комплементарные олигонуклеотиды, несущие последовательности-мишени sgРНК, были следующими: мышиный (m) TMEM16F, GGATGAAGTCGATTCGCCTC (SEQ ID NO: 1); mP2X7, TGAGCGATAAGCTGTACCAG (SEQ ID NO: 2); mEros, ATTTGTGGCTGTACAGAACT (SEQ ID NO: 3); человеческий (h) P2X7, TGATGACAGGCTCTTTCCGC (SEQ ID NO: 4); и hEros, TGGAAGCTCTTCTACGTCAC (SEQ ID NO: 5). Олигонуклеотиды лигировали в pX330 или pX459v2, и полученную плазмидную ДНК вводили в клетки WR19L или THP-1 путем электропорации с использованием NEPA21 Super Electroporator (NepaGene). В некоторых случаях трансфекцию проводили дважды с интервалом в 3 дня. Через 20-30 часов после трансфекции вектором pX459v2 клетки обрабатывали 1 мкг/мл пуромицина в течение 30

часов. Отдельные клоны выделяли методом лимитирующего разведения и генотипировали путем секвенирования целевых областей sgРНК соответствующих хромосомных генов.

[0107]

Для экспрессии P2X7 и Eros кодирующие последовательности P2X7k (FJ436444), mEros (NM_144832), hP2X7a (NM_002562) и hEros (NM_001100407) получали с помощью ОТ-ПЦР с использованием РНК из WR19L (mP2X7k и mEros (hP2X7k и mEros) или THP-1 и hEros). Эти кДНК были помечены на С-конце с помощью FLAG, HA, EGFP или mCherry и вставлены в pNEF-BOS (mP2X7k), pMXs-puro (mP2X7k и mEros) или pLVSIN-EF-1α (hP2X7a и hEros). Подлинность экспрессионных плазмид подтверждали секвенированием ДНК. Экспрессирующую плазмиду, сконструированную с использованием вектора pNEF-BOS, расщепляли по одному сайту фермента рестрикции в векторе и вводили в клетки WR19L электропорацией. Стабильные трансформанты отобирали путем культивирования в присутствии 2 мг/мл G418. Для вирусной трансформации векторы на основе pMXs-puro вводили в клетки HEK293T вместе с pGag-pol-IRES-bsr, pCMV-VSV-G и pAdVAntage, а векторы на основе pLVSIN-EF-1α вводили вместе с pCAG-HIVgp и pCAG-HIVgp. Ретровирусы и лентивирусы в супернатанте культуры pCMV-VSV-G-RSV-rev концентрировали при 4°C центрифугированием при 6000×g в течение 16 часов и использовали для инфицирования клеток WR19L и THP-1, соответственно. Трансформанты отбирали в присутствии 1 мкг/мл пуромицина. При необходимости mP2X7-, EGFP- или mCherry-положительные клетки сортировали с использованием FACSAriaTMII (BD Biosciences).

[0108]

Материал и метод 3: проточная цитометрия формы P2X7, экспонирование PtdSer, NBD-PC, YO-PRO-1 и внутриклеточный Ca^{2+}

Для детектирования mP2X7 на трансформантах клеток WR19L 5×10^5 клеток промывали PBS, содержащим 2% FCS (PBS/FCS), и инкубировали в 100 мкл PBS/FCS, содержащем 40-кратно разведенное антитело Alexa488-анти-mP2X7, на льду в течение 30 минут. Затем клетки промывали PBS/FCS, суспендировали в 250 мкл PBS/FCS, содержащем 250 нMSYTOX Blue, и анализировали проточной цитометрией с использованием FACSCantoTM II (BD Biosciences). Данные анализировали с помощью программного обеспечения FlowJo (BD Biosciences).

[0109]

P2X7-опосредованное экспонирование PtdSer анализировали по связыванию аннексина V с последующей проточной цитометрией. В частности, $1{,}8\times10^6$ клеток промывали PBS, ресуспендировали в буфере аннексина (10 мМ HEPES-NaOH (pH 7,5), 140 мМ NaCl и 2,5 мМ $CaCl_2$), содержащем 1000-свернутый разбавленный Cy5-меченный аннексин V и 2,5 мкг/мл PI и предварительно инкубировали при 20°C в течение 5 минут или при 4°C в течение 10 минут. Затем клетки стимулировали иономицином, BzATP или ATP при 20°C или 4°C и анализировали проточной цитометрией с использованием FACSCantoTMII. P2X7-зависимую интернализацию PtdCho анализировали посредством

интернализации NBD-PC, как сообщалось ранее (Nature 468,2010: 834-838). В частности, $1,8\times10^6$ клеток суспендировали в 300 мкл аннексинового буфера и предварительно инкубировали при 4°C в течение 10 минут. Часть 250 мкл клеточной суспензии смешивали с равным объемом аннексинового буфера, содержащего 500 нMNBD-PC и 1 мМАТФ, и инкубировали при 4°C. Затем 90 мкл этой смеси смешивали с 150 мкл аннексинового буфера, содержащего 5 мг/мл BSA без жирных кислот, инкубировали на льду в течение 1 минуты и анализировали с использованием FACSCantoTMII. Включение YO-PRO-1 аналогично анализировали с помощью проточной цитометрии (J. Biol. Chem. 272,1997: 5482-5486). В частности, $1,3\times10^6$ клеток предварительно инкубировали при 4°C в течение 10 минут в 650 мкл аннексинового буфера, смешанного с 650 мкл аннексинового буфера, содержащего 4 мкMYO-PRO-1, 500 nMSYTOX Blue и 1 мМ АТФ, инкубировали при 4°C и анализировали с FACSCantoTMII.

[0110]

Для контроля внутриклеточного Ca^{2+} 7×10^5 клеток инкубировали с 1,4 мл 4 мкМ Fluo4-AM в буфере HEPES/NaCl (10 мМ HEPES-NaOH (pH 7,5) и 140 мМ NaCl) при 25°C в течение 15 минут, промывали, инкубировали в 350 мкл буфера HEPES/NaCl при 25°C в течение 15 минут и охлаждали при 4°C в течение 10 минут. Затем 150 мкл клеточной суспензии смешивали с равным объемом буфера HEPES/NaCl, содержащего 5 мМ CaCl2, 500 нМ SYTOX Blue и 1 мМ АТФ, инкубировали при 4°C в течение 5 минут и анализировали проточной цитометрией с FACSCantoTMII.

[0111]

Материал и метод 4: Конфокальный микроскоп

Клетки, стабильно экспрессирующие mP2X7k-EGFP, mEros-EGFP и mEros-mCherry, промывали сбалансированным солевым раствором Хэнка с добавлением 2% FCS (HBSS/FCS) и суспендировали в HBSS/FCS, содержащем 5 мкг/мл Hoechst 33342 или 5 мкМ DRAQ5. Клетки высевали в чашку со стеклянным дном (Matsunami) и наблюдали с помощью конфокального флуоресцентного микроскопа IX81 (Olympus).

[0112]

Материал и метод 5: ОТ-ПЦР для мышей P2X7a и P2X7k

Некоторые ткани мыши экспрессируют два варианта сплайсинга P2X7, т. е. P2X7a и P2X7k, которые используют разные экзоны 1 (J. Biol. Chem. 284, 2009: 25813-25822). Чтобы определить, какой вариант экспрессируется в клетках WR19L, суммарную РНК получали из клеток WR19L и резидентных перитонеальных макрофагов мышей C57BL/6J с использованием набора RNeasy Mini Kit (Qiagen) и подвергали обратной транскрипции с использованием транскриптазы Superscript IIIReverse (Thermo Fisher Scientific) или набора для преобразования РНК в кДНК высокой эффективности (Thermo Fisher Scientific). Комплементарную ДНК подвергали ПЦР с использованием ДНК-полимеразы PrimeSTAR GXL (Takara Bio) и следующих праймеров: специфические прямые праймеры, 5'-TTTTTAATTAAGCCACCATGCCGGCTTGCTGCAGCTG-3' (SEQ ID NO: 6) в экзоне 1 для mP2X7a и 5’-TTTTTAATTAAGCCACCATGCTGCCCGTGAGCCAC-3’ (SEQ ID NO: 7)

экзона 1 формы P2X7k; и общий обратный праймер 5'-AAAGAATTCGTAGGGATACTTGAAGCCAC-3'(SEQ ID NO: 8) в экзоне 13.

[0113]

Материал и метод 6: Полногеномный CRISPR-скрининг

Полногеномный CRISPR-скрининг проводили в соответствии с предыдущими данными (Science 343,2014: 84-87, Nat. Protoc. 12,2017: 828-863). В частности, клетки TMEM16F$^{-/-}$P2X7$^{-/-}$ (DKO) WR19L, созданные системой CRISPR-Cas9, стабильно трансформировали pNEF-BOS-mP2X7k с образованием клеток DKO-WR19L-mP2X7k. Лентивирус, несущий Cas9-FLAG, получали путем трансфекции клеток HEK293T с помощью lentiCas9-Blast, pCAG-HIVgp и pCMV-VSV-G-RSV-rev и использовали для инфицирования клеток DKO-WR19L-mP2X7k. Трансформанты отбирали в присутствии 10 мкг/мл бластицидина S, и клон, экспрессирующий Cas9-FLAG, идентифицировали вестерн-блоттингом с анти-FLAG. Лентивирус для библиотеки sgРНК получали путем трансфекции клеток HEK293T (1×10^7) 17 мкг ДНК библиотеки GeCKO v2 (A+B), 8 мкг pCAG-HIVgp и 5 мкг pCMV-VSV-G-RSV-rev с последующим концентрированием при 4°C путем центрифугирования при 6000×g в течение 16 часов. Этот вирус использовали для заражения клеток DKO-WR19L-mP2X7k/Cas9 при MOI 0,3. В частности, 2×10^7 клеток в 48-луночном планшете с плотностью 4×10^5 клеток/лунку инфицировали с центрифугированием при 700×g при 30°C в течение 1 часа в присутствии 10 мкг/мл полибрена. Затем клетки культивировали в среде, содержащей 1 мкг/мл пуромицина и 800 мкг/мл G418, в течение 4 дней с одним пассажем с 3-кратным разведением. Затем клетки культивировали без антибиотиков в течение 2 дней, в течение которых клетки пассировали один раз с 4-кратным разведением.

[0114]

Полученные клетки DKO-WR19L-mP2X7k/Cas9/GeCKO (3×10^7) промывали PBS, ресуспендировали в 2 мл аннексинового буфера и охлаждали при 4°C в течение 10 минут. Затем к клеткам добавляли 1 мл охлажденного аннексинового буфера, содержащего 180 мкМ BzATP, и смесь инкубировали при 4°C в течение 5 минут. После 15-кратного разбавления охлажденным аннексиновым буфером клетки собирали центрифугированием при 300×g при 4°C в течение 3 минут, суспендировали в 3 мл аннексинового буфера, содержащего 1000-кратно разведенный Cy5-меченый аннексин V и 2,5 мкг/мл PI, и подвергали сортировке клеток с помощью FACSAriaTMII. Популяция клеток с самым низким сигналом аннексина V (примерно 0,8%) собирали и культивировали в присутствии 800 мкг/мл G418 в течение 3 дней и в отсутствие G418 в течение 2 дней. Эту процедуру (стимуляция BzATP, сортировка клеток, экспрессирующих низкие уровни PtdSer, и пролиферация) выполняли трижды.

[0115]

Геномную ДНК получали из третьих отсортированных клеток с использованием набора QIAamp DNA Mini (Qiagen), и часть интегрированной лентивирусной ДНК, несущей последовательность sgРНК, амплифицировали с помощью ПЦР с

использованием ДНК-полимеразы PrimeSTAR GXL и следующих праймеров. Последовательности праймеров следующие:

5'-AATGGACTATCATATGCTTACCGTAACTTGAAAGTATTTCG-3 '(SEQ ID NO: 9) и '5-CTTTAGTTTGTATGTCTGTTGCTATTATGTCTACTATTCTTTCC-3' (SEQ ID NO: 10). Затем продукт ПЦР подвергали ПЦР с использованием ДНК-полимеразы PrimeSTAR HS (Takara Bio) для присоединения последовательностей адаптера для секвенирования следующего поколения (NGS) с использованием смеси прямых праймеров (NGS-Lib-Fwd-1-10) (Nat. Protoc. 12, 2017: 828-863) и общего обратного праймера (5'-CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGAT CTTCTACTATTCTTTCCCCTGCACTGT-3 '(SEQ ID NO: 11)). Полученный продукт ПЦР очищали на спин-колонке (Promega), количественно определяли с помощью набора для анализа dsДНК Quant-iT PicoGreen (Thermo Fisher Scientific) и анализировали с помощью NGS с использованием MiSeq (Illumina) с использованием MiSeqreagent Kitv3 (Illumina). Полученные считывания были отнесены к последовательностям sgРНК, и представленность каждой уникальной sgРНК рассчитывали с использованием программного обеспечения, специально подготовленного Amelieff Co.

[0116]

Материалы и метод 7. Получение лизата цельных клеток и мембранной фракции.

Лизат цельных клеток получали вращением клеток в 50 мМ Tris-HCl буфере (pH 7, 5), содержащем 1% NP-40, 150 мМ NaCl и коктейль ингибиторов протеаз (cOmplete, без EDTA, Roche) при 4°C в течение 1 часа. Нерастворимые материалы удаляли центрифугированием при 20000×g при 4°C в течение 20 минут.

[0117]

Чтобы приготовить мембранную фракцию из клеток WR19L, $2,5\times10^7$ клеток промывали PBS и затем гомогенизировали на льду в 2, 7 мл раствора A (10 мМ Tris-HCl (pH 7,5) и 1 мМ (п-амидинофенил) метансульфонилфторида гидрохлорида (p-APMSF)) с использованием гомогенизатора Даунса. После добавления к гомогенату 2, 7 мл раствора B (10 мМ Tris-HCl (pH7, 5) 500 мМ сахарозы, 100 мМ KCl, 10 мМ MgCl2 и 1 мМ p-APMSF), ядра и митохондрии удаляли при 4°C путем последовательного центрифугирования при 800×g в течение 10 минут и при 8000×g в течение 10 минут. Затем мембранную фракцию осаждали центрифугированием при 100000×g в течение 60 минут и суспендировали в 600 мкл 20 мМ Tris-HCl буфера (pH 7, 5), содержащего 1% н-додецил-β-D-мальтопиранозид (DDM), 50 мМ KCl, 1 мМ MgCl2, 10% глицерин, 1 мМ p-APMSF и коктейль ингибиторов протеаз (cOmplete, без EDTA). Суспензию гомогенизировали, пропуская ее через иглу 29G, и растворяли вращением при 4°C в течение 2 часов. Нерастворимые материалы удаляли центрифугированием при 20000×g в течение 20 минут, и супернатант использовали в качестве неочищенной мембранной фракции.

[0118]

Чтобы приготовить мембранную фракцию из клеток THP-1, 1, 3×10^7 клеток обрабатывали 120 нг/мл форбол 12-миристат 13-ацетатом (PMA) в течение 3 дней и

культивировали еще 3 дня без PMA. После промывания PBS клетки собирали скребком для клеток и суспендировали в 2,5 мл раствора A. Клетки лизировали с помощью ультразвукового жидкостного процессора (Q55, Qsonica). После добавления к гомогенату 2,5 мл раствора B, мембранную фракцию получали, как описано выше, и растворяли в 200 мкл 50 мМ Tris-HCl буфера (pH 7,5), содержащего 1% NP-40, 150 мМ NaCl и коктейль ингибиторов протеаз (cOmplete, без EDTA).

[0119]

Материал и метод 8. Иммунопреципитация, SDS-PAGE, BN-PAGE и вестерн-блоттинг

Для иммунопреципитации mP2X7-mEroscomplex 500 мкл неочищенного мембранного лизата (60 мкг белка) из трансформанта клеток WR19L, экспрессирующих mP2X7-FLAG и mEros-EGFP, инкубировали в течение ночи с 10 мкл (объем слоя) магнитных микросфер с анти-FLAG M2. После трехкратной промывки 1 мл 20 мМ Tris-HCl буфера (pH 7,5), содержащего 0, 05% DDM, 50 мМ KCl, 1 мМ $MgCl_2$ и 10% глицерин, белки, связанные с микросферами, элюировали 100 мкл 20 мМ Tris-HCl буфера (pH 7,5), содержащего 150 мкг/мл пептида 3×FLAG, 1% DDM, 50 мМ KCl, 1 мМ $MgCl_2$ и 10% глицерина.

[0120]

Для SDS-PAGE лизат цельных клеток или неочищенный мембранный лизат инкубировали в буфере для образцов SDS (62,5 мМ Tris-HCl (pH 6,8), 2% SDS, 10% глицерин, 2, 5% β-меркаптоэтанол и 0, 005% бромфенолового синего) при комнатной температуре в течение 1 часа и разделяли электрофорезом на 7,5% полиакриламидном геле (Nacalai Tesque, Inc.). Двухцветные стандарты размера белков Precision Plus Protein Dual Color Standards (Bio-Rad Laboratories, Inc.) использовали в качестве маркеров молекулярной массы. Для BN-PAGE образец смешивали с Native PAGE (зарегистрированная торговая марка) буфером для образцов (4×) и Native PAGE (зарегистрированная торговая марка) 5% G-250 добавкой для образцов (20×) и загружали на Native PAGE (зарегистрированная торговая марка) Novex 4-16% BisTris гель (Thermo Fisher Scientific). После электрофореза при 150 В при 4°C в течение 35 минут концентрация CBB G-250 в рабочем буфере была изменена с 0,02 до 0,002%, и образец подвергали дальнейшему электрофорезу последовательно при 150 В в течение 25 минут, при 250 В в течение 30 минут и при 350 В в течение 20 минут. NativeMark (зарегистрированная торговая марка) неокрашенный белковый стандарт (Thermo Fisher Scientific) использовали в качестве маркера молекулярной массы.

[0121]

Для вестерн-блоттинга сразу после SDS-PAGE или сразу после инкубации геля BN-PAGE в рабочем буфере SDS-PAGE (25 мМ Tris-HCl (pH 8,3), 192 мМ глицина и 0,1% SDS) при комнатной температуре в течение 15 минут, разделенные белки в геле переносили на PVDF-мембрану (Millipore). Мембрану блокировали 5% обезжиренным молоком и гибридизовали с антителом, меченным HRP, с последующим детектированием

с помощью HRP-конъюгированного хемилюминисцентного субстрата Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Merck). В качестве контроля загрузки белки на PVDF-мембране окрашивали CBB R-250.

[0122]

Материал и метод 9: ИФА с IL-1β.

Клетки THP-1 обрабатывали PMA, чтобы способствовать их дифференцировке в макрофаги, и ATP-индуцированную секрецию IL-1β выполняли методом, немного измененным по сравнению с методом, описанным в предыдущих данных (Immunity 15, 2001: 825-835, PLoS ONE 5 , 2010: e8668). В частности, клетки THP-1 с плотностью $2{,}5\times10^5$ клеток /на лунку в 24-луночном планшете культивировали в RPMI 1640, содержащей 10% FCS и 120 нг/мл PMA, в течение 3 дней. PMA удаляли, и клетки культивировали в RPMI1640-10% FCS в течение 2 дней, и дополнительно в той же среде, содержащей 100 нг/мл LPS, в течение ночи. Затем клетки стимулировали 1-3 мМ АТФ в RPMI1640-10% FCS в течение 5 часов. Культуральную жидкость центрифугировали при 20000×g при 4°C в течение 15 минут, и IL-1β в супернатанте количественно определяли с помощью набора для ИФА (Quantikine ELISA Human IL-1β/IL-1F2, R&D Systems).

[0123]

Результаты

Пример эксперимента 1: P2X7-зависимое, но TMEM16F-независимое экспонирование PtdSer

Анализы в этом примере эксперимента выполняли в соответствии с разделом «Материал и метод 3» выше. На Фиг. 1 показаны результаты этого примера эксперимента. Схема, условия и т. п. конкретного анализа, показанного на Фиг. 1A, представлены ниже. После предварительной инкубации при 25°C в течение 15 минут в присутствии или отсутствии 25 мкМ BAPTA-AM клетки WR19L оставляли необработанными или стимулировали с помощью 3 мкМ иономицина или 300 мкМ BzATP при 20°C в течение 5 минут. Затем клетки окрашивали Cy5-меченным аннексином V в присутствии 2,5 мкг/мл PI и анализировали проточной цитометрией. Показано окрашивание аннексином V в PI-отрицательной популяцуии. Схема, условия и т. п. конкретного анализа, показанного на Фиг. 1A, представлены ниже. Клетки дикого типа, TMEM16F$^{-/-}$ (16F$^{-/-}$), P2X7$^{-/-}$ и 16F$^{-/-}$ P2X7$^{-/-}$ (DKO) WR19L стимулировали иономицином или BzATP, как описано выше, окрашивали аннексином V и PI и анализировали методом проточной цитометрии.

[0124]

В предыдущих данных (Nat. Commu. 6,2015: 6245-6210) сообщалось, что P2X7-индуцированное экспонирование PtdSer опосредуется Ca^{2+}-зависимой скрамблазой TMEM16F. Таким образом, эту возможность исследовали с использованием клеточной линии клеток мыши, полученной из клеток Т-клеточного лейкоза WR19L. Клетки WR19L, стимулированные с помощью 3 мкМ иономицина при 20°C, экспонировали PtdSer в течение 5 минут (Фиг. 1A и Фиг. 1B). Как сообщалось ранее (J. Biol. Chem. 288,2013: 13305-13316), это экспонирование PtdSer полностью подавлялось хелатированием

внутриклеточного Ca^{2+} с помощью 25 μM BAPTA-AM (Фиг. 1A), и это явление не наблюдалось в клетках TMEM16F$^{-/-}$(16F$^{-/-}$) WR19L (Фиг. 1B). Обработка клеток WR19L 300 мкМ BzATP (Blood 97, 2001: 587-600), агонистом P2X7, при 20°C в течение 5 минут сильно увеличивала экспонирование PtdSer (Фиг. 1A). Как и ожидалось, BzATP не индуцирует экспонирование PtdSer в клетках P2X7$^{-/-}$ WR19L (Фиг. 1B). Однако, в отличие от предположения в предыдущих данных (Nat. Commu. 6,2015: 6245-6210), дефектная мутация TMEM16F мало влияла на BzATP-индуцированное экспонирование PtdSer (Фиг. 1B). Более того, преинкубация клеток WR19L с BAPTA-AM не оказывала влияния на BzATP-индуцированное экспонирование PtdSer (Фиг. 1A), указывая на то, что другие члены семейства TMEM16 с Ca^{2+}-зависимой скремблирующей активностью, вероятно, не участвуют в этом процессе. На основании этих результатов авторы настоящего изобретения пришли к выводу, что P2X7-индуцированное экспонирование PtdSer в клетках WR19L происходит независимо от TMEM16F-опосредованного скремблирования фосфолипидов.

[0125]

Пример эксперимента 2: Скрининг молекул, поддерживающих P2X7-опосредованное экспонирование PtdSer

Анализы в этом примере эксперимента выполняли в соответствии с разделами «Материал и метод 3», «Материал и метод 5» и «Материал и метод 6» выше. На Фиг. 2 показаны результаты этого примера эксперимента. Схема, условия и т. п. конкретного анализа, показанного на фиг. 2A, представлены ниже. Транскрипты изоформ P2X7a и P2X7k детектировали с помощью ОТ-ПЦР в РНК из резидентных перитонеальных макрофагов мыши (rpMac) и клеток WR19L. Изоформы P2X7a и P2X7k создавали с использованием разных первых экзонов (экзон 1 и экзон 1 ’). Прямые праймеры на первых экзонах были специфичными для каждой изоформы, тогда как обратные праймеры на экзоне 13 были общими. Схема, условия и т. п. конкретного анализа, показанного на Фиг. 2B, представлены ниже. Клетки 16F$^{-/-}$, DKO и DKO-mP2X7k окрашивали Alexa488-анти-P2X7 Ab и анализировали проточной цитометрией. Кроме того, 16F$^{-/-}$, DKO и DKO-mP2X7k обрабатывали указанными концентрациями Bz-АТФ при 20°C в течение 5 минут, окрашивали Cy5-меченным аннексином V и анализировали с помощью проточной цитометрии. Эксперимент проводили в трех экземплярах, и средний процент аннексин V-положительных клеток в PI-отрицательной популяции наносили на график с помощью SD. Схема, условия и т. п. конкретного анализа, показанного на Фиг. 2C, представлены ниже. На первой стадии клетки DKO-WR19L-mP2X7k трансформировали с помощью библиотеки Cas9 и CRISPR, и трижды сортировали популяцию клеток со сниженной активностью в отношении BzATP-индуцированного экспонирования PtdSer. На второй стадии ДНК из этих отсортированных клеток подвергали глубокому секвенированию, и считанные последовательности обрабатывали для определения представленности каждой sgРНК. Исходные клетки и клетки после третьей сортировки не стимулировали или стимулировали BzATP, а затем анализировали проточной цитометрией.

[0126]

Существует несколько альтернативно сплайсированных форм мРНК (m) P2X7 мыши (Biochem. Biophys. Res. Commun. 332,2005: 17-27), две из которых (P2X7a и P2X7k) экспрессируются в тимусе и селезенке (J. Biol. Chem. 284, 2009: 25813-25822, J. Cell Sci. 125,2012: 3776-3789). Чтобы проверить, какой вариант сплайсинга экспрессируется в клетках WR19L, их РНК анализировали с помощью P2X7a-изоформа- и P2X7k-изоформа-специфичной ОТ-ПЦР. Как сообщалось ранее, макрофаги мыши экспрессировали только мРНК P2X7a, тогда как клетки WR19L в основном экспрессировали изоформу P2X7k (Фиг. 2A). Чтобы подтвердить вклад mP2X7k в BzATP-индуцированное экспонирование PtdSer, были созданы клетки TMEM16F$^{-/-}$P2X7$^{-/-}$(DKO)-WR19L с использованием системы CRISPR-Cas9. Как и ожидалось, клетки DKO-WR19L не реагировали на Ca-иономицин или BzATP (Фиг. 1B). Трансформация клеток DKO-WR19L с помощью mP2X7k (DKO-mP2X7k) приводила к высокой экспрессии mP2X7k на их клеточной поверхности (Фиг. 2B) и сильно повышала чувствительность клеток к BzATP-индуцированному экспонированию PtdSer. То есть концентрация BzATP, которая в три раза ниже, чем для клеток дикого типа, была достаточной для активации клеток, трансформированных mP2X7k, для экспонирования PtdSer при 20°C в течение 5 минут в отсутствие TMEM16F, подтверждая, что TMEM16F не требуется для P2X7-опосредованного экспонирования PtdSer.

[0127]

Чтобы идентифицировать молекулы, необходимые для P2X7-опосредованного экспонирования PtdSer, клетки DKO-mP2X7k подвергали скринингу CRISPR (Science 343,2014: 84-87) (Фиг. 2C). В этом скрининге клоны трансформантов mP2X7k, которые сильно и универсально экспонировали PtdSer в ответ на 60 мкМ BzATP при 4°C в течение 5 минут, были идентифицированы путем лимитирующего разведения и сортировки клеток. Клонированные клетки трансформировали Cas9 и инфицировали лентивирусом, несущим библиотеку GeCKO (CRISPR-Cas9-нокаут в масштабе генома) с MOI (множественность заражения), равным 0,3 для получения менее 1 sgРНК-несущего лентивируса на клетку-хозяин. Затем клетки стимулировали 60 мкМ BzATP при 4°C в течение 5 минут, и 0,8% популяции, которая заметно потеряла способность экспонировать PtdSer, было выделено путем сортировки клеток (Фиг. 2C). Эту сортировку клеток, утративших способность экспонировать PtdSer в ответ на BzATP, повторяли еще два раза. Анализ проточной цитометрии показал, что после третьей сортировки некоторые популяции клеток почти полностью утратили способность экспонировать PtdSer в ответ на BzATP (Фиг. 2C). Анализ глубокого секвенирования хромосомной ДНК отсортированной популяции клеток показал, что sgРНК (CYBC1) для Eros была наиболее обогащенной, что позволяет предположить, что Eros необходим для P2X7-опосредованного экспонирования PtdSer.

[0128]

Пример эксперимента 3. Требование Eros для P2X7-опосредованного процесса

Анализы в этом примере эксперимента выполняли в соответствии с разделами «Материал и метод 3» и «Материал и метод 9» выше. На Фиг. 3 показаны результаты этого примера эксперимента. Схема, условия и т. п. конкретного анализа, показанного на Фиг. 3A, представлены ниже. Клетки DKO-mP2X7k, TKO-mP2X7k и TKO-mP2X7k/mEros стимулировали 60 мкМ BzATP или 500 мкМ АТФ при 4°C в течение 5 минут, окрашивали аннексином V и анализировали с помощью проточной цитометрии. Схема, условия и т. п. конкретного анализа, показанного на Фиг. 3B и Фиг. 3C, представлены ниже. Клетки DKO-WR19L, DKO-WR19L-mP2X7k, TKO-WR19L-mP2X7k и TKO-WR19L-mP2X7k/mEros стимулировали 500 мкМ АТФ при 4°C в течение указанного времени в присутствии 250 нMNBDPC (B) или 2μ MYO-PRO-1 (C). Определяли среднюю интенсивность флуоресценции (MFI) BSA-неэкстрагируемого NBD-PC или включенного YO-PRO-1 в популяции, отрицательной по SYTOX Blue. Эксперимент проводили в трех экземплярах, и среднюю MFI или ее относительное значение (относительная интенсивность флуоресценции (RFI)) строили с помощью SD. Схема, условия и т. п. конкретного анализа, показанного на Фиг. 3A, представлены ниже. Клетки DKO, DKO-mP2X7k, TKO-mP2X7k и TKO-mP2X7k/mEros загружали Fluo 4-AM и стимулировали 500 мкМ АТФ при 4°C в течение 5 минут. Показаны профили флуоресценции Fluo 4 в популяции, отрицательной по SYTOX Blue. Схема, условия и т. п. конкретного анализа, показанного на Фиг. 3E, представлены ниже. После обработки PMA клетки THP-1 дикого типа, $Eros^{-/-}$, $Eros^{-/-}$ hEros, $P2X7^{-/-}$ и $P2X7^{-/-}$ клетки hP2X7a инкубировали с 100 нг/мл LPS при 37°C в течение ночи и культивировали в присутствии указанных концентраций АТФ в течение 5 часов. IL-1β в культуральной среде измеряли с помощью ИФА. Эксперимент проводили в трех экземплярах, и средние значения были показаны с SD. Схема, условия и т. п. конкретного анализа, показанного на Фиг. 3F, представлены ниже. BMDM от мышей дикого типа и мышей $Eros^{-/-}$ инкубировали в присутствии или в отсутствие 100 нг/мл LPS при 37°C в течение 3 часов и культивировали в присутствии указанных концентраций АТФ в течение 6 часов. IL-1β в культуральной среде измеряли с помощью ИФА. Эксперимент проводили в трех экземплярах, и средние значения были показаны с помощью SD (столбцы).

[0129]

Чтобы подтвердить, что Eros участвует в P2X7-опосредованном экспонировании PtdSer, Eros в DKO-mP2X7k нокаутировали системой CRISPR-Cas9. Способность полученной клеточной линии (TKO-mP2X7k) экспонировать PtdSer в ответ на BzATP или ATP была заметно нарушена, и это нарушение было полностью устранено путем трансформации клеток с помощью mEros (TKO-mP2X7k/mEros) (Фиг. 3A). P2X7 опосредует не только экспонирование PtdSer, но также АТФ-индуцированное скремблирование фосфолипидов, поглощение красителя, приток Ca^{2+} и продукцию IL-1β. Соответственно, стимуляция DKO-mP2X7k с помощью АТФ стимулировала скремблирование фосфолипидов, что оценивали путем включения NBD-PC (Фиг. 3B). Эту активность не наблюдали в клетках TKO-mP2X7k, и она устранялась путем

трансформации этих клеток с помощью Eros. Точно так же АТФ способствовал включению YO-PRO-1 в клетки DKO-mP2X7k. Этот эффект был уменьшен в TKO-mP2X7k, а трансформация клеток TKO с mEros вместе с mP2X7 сильно увеличила включение YO-PRO-1. Кроме того, клетки DKO не реагировали на АТФ для интернализации Ca^{2+}, но клетки DKO-mP2X7k хорошо реагировали на АТФ, и внутриклеточный Ca^{2+}, детектируемый сенсором Ca^{2+} Fluo-4, увеличивался в течение 5 минут после обработки АТФ (Фиг. 3D). Этот ответ не наблюдали в клетках TKO-mP2X7k, но он устранялся путем экспрессии mEros в клетках TKO-mP2X7k/mEros. Аминокислотная последовательность P2X7 человека имеет 81,3% идентичности с аминокислотной последовательностью P2X7 мыши. Как сообщалось ранее (Immunity 15,2001: 825-835), макрофаги, происходящие из THP-1 человека, стимулированные липополисахаридом (LPS), продуцировали IL-1β в ответ на АТФ дозозависимым образом (Фиг. 3E). Чтобы изучить вклад Eros в этот процесс, гены Eros и P2X7 в клетках THP-1 были индивидуально отключены системой CRISPR/Cas9. Как показано на Фиг. 3E, не только мутация P2X7-null, но также мутация Eros-null полностью блокировала продукцию IL-1β, и эти дефекты были устранены путем экспрессии человеческого (h) P2X7 или hEros, соответственно. Впоследствии BMDM получали из мышей дикого типа и мышей $Eros^{-/-}$. В соответствии с предыдущими сообщениями, BMDM дикого типа, примированные LPS, продуцировали IL-1β в ответ на АТФ (Фиг. 3F). Напротив, $Eros^{-/-}$ BMDM почти полностью утратили способность продуцировать IL-1β в ответ на АТФ (Фиг. 3F). Результаты показывают, что продукция IL-1β может быть подавлена путем подавления Eros. Эффект, проявляемый подавлением IL-1β, широко известен и описан, например, в BioDrugs (2017) 31: 207-221.

[0130]

Из этих результатов был сделан вывод, что различные P2X7-опосредованные биологические процессы в клетках мыши и человека нуждаются в Eros.

[0131]

Пример эксперимента 4: шаперонoподобная активность Eros в отношении экспрессии P2X7

Анализы в этом примере эксперимента выполняли в соответствии с разделами «Материал и метод 3», «Материал и метод 4» и «Материал и метод 8» выше. На Фиг. 4 показаны результаты этого примера эксперимента. Схема, условия и т. п. конкретного анализа, показанного на Фиг. 4A, представлены ниже. Лизаты клеток (1,5 мкг белка) из клеток DKO (дорожка 1), DKO-mP2X7k-FLAG (дорожка 2), TKO-mP2X7k-FLAG (дорожка 3) и TKO-mP2X7k-FLAG/mEros (дорожка 4) разделяли, анализировали с помощью SDS-PAGE и анализировали вестерн-блоттингом с использованием антител против FLAG. Мембрану окрашивали CBB R-250. Стрелками указаны тримерные и мономерные формы mP2X7. Схема, условия и т. п. конкретного анализа, показанного на Фиг. 4B, представлены ниже. Клетки дикого типа (дорожка 1), клетки $Eros^{-/-}$ (дорожка 2), $Eros^{-/-}$ hEros-HA (дорожка 3), $P2X7^{-/-}$ (дорожка 4) и $P2X7^{-/-}$ hP2X7a-FLAG (дорожка 5)

обрабатывали PMA. Неочищенные мембраны (7,5 мкг белка) солюбилизировали 1% NP-40, разделяли с помощью SDS-PAGE и анализировали вестерн-блоттингом с использованием антител против P2X7. Мембрану гибридизовали с антителами против Na^+/K^+-АТФазы, антителом против HA или антителом против FLAG. Стрелками указаны тримерные и мономерные формы hP2X7. Схема, условия и т. п. конкретного анализа, показанного на фиг. 4C, представлены ниже. Клетки DKO, DKO-mP2X7k, TKO-mP2X7k и TKO-mP2X7k/mEros окрашивали антителами Alexa488-анти-mP2X7. Показаны профили окрашивания Alexa 488 в популяции, отрицательной по SYTOX Blue. Схема, условия и т. п. конкретного анализа, показанного на фиг. 4D и фиг. 4E, представлены ниже. Клетки TKO WR19L трансформировали mP2X7k-EGFP и mEros, mP2X7k и mEros-EGFP (D) или mP2X7k-EGFP и mEros-mCherry (E) и наблюдали с помощью конфокального микроскопа в присутствии 5 мкМ DRAQ5 или 5 мкг Hoechst 33342. . Сигналы EGFP, mCherry, DRAQ5 и Hoechst показаны зеленым, красным, пурпурным и синим, соответственно. Схема, условия и т. п. конкретного анализа, показанного на Фиг. 4F, представлены ниже. Неочищенные мембранные фракции (1, 2 мкг белка) из клеток DKO-mP2X7k-FLAG (дорожка 1), TKO-mP2X7k-FLAG (дорожка 2) и TKO-mP2X7k-FLAG/mEros-EGFP (дорожка 3) солюбилизировали 1% DDM, разделяли BN-PAGE и анализировали вестерн-блоттингом с использованием антител против FLAG (левая панель) или антител против GFP (правая панель). Схема, условия и т. п. конкретного анализа, показанного на Фиг. 4G, представлены ниже. Неочищенные мембраны (60 мкг белка) клеток DKO-mP2X7k-FLAG или TKO-mP2X7k-FLAG/mEros-EGFP солюбилизировали 1% DDM. Белки, меченные FLAG, подвергали иммунопреципитации с помощью микросфер с анти-FLAG M2 и элюировали пептидом 3×FLAG. Неочищенные лизаты мембран (1, 5 мкг белка) (на входе) и 1/16 элюатов (IP) разделяли с помощью BN-PAGE и анализировали вестерн-блоттингом с использованием антител против GFP (верхняя панель) или антител против FLAG (нижняя панель).

[0132]

Недавно было показано, что Eros необходим для стабильной экспрессии субъединиц NADPH-оксидазы gp91phox и p22phox, действуя как шаперон (J. Exp. Med. 214,2017: 1111-1128). Чтобы проверить, действует ли Eros как шаперон для P2X7, в клетки DKO, TKO и TKO-mEros вводили меченный FLAG mP2X7k, а экспрессию mP2X7k оценивали вестерн-блоттингом с использованием антитела против FLAG. Как показано на Фиг. 4A, mP2X7k стабильно экспрессировался в клетках DKO. Однако его экспрессия была заметно снижена в клетках TKO, и это снижение было устранено трансформацией клеток с помощью mEros. Аналогичные результаты были получены для эндогенного hP2X7 в клетках THP-1. Вестерн-блоттинг с антителами против P2X7 выявил полосы 75 и 200 кДа в мембранной фракции дикого типа, но не в клетках $P2X7^{-/-}$ THP-1. Интенсивность этих полос увеличивалась путем трансформации клеток hP2X7-FLAG (Фиг. 4B), что указывает на то, что эти полосы соответствуют мономерным и тримерным формам hP2X7. Экспрессия hP2X7 была сильно снижена нулевой мутацией в Eros, и это

снижение полностью устранялось экспрессией hEros.

[0133]

Затем исследовали потребность в Eros для экспрессии P2X7 на клеточной поверхности с использованием клеток WR19L. Анализ проточной цитометрии с использованием антител против mP2X7 показал, что mP2X7 высоко экспрессируется в клетках DKO-mP2X7k. Напротив, mP2X7 на поверхности клеток TKO-mP2X7k заметно снижается, но полностью восстанавливался в клетках TKO-mP2X7k/mEros. Чтобы изучить локализацию mP2X7 и mEros, mP2X7k и mEros были слиты с EGFP и экспрессированы в клетках TKO вместе с mEros-HA или mP2X7-FLAG, соответственно. Наблюдение с помощью конфокального микроскопа показало, что значительная часть mP2X7k локализована на плазматической мембране (Фиг. 4D). С другой стороны, в соответствии с предыдущими сообщениями, mEros-EGFP в клетках TKO-mP2X7k наблюдали исключительно внутри клеток (вероятно, в эндоплазматическом ретикулуме). Когда клетки TKO трансформировали для совместной экспрессии mP2X7k-EGFP и mEros-mCherry, внутриклеточный сигнал EGFP колокализовался с сигналом mCherry (Фиг. 4E). Напротив, сигнал EGFP на плазматической мембране не колокализуется с mCherry, это указывает на то, что mEros способствует сворачиванию или созреванию mP2X7 в эндоплазматическом ретикулуме и что зрелый mP2X7 перемещается к плазматической мембране. Чтобы проверить эту возможность, клетки DKO, TKO и TKO-mEros-EGFP трансформировали mP2X7k с меткой FLAG, и их мембранные фракции анализировали с помощью Blue native (BN)-PAGE. Как показано на Фиг. 4F, вестерн-блоттинг с использованием антитела против FLAG показал две полосы около 800 кДа и 550 кДа в мЭРО DKO и TKO22, но не в клетках TKO. Нижняя полоса 550 кДа, по-видимому, соответствует тримерной форме mP2X7k, как сообщалось ранее. Ab против GFP для mEros-EGFP детектировали две полосы, из которых верхняя полоса была аналогична верхней полосе, наблюдаемой с Ab против FLAG для mP2X7k. Затем мембранные фракции подвергали иммунопреципитации с использованием гранул с анти-FLAG для mP2X7k-FLAG. Как показано на Фиг. 4G, преципитаты несли верхний большой комплекс, который распознавался не только анти-FLAG для mP2X7k, но также анти-GFP для mEros. Эти результаты показали, что большая полоса 800 кДа была комплексом между mP2X7k и mEros в эндоплазматическом ретикулуме. Зрелый mP2X7k с кажущейся Mr (относительной молекулярной массой) 550 кДа присутствовал на плазматической мембране, тогда как mEros, свободный или в комплексе с другими белками, присутствовал в эндоплазматическом ретикулуме. Из этих результатов был сделан вывод, что mEros временно взаимодействует с mP2X7 в эндоплазматическом ретикулуме и способствует его сворачиванию. Считалось, что mP2X7 затем перемещается к плазматической мембране, где он присутствует в виде гомотримерного комплекса.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Модулятор экспрессии рецептора P2X7, содержащий по меньшей мере один элемент, выбранный из группы, состоящей из модулятора экспрессии Eros (необходимый для активных форм кислорода) и функционального модулятора Eros.

2. Модулятор по п. 1, который содержит по меньшей мере один элемент, выбранный из группы, состоящей из супрессора экспрессии Eros и супрессора функции Eros, и предназначен для подавления экспрессии рецептора P2X7.

3. Модулятор по п. 2, который содержит супрессор экспрессии Eros.

4. Модулятор по п. 3, где супрессор экспрессии Eros содержит полинуклеотид.

5. Модулятор по п. 3 или 4, где супрессор экспрессии Eros содержит по меньшей мере один элемент, выбранный из группы, состоящей из Eros-специфической siРНК, Eros-специфической miРНК, Eros-специфической антисмысловой нуклеиновой кислоты и их экспрессирующей кассеты, и агента, редактирующего ген Eros.

6. Модулятор по любому из пп. 2-5, который предназначен для предотвращения или улучшения по меньшей мере одного элемента, выбранного из группы, состоящей из воспаления и боли.

7. Модулятор по п. 1, который содержит по меньшей мере один элемент, выбранный из группы, состоящей из промотора экспрессии Eros и промотора функции Eros, и предназначен для стимуляции экспрессии рецептора P2X7.

8. Модулятор по п. 7, который содержит промотор экспрессии Eros.

9. Модулятор по п. 8, где промотор экспрессии Eros содержит Eros-экспрессирующую кассету.

10. Модулятор по любому из пп. 7-9, который предназначен для стимуляции дифференцировки и/или поддержания Т-клетки памяти.

11. Модулятор по любому из пп. 1-10, который представляет собой лекарственное средство, реагент или пищевую композицию.

12. Т-клетка, в которую введен модулятор по любому из пп. 7-10.

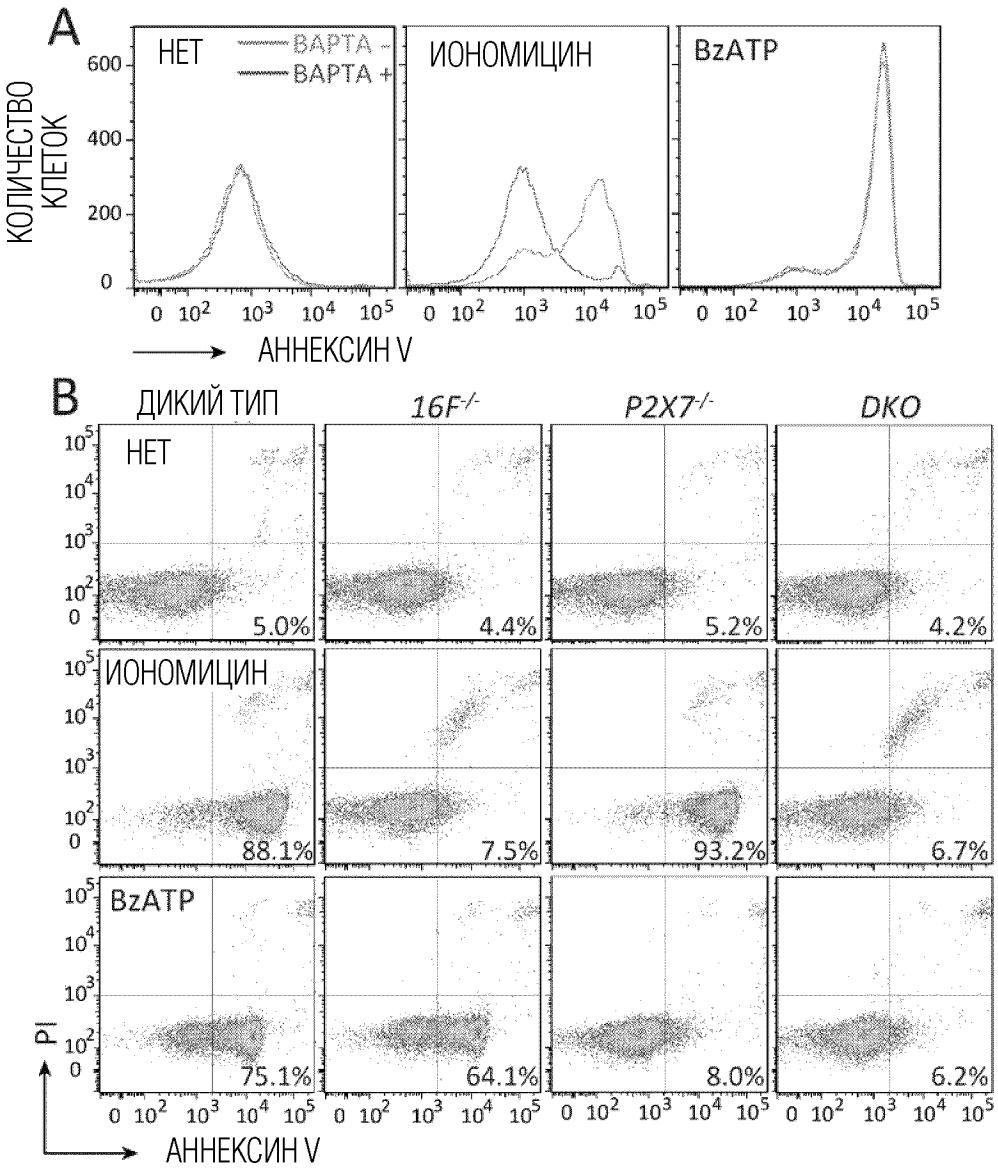
13. Т-клетка по п. 12, которая способна к модуляции экспрессии Eros и/или функции Eros, так что экспрессия Eros и/или функция Eros временно усиливается.

14. Т-клетка по п. 12 или 13, в которую дополнительно введен модулятор по любому из пп. 2-5.

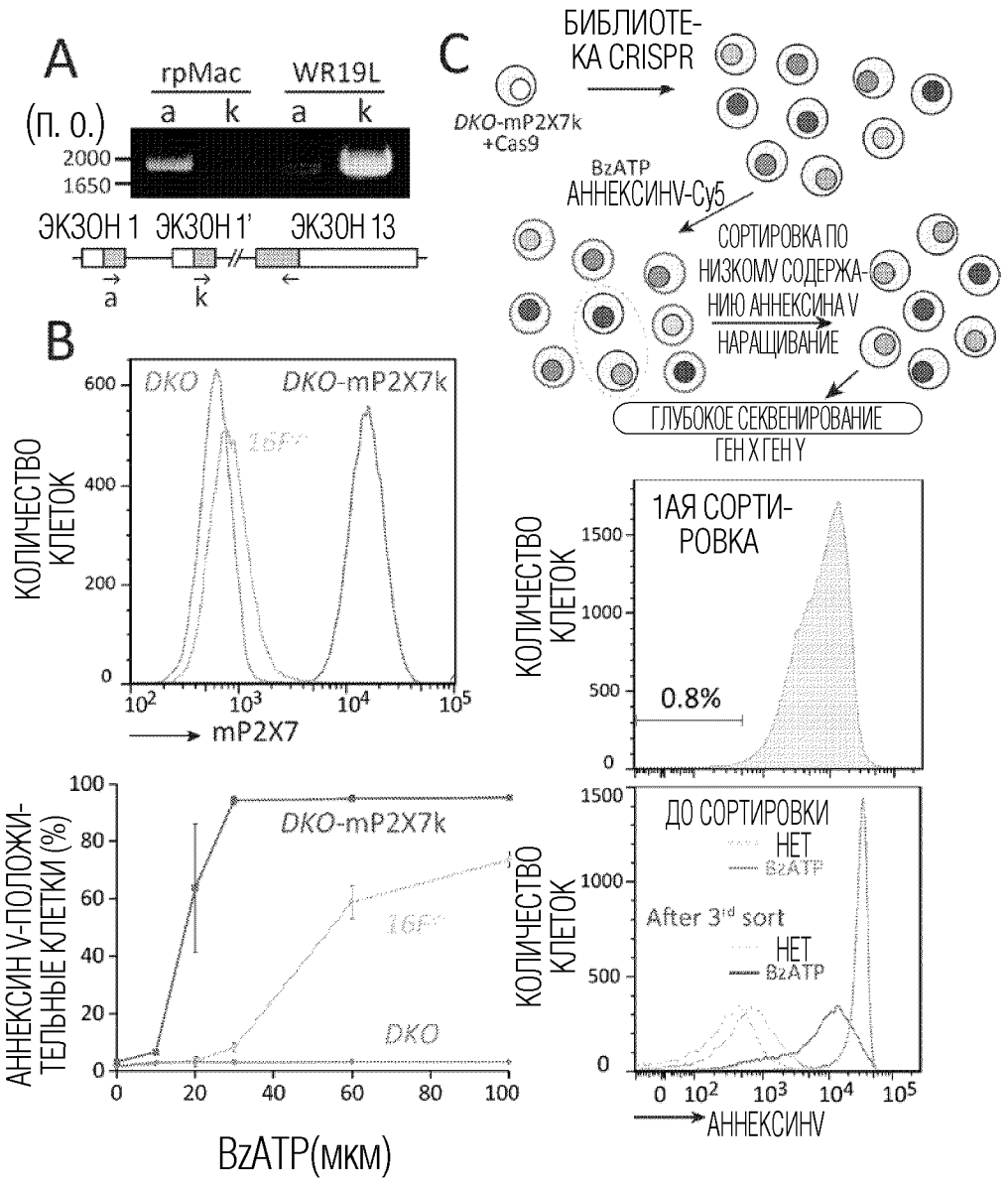
15. Т-клетка по п. 14, которая способна к модуляции экспрессии Eros и/или функции Eros, так что экспрессия Eros и/или функция Eros подавляется после временного усиления экспрессии Eros и/или функции Eros.

По доверенности

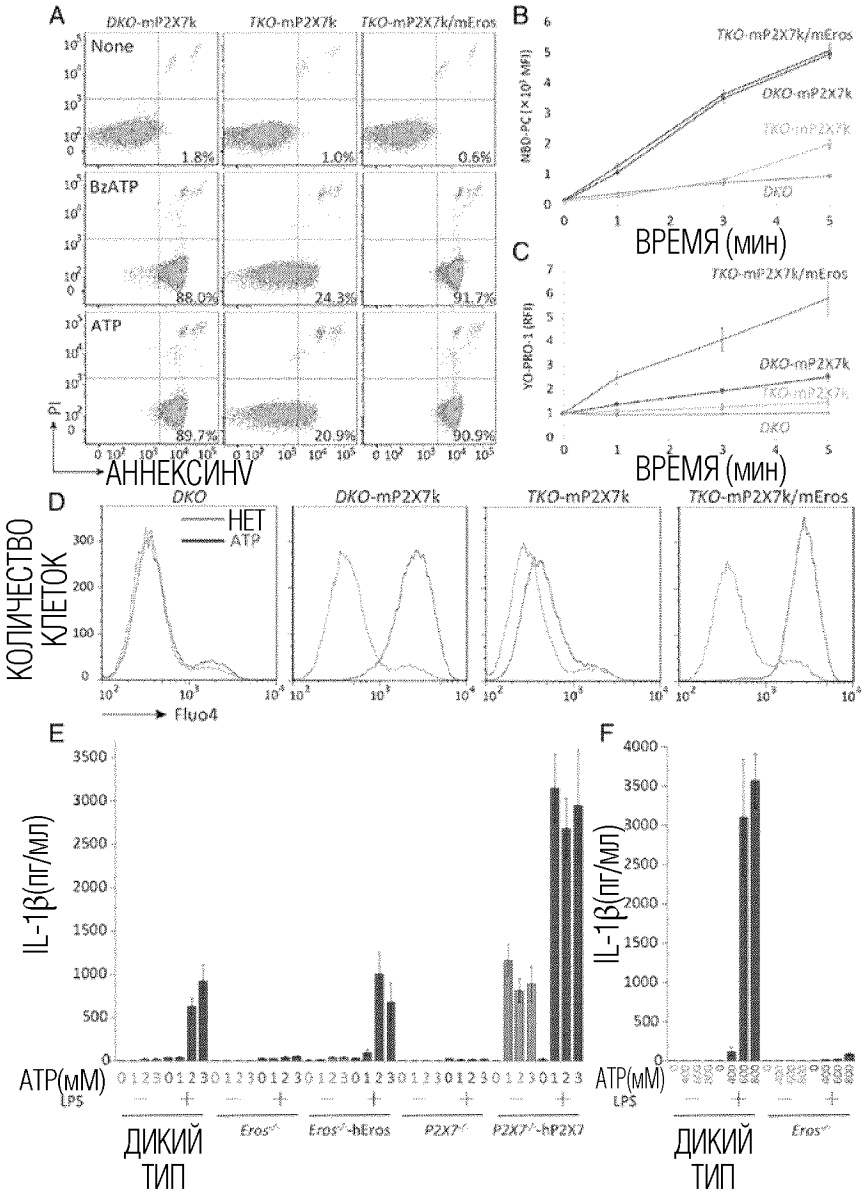
ФИГ. 1


A
НЕТ
BAPTA -
BAPTA +
ИОНОМИЦИН
BzATP
КОЛИЧЕСТВО КЛЕТОК
600
400
200
0
0 10^2 10^3 10^4 10^5
АННЕКСИН V
B
ДИКИЙ ТИП
16F-/-
P2X7-/-
DKO
НЕТ
5.0%
4.4%
5.2%
4.2%
ИОНОМИЦИН
88.1%
7.5%
93.2%
6.7%
BzATP
75.1%
64.1%
8.0%
6.2%
PI
АННЕКСИН V

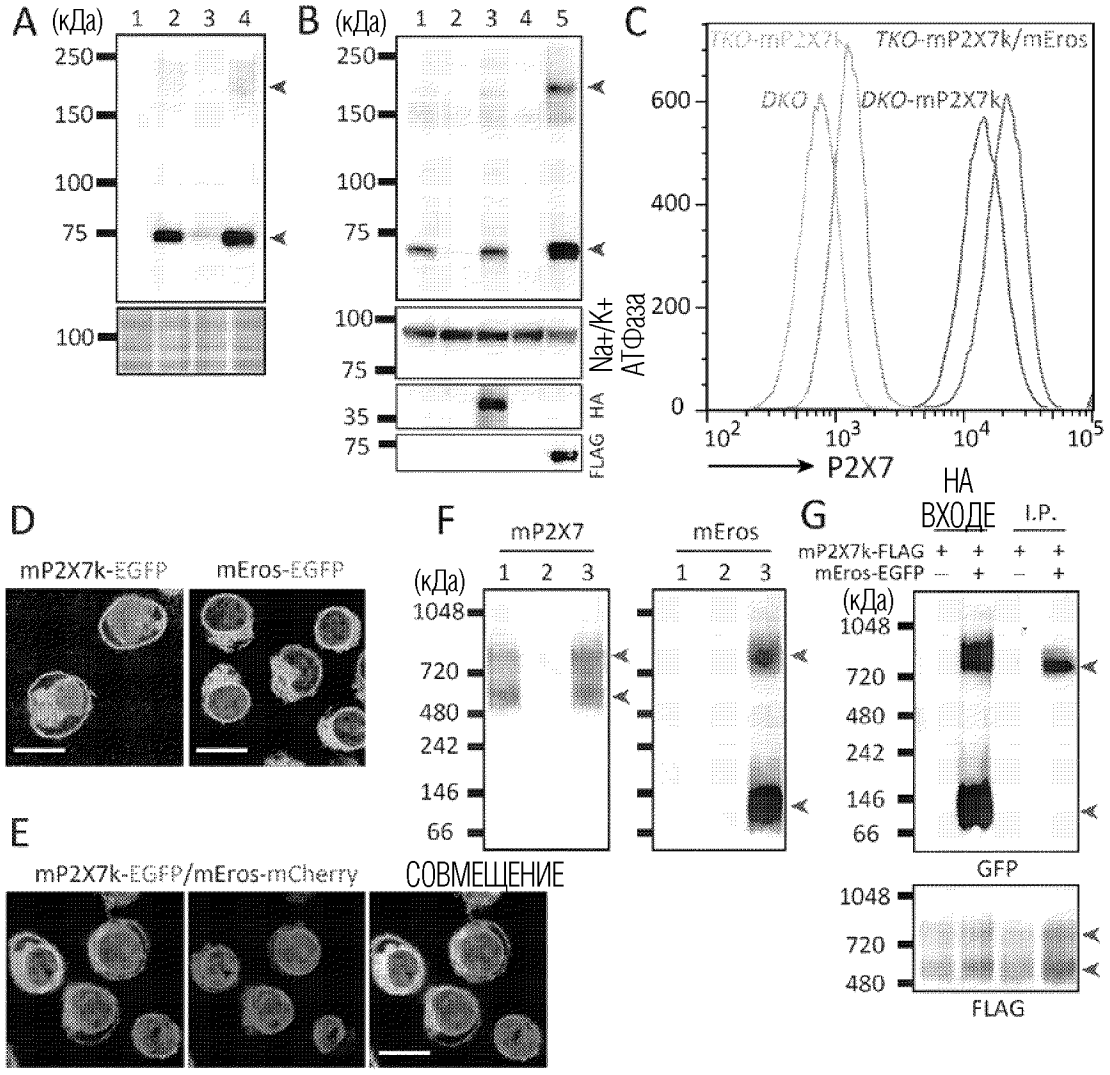
ФИГ. 2


A
rpMac
WR19L
a
k
a
k
(п. о.)
2000
1650
ЭКЗОН 1
ЭКЗОН 1'
ЭКЗОН 13
a
k
B
DKO
DKO-mP2X7k
16F7
КОЛИЧЕСТВО КЛЕТОК
mP2X7
АННЕКСИН V-ПОЛОЖИТЕЛЬНЫЕ КЛЕТКИ (%)
DKO-mP2X7k
16F7
DKO
BzATP(мкм)
C
БИБЛИОТЕКА CRISPR
DKO-mP2X7k +Cas9
BzATP
АННЕКСИНV-Cy5
СОРТИРОВКА ПО НИЗКОМУ СОДЕРЖАНИЮ АННЕКСИНА V
НАРАЩИВАНИЕ
ГЛУБОКОЕ СЕКВЕНИРОВАНИЕ
ГЕН X ГЕН Y
1АЯ СОРТИРОВКА
0.8%
КОЛИЧЕСТВО КЛЕТОК
ДО СОРТИРОВКИ
НЕТ
BzATP
After 3rd sort
НЕТ
BzATP
АННЕКСИНV

ФИГ. 3


A
DKO-mP2X7k
TKO-mP2X7k
TKO-mP2X7k/mEros
None
BzATP
ATP
1.8%
1.0%
0.6%
88.0%
24.3%
91.7%
89.7%
20.9%
90.9%
PI
АННЕКСИНV
B
TKO-mP2X7k/mEros
DKO-mP2X7k
TKO-mP2X7k
DKO
ВРЕМЯ (мин)
C
YO-PRO-1 (RFI)
ВРЕМЯ (мин)
D
DKO
DKO-mP2X7k
TKO-mP2X7k
TKO-mP2X7k/mEros
НЕТ
ATP
КОЛИЧЕСТВО КЛЕТОК
Fluo4
E
IL-1β(пг/мл)
ATP(мМ)
LPS
ДИКИЙ ТИП
Eros-/-
Eros-/-hEros
P2X7-/-
P2X7-/-hP2X7
F
IL-1β(пг/мл)
ATP(мМ)
LPS
ДИКИЙ ТИП
Eros-/-

ФИГ. 4


A
(кДа)
1 2 3 4
250
150
100
75
100
B
(кДа)
1 2 3 4 5
250
150
100
75
100
75
35
75
Na+/K+ АТФаза
HA
FLAG
C
TKO-mP2X7k
TKO-mP2X7k/mEros
DKO
DKO-mP2X7k
600
400
200
0
10^2
10^3
10^4
10^5
P2X7
D
mP2X7k-EGFP
mEros-EGFP
E
mP2X7k-EGFP/mEros-mCherry
СОВМЕЩЕНИЕ
F
mP2X7
mEros
(кДа)
1 2 3
1 2 3
1048
720
480
242
146
66
G
НА ВХОДЕ
I.P.
mP2X7k-FLAG + + + +
mEros-EGFP – + – +
(кДа)
1048
720
480
242
146
66
GFP
1048
720
480
FLAG