

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **044826**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.10.04

(21) Номер заявки
201891197

(22) Дата подачи заявки
2016.11.17

(51) Int. Cl. *A61K 45/00* (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)
A61P 11/00 (2006.01)

(54) **МОДУЛИРОВАНИЕ ЦИЛИОГЕНЕЗА**

(31) **1520258.3**

(32) **2015.11.17**

(33) **GB**

(43) **2019.08.30**

(86) **РСТ/EP2016/078075**

(87) **WO 2017/085225 2017.05.26**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:

**АКАДЕМИС ЗИКЕНХЕЙС ЛЕЙДЕН
А/Ю ЛЕЙДЕН ЮНИВЕРСИТИ
МЕДИКАЛ СЕНТЕР (NL)**

(72) Изобретатель:

Ван Бремпт Роналд Карел Луиза (NL)

(74) Представитель:

Фелицына С.Б. (RU)

(56) **WO-A1-2012127289**

ANN E. TILLEY ET AL.: "Cilia Dysfunction in Lung Disease", ANNUAL REVIEW OF PHYSIOLOGY, vol. 77, no. 1, 10 February 2015 (2015-02-10), pages 379-406, XP055335704, US, ISSN: 0066-4278, DOI:10.1146/annurev-physiol-021014-071931, the whole document

(57) Изобретение основывается на обнаружении того факта, что соединения, способные связываться (или взаимодействовать) с комплексами, участвующими в связывании/ремоделировании хроматина (например, с комплексом PRC1 группы Polycomb и с комплексом MLL группы Trithorax), и/или модулировать их, можно использовать для модулирования (например, для "включения"/"выключения") цилиогенеза, что может иметь место, например, в эпителии бронхов у человека. Предлагаются соединения, композиции, способы и лекарственные средства, которые применимы для лечения и/или профилактики заболеваний и/или состояний, связанных с аномальным или недостаточным цилиогенезом.

B1

044826

044826

B1

Область техники, к которой относится изобретение

Изобретение касается образования ресничек (цилиогенеза) в клетках. Предлагаются соединения, композиции, применения, медикаменты и способы для модулирования цилиогенеза, предотвращения и/или лечения заболеваний, связанных с ним.

Уровень техники

Белок, обозначенный R2R1 и принадлежащий к семейству белков FAM25, существенно важен для поддержания и регенерации эпителия легких, в частности программы базальных клеток. Эта его функция была обнаружена в экспериментах с первичными бронхиальными эпителиальными клетками (РВЕС), культивируемых методом глубинного выращивания. В условиях глубинного выращивания характерен быстрый клеточный рост недифференцированных РВЕС. Поэтому такие условия для культуры клеток отлично подходят для изучения базальных клеток - стволовых клеток эпителия воздухоносных путей (bronхов и легких) человека.

Потери несущих реснички клеток ведет к недостаточному удалению слизи и воздухоносных путей, в частности у больных с хроническим обструктивными поражениями легких (COPD). Собственно, этот симптом характерен для COPD: патологически измененный эпителий (недостаток реснитчатых клеток, плоскоклеточная дифференцировка и гиперплазия базальных клеток) не способен очищать дыхательные пути от слизи, бактерий, вирусов и грязи. Неэффективность механизма очищения приводит к серьезным симптомам, например, кашлю, инфекциям бронхов и легких и недостаточности газообмена в легких, что в результате повышает уровень смертности.

Цель данного изобретения - предложить соединения, композиции, медикаменты и способы для использования роли белка R2R1 в цилиогенезе, чтобы обеспечить лечение связанных с этим расстройств и заболеваний.

Раскрытие изобретения

Данное изобретение проистекает из открытия соединений, способных связываться (или взаимодействовать) с комплексами, участвующими в связывании/ремоделировании хроматина (например, PRC1 группы Polycomb и MLL группы Trithorax), и/или модулировать их же, которые можно использовать для модулирования цилиогенеза (например, "включения/выключения" его механизма), что может иметь место, например, в эпителии легких и бронхов у человека.

В частности, ген, обозначенный R2R1 (регенеративный ген респираторных клеток 1), кодирует белок, идентифицированный как связывающийся с компонентами репрессорного комплекса 1 Polycomb (PRC1) и а MLL группы Trithorax (TtxG-MLL). Комплекс PRC1 состоит из ряда конкратных белков группы Polycomb (PcG). Комплекс TtxG-MLL (называемый также COMPASS-подобным комплексом) состоит из ряда конкретных белков группы Trithorax (TtxG). Взаимодействие белка R2R1 и комплексов PRC1/ttxG-MLL или белков PcG или TtxG приводит к модулированию цилиогенеза в клетках бронхиального эпителия у человека.

В первом аспекте данного изобретения предлагаются соединения, которые связываются, ассоциированы или взаимодействуют с комплексами, участвующими в связывании/ремоделировании хроматина, с целью их использования при лечении и/или профилактике заболеваний и/или состояний, сопровождающихся аномальным или неполноценным цилиогенезом.

Также предлагается применение соединений, которые связываются, ассоциированы или взаимодействуют с комплексами, участвующими в связывании/ремоделировании хроматина, при изготовлении медикаментов для лечения и/или предотвращения заболеваний и/или состояний, сопровождающихся аномальным или неполноценным цилиогенезом.

Также предлагается способ лечения и/или предотвращения заболеваний и/или состояний, сопровождающихся аномальным или неполноценным цилиогенезом, включающий этап введения нуждающемуся в том индивиду терапевтически эффективного количества соединения, которое связывается, ассоциировано или взаимодействует с комплексами, участвующими в связывании/ремоделировании хроматина. Комплексы типа PRC1 компактизуют хроматин и подавляют его ремоделирование. Так же и комплекс MLL группы Trithorax (TtxG-MLL) участвует в связывании/ремоделировании хроматина.

Таким образом, в другом аспекте данного изобретения предлагаются соединения, которые связываются, ассоциированы или взаимодействуют с PRC1 и/или TtxG-MLL для использования при лечении и/или профилактике заболеваний и/или состояний, сопровождающихся аномальным или неполноценным цилиогенезом.

В еще одном аспекте данного изобретения предлагается применение соединений, которые связываются, ассоциированы или взаимодействуют с PRC1 и/или TtxG-MLL, при изготовлении медикаментов для лечения и/или предотвращения заболеваний и/или состояний, сопровождающихся аномальным или неполноценным цилиогенезом.

Данным изобретением также предлагается способ лечения и/или предотвращения заболеваний и/или состояний, сопровождающихся аномальным или неполноценным цилиогенезом, включающий этап введения нуждающемуся в том индивиду терапевтически эффективного количества соединения, которое связывается, ассоциированы или взаимодействуют с PRC1 и/или TtxG-MLL.

Если не вдаваться в теоретические рассуждения и учесть разъясненное подробнее ниже, то можно сказать, что авторы данного изобретения обнаружили способность белка R2R1 связываться или ассоции-

ровать/взаимодействовать с компонентами (например, с белками или пептидными компонентами) комплексов, участвующих в связывании/ремоделировании хроматина, в том числе, например, с комплексами PRC1 и TrxG-MLL; при этом белок R2R1 может действовать как "включатель/выключатель" цилиогенеза в эпителии бронхов у человека. Соответственно, соединения, которые модулируют или имитируют экспрессию, функции и/или активность R2R1, можно использовать в качестве средства модулирования (например, восстановления, усиления или подавления - иными словами, "включения/выключения") цилиогенеза в клетках и/или в качестве основы для лечения заболеваний, состояний и/или синдромов, вызванных или обусловленных аномальным или неполноценным цилиогенезом. Возможно, что соединения, которые модулируют или имитируют экспрессию, функции и/или активность R2R1, связываются или как-то иначе ассоциируют со сайтами связывания белка R2R1, которые имеются в комплексах, участвующих в связывании/ремоделировании хроматина, в том числе, в комплексах PRC1/TrxG-MLL или в каких-то (или определенных) их компонентах. Следствием связывания или ассоциации с сайтами связывания R2R1 в комплексах PRC1/TrxG-MLL или в их компонентах может быть модулирование цилиогенеза в клетках. Таким образом, соединения, которые связываются и/или ассоциируют с сайтами связывания R2R1 в этих комплексах (например, в сайтах связывания R2R1 в комплексах RC1/TrxG-MLL), можно использовать для модулирования цилиогенеза и/или при лечении и/или предотвращении заболеваний, состояний и/или синдромов, вызванных, или обусловленных, или сопровождающихся аномальным или неполноценным цилиогенезом.

В свете сказанного выше данное изобретение относится к соединениям для применения (способным связываться, ассоциировать или взаимодействовать с комплексами, участвующими в связывании/ремоделировании хроматина, PRC1, TrxG-MLL, и/или с имеющимися в них сайтами связывания R2R1), композициям для применения (содержащими одно или более соединений, способных связываться, ассоциировать или взаимодействовать с комплексами, участвующими в связывании/ремоделировании хроматина, PRC1, TrxG-MLL, и/или с имеющимися в них сайтами связывания R2R1), применениям композиций/медикаментов, содержащих соединения, способные связываться, ассоциировать или взаимодействовать с комплексами, участвующими в связывании/ремоделировании хроматина, PRC1, TrxG-MLL, и/или с имеющимися в них сайтами связывания R2R1, и к способам использования указанных соединений/композиций/медикаментов. Кроме того, данное соединение относится к соединениям (для применения), композициям (для применения), медикаментам (для применения) и способам использования соединений, которые имитируют или модулируют экспрессию, функции и/или активность R2R1. Соединения, которые имитируют функции R2R1, могут проявлять одно или более свойств и/или функций белка R2R1 дикого типа. Например, соединение, имитирующее R2R1, может связываться или ассоциировать с PRC1, TrxG-MLL или их компонентом или субъединицей. Соединения, имитирующие R2R1, могут, например, связываться или ассоциировать с комплексами, участвующими в связывании/ремоделировании хроматина, PRC1, TrxG-MII или их компонентами посредством сайтов связывания R2R1 - иными словами, соединения, имитирующие R2R1, могут связываться или ассоциировать/взаимодействовать с сайтами связывания R2R1 комплексов, участвующих в связывании/ремоделировании хроматина, PRC1 и/или TrxG-MII. Соединения, которые модулируют экспрессию, функции и/или активность R2R1, могут усиливать или подавлять его экспрессию, функции и/или активность. Соединения для применения по данному изобретению могут препятствовать связыванию, предотвращать связывание, или ингибировать связывание нативного R2R1 или R2R1 дикого типа с PRC1/TrxG-MLL и/или их компонентами или субъединицами.

В настоящем документе в отношении этих аспектов и воплощений данного изобретения употребляются термины: соединения, композиции, применения, медикаменты/лекарственные средства и способы. Далее в настоящем описании употребляются обозначения "PRC1" и "TrxG-MII" - они относятся к примерам (не имеющим ограничительного характера) комплексов, участвующих в связывании/ремоделировании хроматина.

Следует принять во внимание, что в настоящем описании слово "содержащий" употребляется для обозначения тех аспектов и воплощений данного изобретения, в которых содержится конкретный признак или признаки. Однако следует учесть, что слово "содержащий" также относится к аспектам и/или воплощениям данного изобретения, состоящим из или состоящим в основном из признака или признаков, о которых идет речь.

Репрессорный комплекс Polycomb 1 (PRC1) - это мультибелковый комплекс, и соединения, используемые в различных аспектах и воплощениях данного изобретения (а именно в применениях, композициях, медикаментах и способах) включают такие соединения, которые связываются или ассоциируют с одной или более субъединиц PRC1 или с каким-либо сайтом связывания R2R1 в составе комплекса. Известно, что в комплексе PRC1 имеет место обмен его компонентов, так что существуют канонические и неканонические комплексы PRC1. Влияние PRC1 на хроматин (убиквитинилирование гистона H2A, рекрутинг PRC2 и содействие PRC2 в его репрессорной форме) определяется его различными белковыми компонентами. Отметим, однако, что всегда присутствует субъединица RNF2 (RING finger protein 2/белок 2 содержащий домен RING) комплекса PRC1. В контексте данного изобретения в различных композициях, применениях, медикаментах и способах может использоваться соединение, способное свя-

зваться с субъединицей RNF2 комплекса PRC1. Мишенью соединения, способного связываться или ассоциировать с RNF2, может быть сайт связывания R2R1.

Соединения, используемые в различных аспектах и воплощениях данного изобретения (а именно в применениях, композициях, медикаментах и способах) включают такие соединения, которые связываются или ассоциируют с компонентом модифицирующего хроматин TrxG-MLL (от англ. группа Trithorax group - Mixed lineage leukemia)). В отличие от PRC1, TrxG-MLL обеспечивает активную генную экспрессию путем метилирования H3K4. На деле функции TrxG-MLL и PRC1 комплементарны: PRC1 обеспечивает репрессорные модификации хроматина и, соответственно, находится во взаимном противодействии с комплексом TrxG-MLL, который регулирует модификации хроматина, необходимые для активации транскрипции. В комплексе TrxG-MLL имеется коровая структура, в свою очередь содержащая ряд белковых субъединиц, в том числе, например, белки, обозначаемые DPY-30 и ASH2L. Эти два белка всегда присутствуют в различных комплексах TrxG-MLL и важны для (три)метилирующей активности TrxG-MLL в отношении гистона H3 Lys-4. Соединения по данному изобретению могут связываться или ассоциировать с комплексом TrxG-MLL при посредстве компонентов DPY-30 и/или ASH2L. Иными словами, соединения, используемые по данному изобретению, связываются или ассоциируют с DPY-30 и/или ASH2L. Мишенью соединений, способных связываться или ассоциировать с компонентами DPY-30 и/или ASH2L могут быть сайты связывания R2R1 в том или другом (или в обоих) из этих компонентов.

Соединения, используемые в различных аспектах и воплощениях данного изобретения (а именно, в применениях, композициях, медикаментах и способах) включают также соединения, которые связываются белком SF3B2 - компонентом неканонических комплексов PRC1. В контексте данного изобретения в различных композициях, применениях, медикаментах и способах может использоваться соединение, способное связываться с субъединицей SF3B2 комплекса PRC1. Мишенью соединения, прицельно связывающегося с сайтом связывания R2R1 субъединицы SF3B2 комплекса PRC1, может быть имеющийся в нем сайт связывания R2R1.

Соединения, используемые в различных аспектах данного изобретения (соединения, которые связываются или ассоциируют с комплексами PRC1 и TrxG-MLL, включая их компоненты, субъединицы и/или сайты связывания R2R1, могут быть представлены нуклеиновыми кислотами (молекулами нуклеиновых кислот - РНК, ДНК и/или синтетическими/искусственными формами), антисмысловыми олигонуклеотидами, углеводами, белками, пептидами, низкомолекулярными соединениями, антителами (в том числе их фрагментами, связывающими антиген или мишень).

Молекулы нуклеиновых кислот (полинуклеотиды), используемые по данному изобретению в качестве агентов, обеспечивающих экспрессию или кодирующих белок/пептиды R2R1, которые (i) связываются с любым из описанных выше комплексов, (ii) связываются с любым имеющимся в них сайтом связывания R2R1 или (iii) сами модулируют функцию, экспрессию и/или активность R2R1), могут быть производными нуклеотидной последовательности, обозначенной в настоящем документе SEQ ID NO: 1 и приведенной ниже, или содержать эту последовательность.

SEQ-ID-NO: 1

acactgacacggaccgaaggagtggaaaaagctttacctgtcactgtctgtgcccatacATGCTGGGAGGCCTGGGGA
AGCTGGCGGCCGAGGGCCTGGCCCACCGCACAGAGAAAGCCACTGGGGGAGCAGTT
CACGCAGTGGAAGAGGTTGGTGAGCGAGGTGGTGGGCCACGCCAAGGAGGTTGGAG
AGAAGACCATTAATGACGCCCTAAAGAAAGCCCAAGAATCAGGAGACAGGGTGGT
GAAGGAGGTCACTGAGAAGGTCACCCACACCATCACTGATGCTGTTACCCATGCGG
CAGAAGGCCTGGGAAGACTGGGACAGtgagcctgctaccagcatggctggccctcctgaaggtcaataaaga
gtgtgaacgtgaaaaaaaaaaaaaaaaatacaaaaaaaaaaaaaaaaaa

Последовательность SEQ ID NO: 1 является примером транскрипта гена R2R1 мыши. Кодирующая или транслируемая часть данной последовательности (подчеркнута) содержит около 267 нуклеотидов. Эта часть последовательности SEQ ID NO: 1 обозначена особо как последовательность SEQ ID NO: 2. Молекулы нуклеиновых кислот (полинуклеотиды), используемые по данному изобретению, могут быть производными нуклеотидной последовательности, обозначенной SEQ ID NO: 3 и приведенной ниже, или содержать эту последовательность.

SEQ ID NO: 3

actgtctgtgccacacgATGCTGGGAGGCCTGGGGAAGCTGGCTGCCGAAGGCCTGGCCAC
CGCACCGAGAAGGCCACCGAGGGAGCCATTCATGCCGTGGAAGAAGTGGTGAAGG
AGGTGGTGGGACACGCCAAGGAGACTGGAGAGAAAGCCATTGCTGAAGCCATAAA
GAAAGCCCAAGAGTCAGGGGACAAAAAGATGAAGGAAATCACTGAGACAGTGACC
AACACAGTCACAAATGCCATCACCCATGCAGCAGAGAGTCTGGACAAACTTGGACA
Gtgagtgcacctgtaccacggcccttccccagtctcaataaaaagccatgacatgtg

Последовательность SEQ ID NO: 3 является примером транскрипта гена R2R1 человека. Кодирующая или транслируемая часть данной последовательности (подчеркнута) содержит около 267 нуклеотидов. Эта часть последовательности SEQ ID NO: 1 обозначена особо как последовательность SEQ ID NO: 4.

Указанные 267 нуклеотидов последовательности SEQ ID NO: 2 кодируют белок/полипептид, содержащий 89 аминокислотных остатков и имеющий приведенную ниже последовательность, обозначенную SEQ ID NO: 5.

SEQ ID NO: 5

MLGGLGKLA AEGLAHRTEKATGGAVHAVEEVVSEVVGHAKVEGKKTINDALKKAQES
 GDRVVKEVTEKVTHTITDAVTHAAEGLGRLGQ

Указанные 267 нуклеотидов последовательности SEQ ID NO: 4 кодируют белок/полипептид, содержащий 89 аминокислотных остатков и имеющий приведенную ниже последовательность, обозначенную SEQ ID NO: 6.

SEQ ID NO: 6

MLGGLGKLA AEGLAHRTEKATEGAIVHAVEEVVKEVVGHAKETGEKAI AEAIKKAQESG
 DKMKKEITETVTNTVTNAITHAAESLDKLGQ

Таким образом, данное изобретение относится к нуклеотидным последовательностям, содержащим полностью или частично (участок или фрагмент) последовательности SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 4, к кодируемым ими аминокислотным последовательностям SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6, а также к аминокислотным последовательностям, содержащим полностью или частично (участок или фрагмент) последовательности SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6. Данное изобретение относится также к нуклеотидным и/или аминокислотным последовательностям, обладающим определенной степенью идентичности и/или гомологии с полными последовательностями SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6, или их частями (фрагментами).

Для удобства далее в настоящем документе последовательности SEQ ID NOS: 1-6 (каждая из которых кодирует или обеспечивает экспрессию белков R2R¹) называются референсными последовательностями.

Фрагмент референсной последовательности по настоящему описанию может содержать любое количество нуклеотидов/аминокислотных остатков. Например, фрагмент, используемый по данному изобретению, может содержать от около 1-5 нуклеотидов/аминокислотных остатков до около n-1, где "n" - общее число нуклеотидов/аминокислотных остатков в референсной последовательности. Например, фрагмент или часть референсной последовательности по данному изобретению может содержать по меньшей мере около 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 75, 80, 85, 88, 90, 95, 100, 150, 200, 250, 265, 266, 267, 300, 341, 350, 400 или 424 нуклеотидов/аминокислотных остатков; верхний предел (n-1) зависит от размеров (n) нуклеотидной последовательности, кодирующей полноразмерный белок или от числа (n) аминокислотных остатков, составляющих полную первичную последовательность белка.

Гомологичные или идентичные последовательности могут быть природными, имеющимися у млекопитающих, например у грызунов и/или человека. Используя нуклеотидные и/или аминокислотные последовательности, описанные в настоящем документе, специалист в данной области техники может без особого труда идентифицировать родственные (например, гомологичные или идентичные) последовательности в пределах более длинных геномных последовательностей и у других видов живых организмов, например у других млекопитающих и проч. Например, нуклеотидную последовательность, являющуюся производной от любой из нуклеотидных последовательностей, описанных в настоящем документе, можно использовать в качестве зонда для выявления гомологичных/идентичных или близко родственных последовательностей в геномах других видов живых организмов (отличных от мышей и человека).

Получить гомологичные или идентичные последовательности возможно с помощью, например, молекулярно-биологических методов, в том числе секвенирования, полимеразной цепной реакции (PCR) и/или клонирования. Специалистам в данной области техники должно быть ясно, что последовательности, гомологичные или идентичные любой из последовательностей, описанных в настоящем документе (называемых здесь референсными), включая функциональные фрагменты таких последовательностей, могут характеризоваться по меньшей мере приблизительно 20-30% гомологией или идентичностью с полной или частичной соответствующей последовательности или ее фрагментом. В других случаях гомологичные или идентичные последовательности могут проявлять по меньшей мере 40, 50, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% гомологии или идентичности любой из описанных в настоящем документе последовательностей. Например, последовательности SEQ ID NOS: 2 и 4, обе являющиеся нуклеотидными последовательностями, используемыми по данному изобретению (либо сами по себе в роли медикаментов, либо в качестве последовательностей, кодирующих используемые по данному изобретению белки или пептиды) на 81,3% идентичны на протяжении всей своей длины (267 аминокислотных остатка). Так, в случае, например, последовательности SEQ ID NO: 2, можно использовать последовательности, которые на около 80% идентичны/гомологичны. При выравнивании последовательностей SEQ ID NOS: 1 и 3, степень идентичности составляет около 64%, так что в случае, например, последовательности SEQ ID NO: 1, можно использовать последовательности, которые на около 64% идентичны/гомологичны.

Степень гомологии (или процент) между двумя или более аминокислотными или нуклеотидными последовательностями оценивают путем выравнивания сравниваемых последовательностей; при этом определяют количество нуклеотидов/аминокислотных остатков в выровненных положениях, которые в этих последовательностях идентичны или не идентичны, но различие является синонимичной заменой нуклеотида (то не влияющей на то, какая аминокислота окажется в данном положении) или приводящим к консервативным аминокислотным заменам. Гомологию можно оценивать с помощью программ BLAST (Basic Local Alignment Search Tool; см. Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J. (1990) "Basic local alignment search tool." J. Mol. Biol. 215:403-410).

Степень (или процент) идентичности двух или более аминокислотных или нуклеотидных последовательностей также оценивают путем выравнивания сравниваемых последовательностей, где при этом определяют отношение количества точно совпадающих нуклеотидов/аминокислотных остатков в этих выровненных последовательностях к общему количеству нуклеотидов/аминокислотных остатков в сравниваемых последовательностях и, умножая полученную величину на 100, тем самым получая процент идентичности этих последовательностей.

Каждая из референсных последовательностей кодирует белок или пептид, связывающийся, взаимодействующий или иначе ассоциированный с компонентом (одним или более) или сайтом связывания R2R1 комплекса PRC1 и/или комплекса TtxG-MLL; используемые по данному изобретению фрагменты любой из референсных последовательностей, описанных в настоящем документе, или используемые по данному изобретению последовательности, обладающие необходимой степенью гомологии или идентичности с любой из последовательностей SEQ ID NOS: 1-6 (или их фрагментами) кодируют или обеспечивают экспрессию функционального белка или пептида - то есть белка или пептида, проявляющего способность связываться с (или обладающего сродством к) комплексу PRC1 и/или комплексу TRXG-MLL, и/или компонентам или субъединицам того или другого. Белок или пептид, проявляющий способность связываться/ассоциировать с (или обладает сродством к) комплексу PRC1 и/или комплексу TRXG-MLL, может связываться/ассоциировать с (или обладает сродством к) имеющимся в них сайтами связывания R2R1.

В свете сказанного выше соединения, используемые в различных аспектах данного изобретения, содержат (или состоят из, или в основном состоят из) нуклеиновые кислоты, описанные в настоящем документе (например, нуклеиновые кислоты, представленные последовательностями SEQ ID NO: 1, 2, 3 или 4); пептиды/белки, кодируемые этими нуклеиновыми кислотами, а также любые белки или пептиды, описанные в настоящем документе (например, белки или пептиды, представленные последовательностями SEQ ID NO: 5 или 6); нуклеотидные или аминокислотные последовательности, включающие части или фрагменты описанных в настоящем документе нуклеотидных/аминокислотных последовательностей; нуклеотидные или аминокислотные последовательности, обладающие определенной степенью гомологии или идентичности с нуклеотидными или аминокислотными последовательностями, описанными в настоящем документе.

Кроме того, по данному изобретению могут использоваться варианты нуклеотидных или аминокислотных последовательностей. Например, вариант нуклеотидной или аминокислотной последовательности может быть природным-содержащим, или заключающим в себе, или включающим один или более полиморфизмов или вставок, замен, инверсий или делеций нуклеотидов/аминокислотных остатков по сравнению с референсной последовательностью по данному изобретению. В данной области техники хорошо известно, что из-за вырожденности генетического кода возможны замены одного или более азотистых оснований в кодоне, не отражающиеся в соответствующей аминокислотной последовательности. И можно использовать вырожденность генетического кода, чтобы получить вариант нуклеотидной по-

следовательности, кодирующей пептид или белок, аминокислотная последовательность которого в основном идентична референсной последовательности, описанной в настоящем документе. Варианты последовательностей, используемые по данному изобретению, также можно получить путем внесения в последовательность одной или более консервативных замен. Специалистам в данной области техники понятно, что термин "консервативная замена" охватывает факты замены, например, одного или более аминокислотных остатков в референсной аминокислотной последовательности белка или пептида по данному изобретению на остаток (остатки) другой, но сходной по своим свойствам аминокислоты, так что замена существенно не влияет на физико-химические свойства и/или структуру или функции нативного белка или белка дикого типа.

Собственно говоря, нужно учитывать, что все такие варианты, особенно те, которые функциональны, или проявляют нужную активность, или кодируют функциональные пептиды/белки (то есть белки/пептиды, проявляющие способность связываться или ассоциировать с комплексами PRC1 и/или TrxG-MLL, и/или компонентами, или субъединицами какого-либо из них), можно использовать по данному изобретению.

По данному изобретению могут использоваться соединения (например, ингибиторы), модулирующие в клетках экспрессию генов R2R1 (примеры последовательностей которых представлены последовательностями SEQ ID NOS: 1-4, приведенными выше) и/или активность, функции и/или экспрессию белков/пептидов R2R1 (примеры последовательностей которых представлены последовательностями SEQ ID NOS: 5 и 6, приведенными выше). Например, соединения, используемые по данному изобретению, могут быть представлены антисмысловыми олигонуклеотидами или ингибиторами типа интерферирующих РНК. Такие соединения предназначены для вмешательства в процессы транскрипции/трансляции, имея своей мишенью определенные последовательности ДНК или РНК. Антисмысловые олигонуклеотиды/соединения содержат ДНК и/или РНК и используются для значительного снижения или полного нивелирования уровня экспрессии гена R2R1 или его белкового продукта. Например, антисмысловая последовательность ДНК может содержать короткую последовательность, комплементарную части какой-либо из референсных нуклеотидных последовательностей, описанных в настоящем документе. Например, антисмысловая нуклеотидная последовательность может содержать от около 5 до около 50 подряд непрерывно расположенных нуклеотидов какой-либо из последовательностей, представленных в настоящем документе как SEQ ID NOS: 1-4. Антисмысловая последовательность РНК, используемая по данному изобретению, может быть комплементарна определенной части матричной РНК для R2R1. Другие антисмысловые или ингибирующие молекулы РНК/ДНК, используемые по данному изобретению, включают микроРНК, малые/короткие интерферирующие РНК (миРНК) или короткие РНК, образующие "шпильки" (кшРНК). Такие олигорибонуклеотиды могут быть представлены нативными двухцепочечными РНК или двухцепочечными РНК, тем или иным образом модифицированные (например, химически) для приобретения устойчивости к действию нуклеаз. Также (или же) олигорибонуклеотиды могут быть представлены короткими РНК, образующими "шпильки" (кшРНК), входящими в состав экспрессионных или плазмидных конструкций, которые соответствуют описанному в настоящем документе малым интерферирующим РНК или содержат их. Предпочтительно, интерферирующие РЕК, которые потенциально пригодны для использования по данному изобретению, являются двухцепочечными молекулами РНК. Во всех случаях антисмысловые ДНК или РНК содержат последовательности, комплементарные нуклеотидным последовательностям, соответствующим последовательностям R2R1, описанным в настоящем документе. Отметим, что для всех описанных в настоящем документе применений методов с использованием антисмысловых молекул известны способы и протоколы для достижения регуляции генной экспрессии с помощью антисмысловых молекул, и для создания пригодных по данному изобретению антисмысловых молекул/олигомеров можно использовать алгоритмы, позволяющие с помощью компьютера предсказывать антисмысловые последовательности с оптимальным ингибирующим эффектом в отношении данного гена.

По данному изобретению можно использовать рекомбинантные соединения, в частности, рекомбинантные белки/пептиды и/или нуклеотидные последовательности. Например, специалист в данной области техники, воспользовавшись описанными в настоящем документе референсными последовательностями, может с помощью молекулярно-биологических методов, включая клонирование и полимеразную цепную реакцию (PCR), получить рекомбинантные последовательности, соответствующие R2R1 и/или пептидам/белкам для использования по данному изобретению. Дополнительную информацию относительно применения методов на основе клонирования и полимеразной цепной реакции для получения рекомбинантных последовательностей можно найти, например, в работах PCR Primer: A Laboratory Manual, Second Edition Edited by Carl W. Dieffenbach & Gabriela S. Dveksler: Cold Spring Harbour Laboratory Press and Molecular Cloning: A Laboratory Manual by Joseph Sambrook & David Russell: Cold Spring Harbour Laboratory Press.

Соединения, используемые по данному изобретению, могут содержать антитела (включая антиген-связывающие и мишень-связывающие фрагменты). Это антитела, связывающиеся с белками/пептидами R2R1 или его эпитопами, или с эпитопами, соответствующими сайту связывания, занятому R2R1 в сайтах связывания комплексов PRC1 и/или TrxG-MLL (или расположенными там). Термин "антитела"

включает поликлональные и/или моноклональные антитела и, например, изотипы IgG, IgM, IgD, IgE и/или IgA. Термин "фрагменты антитела/антительные фрагменты" следует понимать как включающий фрагменты антительных молекул, содержащие одну или обе легких цепи и/или одну или обе тяжелых цепи, а также включающий фрагменты, обозначаемые Fab, Fab₂ и scFv. Антитела и их фрагменты, пригодные по данному изобретению, функциональны и включают антительные молекулы и их фрагменты, способные мешать связыванию R2R1 с комплексом PRC1 и/или с комплексом TrxG-MLL, или блокировать, или нейтрализовать это связывание. Или же антитела и их фрагменты, используемые по данному изобретению, связываются с сайтом связывания R2R1 в комплексе PRC1 и/или в комплексе TrxG-MLL. Антитела или их функциональные фрагменты, связывающиеся с сайтом связывания R2R1 в комплексе PRC1 и/или в комплексе TrxG-MLL, можно использовать, чтобы влиять на функцию, подобную таковой R2R1. Иными словами, такие антитела или их функциональные фрагменты можно использовать вместо R2R1 как заменяющие этот белок в выполнении его функции.

Как сказано выше, термин антитела в настоящем документе включает поликлональные и/или моноклональные антитела. Поликлональные антитела - это гетерогенные популяции антительных молекул, источником которых является сыворотка крови животных, иммунизированных каким-либо антигеном или функциональным производным антигена. Таким образом, чтобы получить поликлональные антитела, специфичные, или имеющие сродство к R2R1, нужно иммунизировать животное-хозяина, например кролика, овцу, свинью и др., белком/пептидом R2R1 (например, ввести его путем инъекции), например белком или пептидом, кодируемым или представленным описанной в настоящем документе последовательностью, или его подходящим (кодирующим антигенный белок/пептид) фрагментом. После иммунизации в организме животного образуются антитела, специфичные и/или обладающие сродством к R2R1, и их можно выделить из сыворотки крови. Моноклональные антитела - это гомогенная популяция антител, обладающих специфичностью/сродством к определенному антигену или его эпитопу. Их можно получить в результате любым методом, обеспечивающим образование антительных молекул клетками непрерывных линий в культуре. Эти методы включают (не ограничиваясь перечисленным здесь) гибридомный метод Келера-Милштейна (Kohler and Milstein (1975), Nature 256:495-497; and US Pat. No. 4,376,110), использование гибридом из человеческих В-клеток (Kosbor et al., 1983, Immunology Today 4:72; Cole et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80:2026-2030), и (EBV) (Cole et al., 1985, Monoclonal Anti-bodies and Cancer Therapy гибридомы из клеток, трансформированных вирусом Эпштейна-Барр, Alan R. Liss, Inc., pp.77-96). Моноклональные антитела, используемые по данному изобретению, можно получать, применяя методы с использованием нуклеотидных или аминокислотных последовательностей белков или пептидов, описанных в настоящем документе, например белков или пептидов, кодируемых нуклеотидными последовательностями из числа представленных как SEQ ID NO: 1-4 или SEQ ID NOS: 5 или 6).

Соединения, используемые по данному изобретению, также включают низкомолекулярные вещества (например, низкомолекулярные органические соединения), способные заменять R2R1 или подавлять его эффекты. Например, по данному изобретению можно использовать небольшие молекулы, которые (i) мешают или препятствуют связыванию R2R1 с RNF2, DPY-30/ASH2L или SF3B2; (ii) подавляют связывание R2R1 с RNF2, DPY-30/ASH2L или SF3B2; (iii) способствуют связыванию R2R1 с RNF2, DPY-30/ASH2L или SF3B2 или же (iv) модулируют связывание R2R1 с RNF2, DPY-30/ASH2L или SF3B2.

Соединения, которые подходят для использования по данному изобретению (а именно, соединения, модулирующие цилиогенез и/или пригодные для использования при восстановлении цилиогенеза и/или лечении или предотвращении заболеваний, связанных с нарушениями цилиогенеза), можно идентифицировать с помощью методов, предполагающих получение пробных соединений, контактирование этих соединений с клетками и определение влияния (или его отсутствия) такого контакта на цилиогенез в данной клетке. Модулирование цилиогенеза можно выявить по каким-либо образом наблюдаемому усилению или ослаблению цилиогенеза и/или образования ресничек, по развитию активности, связанной с интенсивностью цилиогенеза или образования ресничек, в сравнении с клетками, не контактировавшими с пробными агентами. Для применения подобных методов пригодны любые клетки, способные претерпевать или осуществлять цилиогенез. Такими клетками могут служить не дифференцированные, дифференцирующиеся или дифференцированные первичные бронхиальные эпителиальные клетки (PBEC, взятые у людей (донорские)). Или это могут быть не дифференцированные, дифференцирующиеся или дифференцированные индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (iPS) с генетическими модификациями или без них. Например, в клетках iPS Cell может быть модифицирован ген (гены), кодирующий R2R1. Такие клетки культивируют в специфических условиях, например в виде монослоя, в суспензии или на разделе фаз воздух-жидкость.

Термин "аномальный или неполноценный цилиогенез" включает избыточный или неадекватный цилиогенез или условия, в которых процесс или процессы, имеющие отношение к цилиогенезу, прекращены, подавлены или неэффективны (или становятся таковыми). Термин "аномальный или неполноценный цилиогенез" включает заболевания или состояния, называемые цилиопатиями в широком смысле. Потери в цилиогенезе приводят к патологическим изменениям эпителия бронхов.

Для специалистов в данной области техники понятно, что цилиогенез является важным процессом, ведущим к формированию реснитчатых (мерцательных) клеток, которые играют ключевую роль в удале-

нии слизи из воздухоносных путей. При утрате реснитчатых клеток (например, из-за тех или иных форм аномального или неполноценного цилиогенеза) очищение воздухоносных путей от слизи становится неэффективным, что имеет место у больных, например, с хроническими обструктивными поражениями легких (COPD). В таких случаях патологически измененный эпителий бронхов (отличающийся утратой реснитчатых клеток, плоскоклеточной дифференцировкой и гиперплазией базальных клеток) не способен обеспечить очищение воздухоносных путей от слизи, бактерий, вирусов и грязи. Неэффективность механизма очищения приводит к серьезным симптомам, например, кашлю, инфекциям бронхов и легких и недостаточности газообмена в легких. С такими осложнениями часто ассоциировано повышение уровня смертности.

Различные соединения, описанные в настоящем документе, а именно способные связываться, или взаимодействовать, или ассоциировать с комплексом PRC1 и/или с комплексом TgG-MLL и представленные нуклеотидными последовательностями (смысловыми/антисмысловыми ДНК/РНК), белками/пептидами, низкомолекулярными соединениями и/или антителами, можно использовать при восстановлении или коррекции цилиогенеза в клетках с аномальным или неполноценным (например, ослабленным, подавленным, нарушенным, недостаточным или отсутствующим) цилиогенезом, как описано выше. Другие соединения, например, нуклеотидные последовательности (смысловые/антисмысловые ДНК/РНК), белки/пептиды, низкомолекулярные соединения и/или антитела, могут служить для подавления или снижения уровня цилиогенеза в клетках.

Для специалистов в данной области техники понятно, что аномальным будет любой вариант цилиогенеза, при котором его уровень по сравнению с нормальным уровнем, имеющим место в здоровых клетках, повышен или понижен. Аномальный цилиогенез - будь то с повышенным уровнем или пониженным - ассоциирован с рядом заболеваний, в том числе болезней, относимых к цилиопатиям, например с первичной цилиарной дискинезией, гидроцефалией, поликистозом печени и поражениями почек, некоторыми формами дегенерации сетчатки, а также нефронофтизом, синдромом Барде-Бидля, синдромом Альстрема и синдромом Меккеля-Грубера. Аномальный или неполноценный цилиогенез может быть причиной или фактором заболеваний дыхательных путей, включая легкие, например хронических обструктивных заболеваний легких и подобных состояний. Различные соединения, описанные в настоящем документе, а именно способные связываться, или взаимодействовать, или ассоциировать с комплексом PRC1 и/или с комплексом TgG-MLL, можно использовать при лечении и/или профилактике цилиопатий и/или хронических обструктивных заболеваний легких. Например, соединения по данному изобретению можно использовать для восстановления цилиогенеза у больных с хроническими обструктивными заболеваниями легких или предрасположенных, и/или восприимчивых к ним.

Соединения, используемые по данному изобретению, могут входить в состав композиций для введения нуждающимся в том индивидам. Эти соединения предлагаются в виде фармацевтических композиций. Композиция, используемая по данному изобретению, содержит подходящие (например, фармацевтически приемлемые) эксципиенты, разбавители и/или буферные растворы. Соединения по данному изобретению могут входить в состав фармацевтической композиции вместе с одним или более другими соединениями, предназначенными для введения больным - например, вместе с одним или более другими медикаментами, нужными для предотвращения и/или лечения других заболеваний, и/или заболеваний и/или состояний, ассоциированных с цилиогенезом. Предпочтительно фармацевтические композиции по данному изобретению являются стерильными.

Эксципиенты, носители или разбавители, пригодные по данному изобретению, включают, например, воду, солевой (физиологический) раствор, солевой раствор, забуференный фосфатом (PBS), декстрозу, глицерин, этиловый спирт, ионообменные агенты, оксид алюминия, стеарат алюминия, лецитин, сывороточные белки (например, сывороточный альбумин), забуферивающие вещества (например, фосфаты), глицин, сорбиновую кислоту, сорбат калия, смеси неполных глицеридов насыщенных жирных кислот растительного происхождения, соли или электролиты (например, протаминсульфат, двузамещенный фосфат натрия, двузамещенный фосфат калия, хлорид натрия, соли цинка, коллоидный диоксид кремния, трисиликат магния), поливинилпирролидон, производные целлюлозы, полиэтиленгликон, карбоксиметилцеллюлоза натрия, полиакрилаты, воска, блок-полимеры полиэтилена-полипропилена, полиэтиленгликоль, ланолин и др., или их комбинации.

Фармацевтический препарат, используемый по данному изобретению, может быть представлен, например, лекарственной формой, пригодной для приема через рот, или для парентерального введения, или для введения через слизистые оболочки, или для местного применения. Композиция по данному изобретению может быть составлена таким образом, что ее можно вдыхать. Композиции, предназначенные для вдыхания, могут быть представлены такими лекарственными формами, как порошки или растворы, которые можно превратить в аэрозоль и вдыхать в капельном виде. Специалистам в данной области техники должны быть известны устройства, используемые для доставки композиций по данному изобретению непосредственно в легкие, например путем вдыхания. Размеры частиц или капелек композиции можно изменять так, чтобы лекарство достигало различных областей легких. Например, ингалированные мелкие частицы или капельки могут проникать глубоко в легочную ткань и в некоторых случаях достигают альвеол.

Композиции по данному изобретению, пригодные для перорального приема, в которых носитель является твердой субстанцией, наиболее предпочтительно представлены лекарственными формами в виде разовых доз, например в виде крупных пилюль, капсул или таблеток, каждая из которых содержит заранее определенное количество одного или более соединений по данному изобретению, связывающихся с комплексом PRC1 и/или комплексом TrxG-MLL. Таблетки изготавливают путем прессования или формования, при необходимости с использованием одного или более вспомогательных ингредиентов. Прессованные таблетки получают при помощи подходящей таблетировающей машины из взятых в виде свободно-сыпучей субстанции (например, в виде порошка или гранул) активных соединений (одного или более), связывающихся с комплексами PRC1 и/или TrxG-MLL; при необходимости активное соединение в свободно-сыпучей форме смешивают со связующим агентом, агентом, улучшающим скольжение, инертным разбавителем, смазывающим агентом, поверхностно-активным веществом или диспергирующим агентом. Формованные таблетки получают, формуя их из активных соединений (одного или более), связывающихся с комплексами PRC1 и/или TrxG-MLL, взятых вместе с инертным жидким разбавителем. При необходимости таблетки покрывают оболочкой, а если они без оболочки, то при необходимости на них наносят риску - линию разлома. Препараты в форме капсул получают путем наполнения пустых капсульных оболочек активным соединением, взятым в отдельности или в смеси с одним или более вспомогательными ингредиентами, и последующего их запечатывания обычным образом. Активный агент (например, соединения по данному изобретению, связывающиеся с комплексами PRC1 и/или TrxG-MLL) может быть включен в состав гранулированных дисперсных форм, которые перед введением в организм могут быть, например, суспендированы в воде или распределены по поверхности пищевого продукта. Гранулы можно упаковать в пакетики. Препараты, пригодные для перорального применения, в которых использован жидкий носитель, могут быть представлены раствором или суспензией в воде или неводной жидкости, или жидкой эмульсией типа "масло в воде".

Композиции, пригодные для перорального применения, включают лекарственные формы с модифицированным высвобождением, например таблетки, в которых активные соединения, связывающиеся с комплексами PRC1 и/или TRXG-MLL, включены в состав подходящего матрикса, обеспечивающего нужный характер высвобождения активных ингредиентов, или покрыты пленкой, обеспечивающей нужный характер высвобождения активных ингредиентов. Такие композиции особенно подходят для профилактического применения.

Композиции, предназначенные для парентерального введения, включают стерильные растворы или суспензии активных соединений по данному изобретению, связывающихся с комплексами PRC1 и/или TrxG-MLL, в водной или масляной несущей среде. Композиции по данному изобретению могут содержать или также содержать криозащитные агенты или композиции, консерванты, антибиотики, вспомогательные вещества и др.

Композиции и вакцины, вводимые путем инъекции, могут быть предназначены для болюсного введения либо для непрерывной инфузии. Такие препараты обычно расфасовывают в однодозовые или же многодозовые емкости, которые после внесения в них препарата герметично закрывают и не вскрывают вплоть до момента введения. Другой вариант препаратов указанных выше активных соединений по данному изобретению - порошки, которые перед использованием разводят подходящей несущей средой, например стерильной апиrogenной водой или солевым раствором, забуференным фосфатом (PBS).

Композиции, содержащие одно или более соединений по данному изобретению, связывающихся с комплексами PRC1 и/или TrxG-MLL, могут быть представлены долго действующими депо-препаратами, которые вводят путем внутримышечной инъекции или путем имплантации, например подкожной или внутримышечной. В состав депо-препаратов входят, например, пригодные для таких лекарственных форм полимерные или гидрофобные материалы или ионообменные смолы. Эти препараты могут также включать агенты или вспомогательные вещества, увеличивающие сродство активных ингредиентов к их мишеням и/или продолжительность иммунного ответа у животного (например, у крупного рогатого скота, овец или коз); к числу таких вспомогательных субстанций относятся одинарные или двойные эмульсии типа "масло в воде". Подобные долго действующие композиции особенно подходят для профилактического применения.

Композиции по данному изобретению, пригодные или предназначенные для введения через слизистые оболочки, включают композиции, содержащие частицы для аэрозольного распыления или диспергированные в питьевой воде. В последнем случае желательно, чтобы диаметр частиц в такой композиции был в диапазоне 10-200 мкм для того, чтобы эти частицы задерживались, например в носовой полости, что достигается путем использования порошка с частицами нужного размера или подбором клапана ингаляционного устройства. Другие пригодные по данному изобретению композиции включают грубодисперсные порошки с частицами диаметром 2-0500 мкм для введения быстрой инспирацией через носовые ходы из емкости с препаратом, которую держат близко к носу; капли в нос, содержащие 0,2-5 мас./об.% активного соединения в водном или масляном растворе или суспензии.

Следует учитывать, что помимо носителей и несущих сред, упомянутых выше, различные композиции, описанные в настоящем документе, могут содержать один или более дополнительных подходящих (фармацевтически приемлемых) носителей, например разбавителей, буферных растворов, ароматизи-

рующих агентов, связующих агентов, поверхностно-активных веществ, загустителей, агентов, улучшающих скольжение, консервантов (в том числе антиоксидантов) и др., а также веществ, служащих для обеспечения изотоничности между композицией и кровью предполагаемого пациента. Фармацевтически приемлемые носители хорошо известны специалистам в данной области техники; они включают (не ограничиваясь перечисленным здесь) фосфатный буферный раствор концентрацией 0,1М и предпочтительно 0,05 М или 0,8%-ный солевой раствор. Отметим также, что фармацевтически приемлемые носители могут представлять собой водные либо не водные растворы, суспензии или эмульсии. Примерами неводных растворителей являются пропиленгликоль, полиэтиленгликоль, растительные масла (например, оливковое масло) и пригодные для инъекций органические эфиры, например этилолеат. Водные носители включают воду, водно-спиртовые растворы, эмульсии или суспензии, в том числе солевые и буферные среды. Носители, пригодные для парентерального введения, включают раствор хлорида натрия, раствор Рингера с декстрозой, раствор Рингера с декстрозой и лактатом или нелетучие масла. Можно также использовать консерванты и другие добавочные компоненты, например противомикробные агенты, антиоксиданты, хелирующие агенты, инертные газы и др.

Композиции по данному изобретению, предназначенные для местного применения, могут быть представлены, например, в форме геля, крема или мази.

Композиции по данному изобретению для ветеринарного применения обычно представлены порошками или жидкими концентрированными формами. В соответствии со стандартами ветеринарных препаратов в эти порошки для улучшения их физических свойств могут быть добавлены обычно применяемые в фармацевтике водорастворимые эксципиенты, например лактоза или сахароза. Так, особенно предпочтительные порошки по данному изобретению содержат 50-100 мас./мас.%, предпочтительно 60-80 мас./мас.% активных ингредиентов (например, одного или более соединений по данному изобретению, связывающихся с комплексами PRC1 и/или T_{rx}G-MLL, и 0-50 мас./мас.%, предпочтительно 20-40 мас./мас.% обычно используемых в ветеринарии эксципиентов. Такие порошки добавляют, например в корм для животного, например используя предварительно приготовленную смесь, или разводят в воде для питья.

Жидкие концентраты по данному изобретению предпочтительно содержат одно или более соединений по данному изобретению, связывающихся с комплексами PRC1 и/или T_{rx}G-MLL, и при необходимости также приемлемые для применения в ветеринарии смешивающиеся с водой растворители, например полиэтиленгликоль, полипропиленгликоль, глицерин, глицерин формальный (смесь изомеров) или указанные растворители, смешанные с этиловым спиртом в количестве до 30 об./об.%. Жидкие концентрированные препараты можно подмешивать в воду, которую пьет животное.

Осуществление изобретения

Далее данное изобретение описывается подробнее, в том числе с помощью следующих иллюстраций.

Фиг. 1 иллюстрирует функции белка R2R1 в цитогенезе.

Фиг. 2 изображает результаты Вестерн-блоттинга R2R1 в эксперименте по иммунопреципитации.

Фиг. 3 - сравнение LogRatio, представляющих дифференциальную экспрессию вследствие транскрипционного эффекта от нокдауна R2R1 (FAM25KD) и наличия хронического обструктивного заболевания легких.

Фиг. 4 - графики зависимости Log₂ (интенсивности), иллюстрирующие повышение уровня экспрессии ряда генов, относящихся к ресничкам.

Фиг. 5 - ячикообразные диаграммы, иллюстрирующие значимость дифференциально экспрессирующихся генов, относящихся к ресничкам, при опосредованном короткими шпилечными РНК блокировании экспрессии гена FAM25 (R2R1).

Фиг. 6 - диаграмма Log₂Ratio, иллюстрирующая повышающую регуляцию экспрессии генов ресничек, относящихся к движению ресничек, обусловленное опосредованным короткими шпилечными РНК (кшРНК) снижением уровня экспрессии гена FAM25(R2R1).

Фиг. 7 - диаграмма Log₂Ratio, иллюстрирующая повышающую регуляцию экспрессии генов ресничек, относящихся к морфогенезу ресничек, обусловленное опосредованным короткими шпилечными РНК (кшРНК) снижением уровня экспрессии гена FAM25(R2R1).

Фиг. 8 - анализ спектральной карты с первой основной компонентой (PC1 на оси X) и второй основной компонентой (PC2 на оси Y).

Фиг. 9 - профиль экспрессии гена DYNLRB2 в клетках РВЕС в условиях МС (без лентивирусной трансдукции, то есть контроль) от донора без обструктивного поражения легких (Br331) по сравнению с клетками от донора с хроническим обструктивным заболеванием легких (Br370).

Фиг. 10 - анализ экспрессии гена R2R1 методом RTqPCR: опыт ABI Hs04194072_mH и опыт ABI Hs04194073_mH при конститутивной экспрессии кшРНК_R2R1 в клетках РВЕС от донора без обструктивного поражения легких (Br331) по сравнению с клетками от донора с хроническим обструктивным заболеванием легких (Br370).

Фиг. 11 - анализ экспрессии гена R2R1 методом RTqPCR: опыт ABI Hs04194072_mH и опыт ABI Hs04194073_mH) при конститутивной экспрессии FHR2R1 в клетках РВЕС от донора без обструктивно-

го поражения легких (Br331) по сравнению с клетками от донора с хроническим обструктивным заболеванием легких (Br370).

Фиг. 12 - картина флуоресценции в клетках РВЕС от донора с хроническим обструктивным заболеванием легких (Br370) на 1-ю неделю воздействия воздуха.

Фиг. 13 - скорректированная суммарная флуоресценция клеток (СТСФ), как мера экспрессии белка R2R1, в клетках РВЕС от донора без обструктивного поражения легких (Br331) на 1-ю, 2-ю и 3-ю неделю воздействия воздуха.

Фиг. 14 - скорректированная суммарная флуоресценция клеток (СТСФ), как мера экспрессии белка R2R1, в клетках РВЕС от донора без обструктивного поражения легких (Br331) на 1-ю, 2-ю и 3-ю неделю воздействия воздуха; все данные собраны на одном графике.

Фиг. 15 - анализ SPM уровней геновой экспрессии для всех образцов, использовавшихся в эксперименте.

Фиг. 16 - анализ SPM уровней геновой экспрессии в условиях понижения уровня экспрессии R2R1.

Фиг. 17 - анализ SPM уровней геновой экспрессии в условиях повышения уровня экспрессии R2R1.

Фиг. 18 - анализ SPM уровней геновой экспрессии для всех образцов, использовавшихся в эксперименте.

Фиг. 19 - график зависимости $\text{Log}_2(\text{интенсивность})$, иллюстрирующий повышение уровня экспрессии ROPN1L при понижении уровня экспрессии R2R1.

Фиг. 20 - график зависимости $\text{Log}_2(\text{интенсивность})$, иллюстрирующий понижение уровня экспрессии ROPN1L при повышении уровня экспрессии R2R1.

Фиг. 21 - график зависимости $\text{Log}_2(\text{интенсивность})$, иллюстрирующий повышение уровня экспрессии ROPN1L при понижении уровня экспрессии R2R1.

Фиг. 22 - количество клеток с ресничками в отсутствие обструктивного поражения легких (Br331).

Фиг. 23 - количество клеток с ресничками при хроническом обструктивном заболевании легких (Br370).

Фиг. 24 - количество клеток, продуцирующих слизь, в отсутствие обструктивного поражения легких (Br331).

Фиг. 25 - количество клеток, продуцирующих слизь, при хроническом обструктивном заболевании легких (Br370).

Фиг. 26 - окрашивание клеток РВЕС от донора без обструктивного поражения легких (Br331) на 2-ю неделю воздействия воздуха в указанных условиях (МС, кшРНК_ОК, кшРНК_R2R1).

Фиг. 27 - окрашивание клеток РВЕС от донора с хроническим обструктивным заболеванием легких (Br370) на 2-ю неделю воздействия воздуха в указанных условиях (МС, кшРНК_ОК, кшРНК_R2R1).

Фиг. 28 - окрашивание клеток РВЕС от донора без обструктивного поражения легких (Br331) на 2-ю неделю воздействия воздуха в указанных условиях (МС, FH, FHR2R1).

Фиг. 29 - окрашивание клеток РВЕС от донора с хроническим обструктивным заболеванием легких (Br370) на 2-ю неделю воздействия воздуха в указанных условиях (МС, FH, FHR2R1).

Фиг. 30 - окрашивание клеток РВЕС от донора без обструктивного поражения легких (Br331) на 3-ю неделю воздействия воздуха в указанных условиях (МС, кшРНК_ОК, кшРНК_R2R1).

Фиг. 31 - окрашивание клеток РВЕС от донора с хроническим обструктивным заболеванием легких (Br370) на 3-ю неделю воздействия воздуха в указанных условиях (МС, кшРНК_ОК, кшРНК_R2R1).

Фиг. 32 - окрашивание клеток РВЕС от донора без обструктивного поражения легких (Br331) на 3-ю неделю воздействия воздуха в указанных условиях (МС, FH, FHR2R1).

Фиг. 33 - окрашивание клеток РВЕС от донора с хроническим обструктивным заболеванием легких (Br370) на 3-ю неделю воздействия воздуха в указанных условиях (МС, FH, FHR2R1).

Пример 1.

1.1. Связывание белков R2R1 (семейство белков FAM25) с комплексами, участвующими в связывании/ремоделировании хроматина, PRC1 группы Polycomb (через субъединицу RNF2) и TtgG-MLL группы Trithoxax (через субъединицы DRY-30 и ASH2L) служит механизмом "включения"/"выключения" цитогенеза в клетках легочного и бронхиального эпителия у человека.

Белки R2R1 играют существенную роль в поддержании и регенерации легочного эпителия, в частности в программе базальных клеток. Их функции были обнаружены в результате экспериментов с первичными бронхиальными эпителиальными клетками (РВЕС), культивируемых методом глубинного выращивания. В условиях такого метода культивирования характерна быстрая пролиферация недифференцированных клеток РВЕС. Поэтому условия глубинного выращивания прекрасно подходят для изучения базальных клеток - стволовых клеток эпителия воздухоносных путей (легких и бронхов) у человека.

Для изучения функции белков R2R1 в дифференцировке и в деятельности дифференцированных клеток РВЕС были проведены дальнейшие опыты. Клетки РВЕС выращивали на разделе фаз воздухоносности (условия ALI). Опосредованный кшРНК, нокдаун экспрессии генов R2R1 в клетках РВЕС, растущих в условиях ALI, в двух независимых таких опытах, выявил комплементарную функцию R2R1 в дифференцировке эпителиальных клеток бронхов человека. Эффект конститутивной и индуцируемой

экспрессии кшПНК 'FAM25 147' (=TRCN0000284147, обозначаемой также кшПНК_R2R1), противодействующей экспрессии R2R1, иллюстрируется фиг. 4-7.

1.2. Нокдаун экспрессии R2R1 приводит к значительной повышенной регуляции цилиогенеза или программе экспрессии генов ресничек.

В программе экспрессии генов ресничек участвуют структурные и двигательные/моторные белки подвижных ресничек. Из этого следует, что R2R1 регулирует переход между базальными клетками и реснитчатыми клетками. Функция R2R1, так сказать, симметрична: а именно, в присутствии R2R1 реализуется программа базальных клеток, а в отсутствие R2R1 иницируется программа реснитчатых клеток. Эта симметрия (базальные клетки-->/<--реснитчатые клетки) изображена на фиг. 1. Следует отметить, что нет свидетельств симметрии базальные клетки-->/<--клетки, производящие слизь; этот факт имеет важные терапевтические следствия.

Потери несущих реснички клеток ведет к недостаточному удалению слизи из воздухоносных путей у больных с хроническими обструктивными поражениями легких (COPD). Этот симптом характерен для COPD: патологически измененный эпителий бронхов (недостаток реснитчатых клеток, плоскоклеточная дифференцировка и гиперплазия базальных клеток) не способен очищать дыхательные пути от слизи, бактерий, вирусов и грязи. Неэффективность механизма очищения приводит к серьезным симптомам, например, кашлю, инфекциям бронхов и легких, недостаточности газообмена в легких, а в результате повышается уровень смертности.

Было обнаружено, что в клетках РВЕС, выращиваемые в условиях ALI, стойко понижен уровень генной экспрессии по программе генов ресничек. Это наблюдалось в двух независимых экспериментах с клетками РВЕС от многих доноров.

Сравнение влияния на транскрипцию наличия хронического обструктивного заболевания легких и блокирования экспрессии R2R1 в клетках РВЕС, растущих в условиях ALI, при помощи коротких РНК, образующих шпильки (кшПНК), иллюстрируется фиг. 3. В верхнем левом квадранте данные представляют эффект R2R1 в отношении цилиогенеза и обструктивного поражения легких. Гены, экспрессия которых изменена из-за обусловленного кшПНК нокдауна R2R1 в клетках РВЕС, выращиваемых в условиях ALI, расположены вдоль оси Y. Гены, уровень экспрессии которых повышен вследствие нокдауна R2R1 располагаются выше нуля оси Y. Гены, экспрессия которых изменена из-за обструктивного поражения легких (по сравнению с отсутствием таких заболеваний) расположены вдоль оси X. Гены, уровень экспрессии которых понижен из-за обструктивного поражения легких располагаются слева от нуля оси X. Левый верхний квадрант таким образом представляет перекрытие между генами, уровень экспрессии которых повышен из-за блокирования R2R1, и генами, уровень экспрессии которых понижен из-за обструктивного поражения легких. Большинство этих генов участвуют в цилиогенезе.

1.3. Изучение механизма осуществления белками R2R1 регуляции перехода между базальными клетками и реснитчатыми клетками.

Для нормального цилиогенеза нужно, чтобы клетка производила достаточно различных белков ресничек. Одновременная экспрессия такого множества генов должна строго регулироваться. Следовательно, эта регуляция осуществляется по типу "включение"/"выключение".

Нам удалось идентифицировать белок RNF2 - сердцевинный компонент комплекса PRC1, как партнер по связыванию R2R1, что было установлено в двух независимых экспериментах с двугибридной (Y2H) дрожжевой системой (первый эксперимент: 7 совпадений, из них 4 - RNF2; второй эксперимент: 4 совпадения, из них 1 - RNF2). Был также идентифицирован второй партнер связывания - белок DRY-30, являющийся компонентом комплекса TrxG-MLL (1/7 совпадений в первом эксперименте Y2H). Наконец, набор белков, участвующих в связывании хроматина, завершил белок SF3B2 (1/4 совпадений во втором эксперименте Y2H).

Взаимодействие между белками R2R1 и комплексами PRC1/TrxG подтвердилось в эксперименте с трансляцией *in vitro* (в системе 1-Step CHO High-Yield IVT Kit, Thermo Scientific). Конструкция R2R1 с N-концевой гемагглютининовой меткой (HA-tag), в векторе pT7CFE1 экспрессировался вместе с различными пермутациями конструкций Polysomb (PcG) и TrxG, несущих N-концевую метку FLAG, в векторе pT7CFE1. Проводили ко-иммунопреципитацию, используя иммуносорбент EZview™ Red Anti-HA Affinity Gel (Sigma Aldrich), чтобы связать R2R1 и любые ассоциированные белки в реакционной смеси. Связавшиеся белки анализировали путем электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (SDS-PAGE) и вестерн-блоттинга с моноклональными антителами M2 против FLAG® (Sigma Aldrich).

Различные пермутации описаны в таблице, приведенной ниже.

1
Белковый маркер Magic Mark
2
N-конец DPY-30
N-конец R2R1
3
N-конец DPY-30
N-конец ASH2L
N-конец KMT2D
N-конец R2R1
4
N-конец RNF2
N-конец RYBP
N-конец KMT2D
N-конец R2R1
5
N-конец RNF2
N-конец PCGF4 (BMI1)
N-конец RYBP
N-конец R2R1

Фиг. 2 иллюстрирует ко-иммунопреципитацию R2R1 и различных белков PRC1/TxG с использованием различных пермутации. Прочность связывания RNF2 с R2R1 при неканонической пермутации комплекса PRC1 (в присутствии KMT2D (MLL4) и RYBP, 4-я дорожка) больше, чем при канонической форме комплекса PRC1 (5-я дорожка). ASH2L отчетливо связывается с R2R1 (3-я дорожка) при пермутации, включающей белки KMT2D (MLL4), DPY-30 и ASH2L комплекса TxG-MLL. Известно, что ASH2L и DPY-30 являются реципрокными участниками связывания и важными субъединицами комплексов TxG-MLL. Наконец, при пермутации белковой смеси, содержащей только R2R1 и DPY-30, имеет место, по-видимому, гетеродимеризация между R2R1 и DPY-30.

Из сказанного выше следует, что влияние на транскрипцию (многие гены одновременно регулируются R2R1) обусловлено изменением связывающих свойств белков, осуществляющих ремоделирование хроматина, причем комплекс PRC1 в этом смысле - наиболее наглядный пример. Известно, что в PRC1 происходит обмен компонентов, что приводит к появлению канонических и неканонических комплексов. Влияние PRC1 на хроматин (убиквитинилирование гистона H2A, рекрутинг PRC2 и содействие PRC2 в его репрессорной форме) определяется его различными белковыми компонентами. Однако субъединица RNF2 всегда присутствует в комплексе PRC1.

Таким образом, нами обнаружена вполне ясная неканоническая функция PRC1. Эта функция определяется связыванием R2R1 с комплексом PRC1. Связывание R2R1 с PRC1 создает переходный момент в цилиогенезе. Также R2R1 взаимодействует с комплексом TxG-MLL (группа Trithorax, или TxG), модифицирующим хроматин, при участии DPY-30 и ASH2L. В отличие от PRC1, комплекс TxG поддерживает активную генную экспрессию путем метилирования H3K4. Взаимодействие белков группы Polycomb и группы Trithorax поддерживает определенный набор генов в активном или репрессированном состоянии. Таким образом, R2R1 оказывает значительное влияние на домены хроматина и генную экспрессию путем связывания с белками PRC1 группы Polycomb (PcG) и с белками группы TxG. Вероятно, что пептид, являющийся частью белка R2R1, белок, частично сходный с R2R1 или низкомолекулярное соединение, взаимодействующее с сайтами связывания R2R1-RNF2 и/или R2R1-DPY-30/ASH2L могут восстановить цилиогенез у больных с хроническими обструктивными заболеваниями легких.

Необходимо показать, что белок R2R1 регулирует определенный набор генов, обеспечивающих цилиогенез в клетках РВЕС человека. Иначе говоря, нужно получить свидетельства того, что R2R1 связывается с определенными нуклеотидными последовательностями (промоторами или энхансерами) в генах, регулирующих или обеспечивающих цилиогенез.

Сайты связывания R2R в геноме человеческих клеток РВЕС идентифицировали методом CHIP-Seq (иммунопреципитация хроматина и секвенирование нового поколения обогащенных фрагментов ДНК). В человеческих клетках РВЕС, выращиваемых в условиях ALI, конститутивно экспрессируется (с использованием лентивирусной трансдукции) белок, в котором имелся N-концевая метка FLAG тандемный

эпитоп-белок R2R1, и белок, в котором имелась только N-концевая метка FLAG-НА и tandemный эпитоп. Геномную ДНК в составе хроматина и белки соединяли сшивающим агентом - дисукцинимидилглутаратом (DSG) и формальдегидом. Хроматин обрабатывали ультразвуком до получения фрагментов нужного размера (~200 нуклеотидных пар) и проводили иммунопреципитацию, используя систему EZ-view™ Red Anti-НА Affinity Gel (Sigma Aldrich), чтобы связать фрагменты геномной ДНК, соответствующие N-концевая метка FLAG tandemный эпитоп - белок R2R1 и N-концевая метка FLAG-НА tandemный эпитоп. Затем из этих фрагментов ДНК (после удаления сшивки и расщепления) получали библиотеку для секвенирования нового поколения (NGS) и проводили секвенирование с глубиной по меньшей мере 40×10^6 чтений. В результате сравнения (EaSeq, <http://easeq.net/>) обогащения сайтов связывания в библиотеке, соответствующей белку, FLAG-НА tandemный эпитоп-R2R1, и FLAG-НА tandemный эпитоп (контрольной библиотеке), был получен набор из ~3000 сайтов, связывающих R2R1. При этом достигалась воспроизводимость результатов, что было продемонстрировано в технических и биологических повторениях опыта (доноры Br331 и Br363).

Итак, во-первых, анализ набора сайтов связывания R2R1 выявил, что R2R1 связывается с промоторными сайтами генов TP73 и FOXJ, белки-продукты которых являются основными факторами транскрипции, инициирующими образование подвижных ресничек. Также R2R1 связывается с промоторными сайтами генов, кодирующих компоненты аппарата centrosомы и базального тела реснички (CROCC, CCDC41, CEP131, CEP164, CEP170, CEP170B, CEP192 etc.). Наконец, были идентифицированы и другие ключевые регуляторы цилиогенеза и дифференцировки эпителия (факторы транскрипции, малые некодирующие РНК, модификаторы хроматина и др.): FUZ, FGFR1, MIR34AHG, ARID1B, JARID2, YY1, KDM2A, KDM2B, KDM4B, KDM6B, KMT2A, KMT5B, SETD1A. Таким образом, данное изобретение относится к соединениям (например, к соединениям на основе R2R1, описанным в настоящем документе), способным модулировать деятельность генов, кодирующих компоненты аппарата centrosомы/базального тела реснички и/или регуляторы цилиогенеза и дифференцировки эпителия (или связываться, или ассоциировать с этими генами).

Ниже приведены примеры последовательностей ДНК для сайтов связывания R2R1.

TP73

>hg19_dna range=chr1:3607302-3607501 5'pad=0 3'pad=0 strand=+
repeatMasking=none

GTTCCCCAGCATCCTCGGCTCCTGCCTCACTAGCTGCGGAGCCTCTCCCGCTCGGTCC
ACGCTGCCGGGCGGCCACGACCGTGACCCTTCCCCTCGGGCCGCCAGATCCATGCC
TCGTCCCACGGGACACCAGTTCCCTGGCGTGTGCAGACCCCCGGCGCCTACCATGC
TGTACGTCGGTGACCCCGCACGGCACCT

FOXJ1

>hg19_dna range=chr17:74118677-74118876 5'pad=0 3'pad=0 strand=+
repeatMasking=none

GCGGAGGCAGAGCGGCCCTGGGGCCCCGGCGTCAGCTGAGGTTGCACTGTGTTTGG
AGAGGAGCCTCGGAGGGGTGGGCTGCCTGGCAGCAGTGGCCTGGGGGCCGAAATG
AGGAGGGTGCAGTGCCTTGGGCAGTAAATTAGAAGACACAGGCTGCTGGCTGGGGG
CGGGAGGGCACAGGGAAGCCCTGCCCGGGAGC

FUZ

>hg19_dna range=chr19:50308793-50308992 5'pad=0 3'pad=0 strand=+
repeatMasking=none

CGGGACTTCTGACGCCCCGCTGCTGTCCGTGCGCTTCCGGTGAGTCAGGTA
CGGCGCGGCCGGTGGGCGGAGCCTCCGGGGTGAGGGGCGGGGCCTAATGGAGCCTC
CCTTTCACCTCATCAGGTACGGTGGCGCCCCCAGGCCCTCACCTGAAGCTCCCAG
TGACCATCAACAAGTTCTTCCAGCCCACCGAGAT

FUZ

>hg19_dna range=chr19:50304563-50304762 5'pad=0 3'pad=0 strand=+
repeatMasking=none

ATCCTAGGGAGGGGCACCTCTCGAGGGGGTTTCTGGGAGAGGGCAGTGGAA
CCTGGCCCCGCTGACACCCACTCTGCACACAGCCCCCAGTGCAGTTCTCCCTGCT
CCACTCCAAGTTCCATCTGTGCAGCGTGGCCACGCGGGCGCTGCTGCTGTCCACCTA
CATCAAGTTCATCAACCTTTCCTCCCGAGACCAAGG

CROCC

>hg19_dna range=chr1:17266175-17266468 5'pad=0 3'pad=0 strand=+
repeatMasking=none

CCCAGGGAGGTGAGGGCTCAGAGGGTGGCGAGGGCACATAGGAGGGGAGCG
GAAGCCTGGCTCTCAGGCCTAGGCCCTATCCTGCCCCAGGCCAGGTCCAGGCCCTG
GACCCCGCCTAGCGTAGGCTAGTGTGTATCCCTGGAACCAGAAGAGAGTAGGTGGC
TCTGGAGGCCCTCAGGCCCCCAGACTCTGTGACCCCCACACCCCAGGACATGC
GTGGGCGCTATGAGGCAAGCCAGGACCTACTGGGCACCCTGCGGAAGCAGCTTAGC
GACAGCGAGAGCGAGCG

CROCC

>hg19_dna range=chr1:17239197-17239454 5'pad=0 3'pad=0 strand=+

repeatMasking=none

TCCAGGGACTGGCTGTGCATACTGGCAGATGTCAGTCAGCCCTCCTGCAGTT
 GGGCCAGGGACACCTCAGGGAACTGTGACCTTCCTTCCAATCTTGGTAACATCACC
 CTTCCACCCCAAATCCCAGGGAATGGCCC GAATCTCTCCTGACAAACAGCTCTCAGC
 CCTGGTCCAGGCCACAGTCTTGCTTGCACCGGGCCGGGTTTCAGAGCCC GAAGGGC
 AACTGGCAGCCTTTAGTGCAGTGTTTCAGATGTCA

CROCC

>hg19_dna range=chr1:17249731-17249930 5'pad=0 3'pad=0 strand=+

repeatMasking=none

GTGGCGCACACGGTGTAGTTATGTGGCTTGAGGATCTGGGAAAGGCACACTC
 AGTTGCAGCTGGTGTGCTGGCGTGTGGCGTTTTGGTGTCTAACCATTGTCTGTGTTC
 AACTCCCAAGCTACAGACGGGCCCTCCTTGGGAGCGCCAGGGATGTTGGCGCCC
 TGGAGCCCCAGACAGGGAGAGACTCAGAGGGCCC

CROCCP2 (область CROCC)

>hg19_dna range=chr1:16949769-16950030 5'pad=0 3'pad=0 strand=+

repeatMasking=none

CGACTACAGGGAATGGAAATGGTATAGCCATCATCTAAAAACCATCTCCCGG
 GTTGAAACCCACCAGCATTTCCCTTCCTGGTTCTGTCTGGCTCAGGTGTACATGGA
 CAGGAAAATTAATTTCCATGACCCAAGTAGGTGCTTAGTTAATGTTAGATGAGCAGA
 AAGAAGCCCTGAGTTCAGAGATTCGATGGGGAACGGTGCAGGGAAGTGGGGCTCGG
 ATTCTGGGGCCAAGAGAGTCATCTGAAAACCACAGAGAAC

CROCCP3 (область CROCC)

>hg19_dna range=chr1:16825373-16825572 5'pad=0 3'pad=0 strand=+

repeatMasking=none

AGGGGACCCCGACCGGCGGAGGGACGGCTGCGCCCTGCAGGCCGCTGCGCC
 CAGGCAGGCCTCTGCGCCCGGGCAGGCCTCGGCCTCCTGTGCGCCCCCGGCCGCG
 ACAATCCGGGCAGGATGGGCGGCAGGACGCGGAGGGGCATCTGCGGAGCCCGTCG
 GGAACGCCCTCTTGCTTCCGGTGCCGGGCAGCGGCG

CEP131

>hg19_dna range=chr17:79196529-79196728 5'pad=0 3'pad=0 strand=+

repeatMasking=none

TGCGCCCTGCAACCCCTCCCTTGCCCGGGCCCCCTCACCTGCGCGGGCCGG
 GGGCGCAGCCGGAAGCCTGCCTGGCGCGCGGGCCTGCAGATTCGGCCGGCGGGG

AGGGGATGCGGAACCAGTCGCGCCCAAACCTCGGGTCGGCGACCTGGCGCCCCGCC
 ACCCCCAACACTGCCCCGAGGCCCGGTGACAATGA

CEP164

>hg19_dna range=chr11:117198627-117198826 5'pad=0 3'pad=0 strand=+
 repeatMasking=none

GTTGGGTGGCGTTGGGGGAGCTGCGCCTCGCCCAGAGCCTCGCCCCGAGCCT
 CGCCCCGAGCCTTCCGGGGTGGGGGATAGTTGAGGACCTCATCGAGGGAGGGGTTG
 GCGCGCGGGGAAGGGAGCGAGCGTGGCGGGGGACCCGAGGCACGCTCTCGAGCCA
 ACGAGCGTGATGCGCTCGAGTGTGGGCGGGGACTGAG

CEP170

>hg19_dna range=chr1:243418128-243418414 5'pad=0 3'pad=0 strand=+
 repeatMasking=none

AAGCCCCGGGTCCCAGGCGGGCAGAGGGTGGGGGTGGCGGCGCCGCGCGGA
 GCACCCGGGAAGCGCCCCCTTCGCGGTCCAGCCCCGCACCCCGCCCCGCGGGCGG
 CGGCGCCCCGAGTCCTCGCCGCAAACCCGAGGAGCAGGATGTGAAAGCAGCCGCG
 CGGTGGCTGCGGCTGCGGCGCCTACACCGAGCAGCCGATCGCATCACTTACCCCTTA
 CCGTGGAGAGAGGGACCGGACGGGGGAGGCGGGGCGCGTCGCGTCCCGTGAGTCTC
 TCGCACGCCGT

CEP170B

>hg19_dna range=chr14:105331641-105331930 5'pad=0 3'pad=0 strand=+
 repeatMasking=none

CGCTCTGCCGTGGGCTCGGCCCGGGCTGCCACGAGCGTGCGGGCCTCGCCGG
 GCATGTCCTAGGCGGCGGCCCGCCAGCGCTCGGCCGGGCGGGCGGGCGGGCGCG
 AGGGCAGGGACCGAGCCGGGCCGAGCTGGGGAACAAGCCGGGGACCAAGCCGGGG
 ACCAAGCCGGGGACTAAGGCGAGCCGGAGACCGAGCCCGAACAGCAGGTAGGACG
 CGCCGGCCAGCGCTGGCCGCGGCCCGGGCCTCCCATCGCCCGCACCTGCACGGCT
 GTGGGGTCTCACGGGG

CEP170B

>hg19_dna range=chr14:105333102-105333301 5'pad=0 3'pad=0 strand=+
 repeatMasking=none

AGACCTTGGGCGTGGGCACTGGGCAAAGTAGGGACAAGGAGCCACTCACTC
 CTCTGCCTGGCACCCCTCATGTGGTGTGGCCCTGCCCTCAGGATGCACTCAGCCCGGC
 AGCCTCCCCTTCTCCTCTGCTCCACTGGGCTCAGCTGCTGTCATCCCTGTCCTGGGT
 TATTGTCCTCACTTCTTACTGGCCTCCTGAGTC

CEP170B

>hg19_dna range=chr14:105332644-105332843 5'pad=0 3'pad=0 strand=+
repeatMasking=none

GGGCCGCGCAGGTGATGGCAGAGGGTGAGGCCTAGGAGGGCTGGCTGGGG
GCCGGAGGTGCAATGGTGGGGTAGGCCCTGCCGATAGAGCACCCCTGTGGTCTCCC
CCAGCAGCCCTAGGGAGGGTGGGGCTGTAGAGGCCTCCTGGAGGCTTTGCTGTCTG
GGGCTGCAGGGTCATCGAAGTGCCAGCCCCTTGGCCT

CEP170B

>hg19_dna range=chr14:105341395-105341594 5'pad=0 3'pad=0 strand=+
repeatMasking=none

TGGTGTTCATGACGGTGCCCTGTGGTGGGGCAGTGATGGCCAGCTGCCAGG
GTGGCCTGCACGTGGCAGGCTAAGAGTGACCAGCCTGAGGGGCCAGGCTCTACC
TGGGAGACTGAGAAGCCGTGCTGGCACTCAGGAGGGACTTCCAGCTCCTAGTCGTG
TGGGTTGCAGGCCGTCTGTCCCAGGGCTGGGGGAC

CEP192

>hg19_dna range=chr18:12991416-12991615 5'pad=0 3'pad=0 strand=+
repeatMasking=none

GAAGTCGGGGACGCGGGCTCGGTGAGGGGGACGCTGGTGCCTCGGCCTGC
GCCTAGGCGGGAGGCAGACGCATGCACCTTTGGCCTACGTTTCGGCTGCCGGACCG
ACGGGACAGTGACGGTTGGGCCGGGTGGGGGCGCAGGCTGTGGGGCGGCCTCAGG
GCGCGAGCAAGGGGACTGCCGCGCTTCCCGCGCCTCTG

CCDC41

>hg19_dna range=chr12:94853729-94853928 5'pad=0 3'pad=0 strand=+
repeatMasking=none

TTGGCCCAGCGGCACGCGAAGCAGGAAGTCCCACCCCCACGCCGACGTCAC
CCACGCCACCGACGCCGGTTGCTGCCGGAGCCGTTAGAGGGAGGAGACAAACGAAC
CGAGGCGGGAGCGGCCACGGGTGACAGCGGCAGCGGCGGGGCCGGGCTGCGCTCC
CGAAGGCGTTCCTGGAGGGCCCTGGGATGGACTCAGA

MIR34AHG

>hg19_dna range=chr1:9242327-9242526 5'pad=0 3'pad=0 strand=+
repeatMasking=none

ACCGACGGGACAGCGGCATCTCCTCCACCTGAAAAGGAAAGAGGACCAGGT
GGGGGCCAGGCAGGGCGCATGAAGGCGGCGCCAGCACCGCGCGATCCGAATCACG
TCGGTGCGGGGGAGGGGTCGGAGCCTGGCCTCGGCCTAGGGCGCAGATGCGGTGCG
CACCGCAGGGGGCGGGCTGGGGTGCGGGGCCAGTCC

Нуклеотидные последовательности примеров сайтов связывания R2R1 отличаются высоким содержанием оснований GC. Так, анализ содержания оснований во всем наборе сайтов связывания R2R1 (~3000 сайтов) показывает, что содержание GC превышает содержание AT: основания G и C составляют вместе ≥66% оснований в геномных сайтах связывания R2R1. Поиск мотивов в сайтах связывания R2R1 с помощью пакета программ RSAT (Regulatory Sequence Analysis Tools; <http://rsat.sb-roscoff.fr/>) выявил высоко специфичные мотивы GC. Эти мотивы повторяются независимо от методики поиска мотивов в RSAT (подсчет встречаемости олигонуклеотидов в наборе последовательностей, в результате чего определяют сверхпредставленные олигонуклеотиды, рассчитывают позиционное распределение олигонуклеотидов в наборе последовательностей и определяют те, которые значительно отклоняются от равномерного распределения, и сверхпредставленные пары олигонуклеотидов примерно одного размера, разделенных фиксированным числом нуклеотидов, в наборе последовательностей ДНК; см. определения терминов на

сервере RSAT <http://rsat.sb-roscoff.fr/>). В обнаруженных мотивах явно повторяются триады GCC (CGG). Как правило, высокое содержание GC и повторяющиеся последовательности из нуклеотидов GC характерны для островков CpG. (CGI). В последнее время считается, что эти CGI содержат геномные сайты связывания комплексов PcG (элементов ответа Polycomb, сокращенно PRE) и TtxG (элементов ответа Trithorax, сокращенно TRE), в целом называемых PRE. Следовательно, удалось установить еще одну связь с функцией Polycomb: R2R1 представляет собой элемент узнавания PRE. Это имеет особое значение для комплексов PcG, в которых - в отличие от комплексов TtxG - не было идентифицировано универсальных элементов узнавания PRE.

Пример 2.

2.1. Восстановление цилиогенеза в выращиваемых в условиях ALI клетках PBEC от доноров с хроническим обструктивным поражением легких.

Прежде всего подчеркнем, что цилиогенез в отсутствие R2R1 не ограничен клетками PBEC от доноров без обструктивных поражений легких. Поэтому следует отметить, что:

(a) в клетках PBEC от доноров с хроническим обструктивным поражением легких и без такого заболевания экспрессия R2R1 легко поддается регуляции в сторону усиления и ослабления;

(b) экспрессия белка R2R1 связана с экспрессией транскрипта R2R1;

(c) в клетках PBEC от доноров с хроническим обструктивным поражением легких и без такого заболевания нокаун экспрессии R2R1 инициирует программу экспрессии генов, имеющих отношение к ресничкам. И наоборот, повышение уровня экспрессии R2R1 приводит к подавлению транскрипции генов, имеющих отношение к ресничкам;

(d) изменения в наборе транскриптов отражается в фенотипе клетки. От транскриптома, имеющего отношение к цилиогенезу, зависит увеличение количества реснитчатых клеток в выращиваемых в условиях ALI клетках PBEC от доноров с хроническим обструктивным поражением легких.

Результаты описанных ниже экспериментов служат иллюстрацией утверждений 2.1 (a), 2.1 (b), 2.1 (c) и 2.1 (d).

Клетки PBEC от донора без обструктивных поражений легких (Br331) и от донора с хронически обструктивным поражением легких (Br370) выращивали в условиях ALL В 1-ю, 2-ю и 3-ю недели контакта с воздухом (AE) проводили анализ транскриптома и клеточного фенотипа. В каждом варианте условий опыт повторяли три раза.

Были взяты следующие условия.

(i) MC (контроль среды) - популяция клеток росла безо всякого вмешательства.

(ii) Пониженный уровень экспрессии R2R1 в клетках PBEC достигался в результате конститутивной экспрессии (с использованием лентивирусной трансдукции) FAM25 147= TRCN0000284147 (обозначен кшРНК_R2R1). Клетки PBEC, в которых конститутивно экспрессировались рандомные малые шпичечные РНК (обозначены кшРНК_ОК) служили отрицательным контролем в данных условиях.

(iii) Повышенный уровень экспрессии R2R1 достигался конститутивной экспрессией конструкции N-концевой метка FLAG-НА tandemный эпитоп - R2R1, (обозначена FHR2R1) (с использованием лентивирусной трансдукции). В этих условиях отрицательным контролем служили клетки PBEC, в которых конститутивно экспрессировалась аналогичная конструкция N-концевой метка FLAG-НА tandemный эпитоп (обозначена FH).

iv) Доноры: без обструктивного поражения легких (Br331) и с хронически обструктивным заболеванием легких (Br370)

(v) Время: клетки PBEC собирали в 1-ю, 2-ю и 3-ю недели контакта с воздухом (AE).

2.2. В клетках PBEC от донора Br370 (с хроническим обструктивным заболеванием легких) наблюдался стойкое понижение со временем уровня экспрессии генов, обеспечивающих образование ресничек.

Можно было предположить, что (1) в профиле генной экспрессии клеток PBEC, выращиваемых в условиях ALI, цилиогенез с течением времени будет становиться все заметнее. Мы также предполагали, что (2) в клетках PBEC от донора с хроническим обструктивным заболеванием легких (Br370) появление транскриптов, относящихся к цилиогенезу, будет запаздывать по сравнению с клетками PBEC от донора без обструктивного поражения легких (Br331).

Доказать или опровергнуть эти предположения должен был анализ программы генной экспрессии в клетках MC PBEC (клетки PBEC, не подвергавшиеся лентивирусной трансдукции).

Применение анализа спектральной карты (SPM) подтвердило наши предположения. Этот метод (см. фиг. 8) обеспечивает однозначную идентификацию преобладающих кластеров генов и других объектов в массиве данных. Этот метод анализа данных по генной экспрессии показал, что экспрессия генов, имеющих отношение к цилиогенезу, изменяется со временем (неделя воздействия воздуха), что объясняет наибольшую вариацию (56%) данных. Эта вариативность графически представлена в первой основной компоненте (ось X, или PC₁) спектральной карты. Вторую по величине вариацию (17%) можно объяснить статусом донора, то есть имеется обструктивное поражение легких или нет. Эта вариативность представлена во второй основной компоненте (ось Y, или PC₂) спектральной карты. Гены, для которых отмечены наибольшие изменения в экспрессии располагаются в областях крайних значений по осям X и Y.

Подгруппа генов, обуславливающих наибольшие изменения дифференциальной экспрессии, полностью состоит из генов, относящихся к цилиогенезу (см. фиг. 8).

Гены DYNLRB2 и ROPNL1 - примеры генов, относящихся к цилиогенезу. Как и ожидалось, эти гены располагаются в области крайних значений по оси X (PC₁ - вариация, связанная с ходом времени). Таким образом, подтверждается первая (1) часть нашего предположения.

Наложение данных по различным образцам MC PBECs на спектральную карту показывает их распределение вдоль первых двух основных компонент. Видно, что группы, соответствующие наличию хронического обструктивного заболевания легких (Br370) и его отсутствию (Br331), отчетливо разделены по экспрессии генов, относящихся к ресничкам, вдоль PC₁ и PC₂. Клетки PBEC от донора (Br331) без обструктивного поражения легких группируются ближе всего к подгруппе генов, относящихся к ресничкам. Клетки PBEC от донора с хроническим обструктивным заболеванием легких (Br370) группируются на противоположном конце. Это доказывает вторую часть (2) нашего предположения. Для примера приведен профиль генной экспрессии DYNLRB2 (см. фиг. 9). Этот независимый одномерный анализ "от гена к гену" для проверки гипотезы подтверждает эффект происхождения клеток PBEC (от донора с хроническим обструктивным заболеванием легких или без него - Br370 по сравнению с Br331). В клетках PBEC от донора без обструктивного поражения легких (Br331), собранных в первый из указанных моментов времени (первая неделя воздействия воздуха: AE week= 1) наблюдался самый низкий уровень экспрессии DYNLRB2. А в клетках PBEC от донора без обструктивного поражения легких (Br331), собранных в третий из указанных моментов времени (третья неделя воздействия воздуха: AE week=3) наблюдался очень высокий уровень экспрессии DYNLRB2. В клетках же PBEC от донора с хроническим обструктивным заболеванием легких (Br370) данный ген экспрессировался слабо.

2.3. Уровень экспрессии R2R1 в клетках PBEC от донора без обструктивного поражения легких и от донора с хроническим обструктивным заболеванием легких достоверно понижается и повышается.

Экспрессию генов R2R1 изучили при помощи метода количественной полимеразной цепной реакции в реальном времени - RTqPCR; (опыт ABI Hs04194072_mH и опыт ABI Hs04194073_mH); полученные результаты продемонстрировали полное ее отсутствие (нокаут) при конститутивной экспрессии кшПНК_R2R1 в клетках PBEC от донора без обструктивного поражения легких (Br331) и от донора с хроническим обструктивным заболеванием легких (Br370); см. фиг. 10. Напротив, такое же (RTqPCR) определение экспрессии генов R2R1 при конститутивной экспрессии FHR2R1 показало повышение уровня экспрессии $>10^4$ в клетках PBEC от донора без обструктивного поражения легких (Br331) и от донора с хроническим обструктивным заболеванием легких (Br370) (опыт ABI Hs04194072_mH и опыт ABI Hs04194073_mH); см. фиг. 11). Эти данные представлены в виде точечных диаграмм (черточки - средние значения). Результаты RTqPCR доказывают, что экспрессия генов R2R¹ регулируется как в сторону снижения ее уровня, так и в сторону его повышения, причем эта регуляция весьма выраженная, значительная и достоверная.

2.4. Экспрессия белка R2R1 связана с экспрессией транскрипта R2R1. Суммарное содержание белка R2R1 в ядре определяли следующим образом.

Клетки PBEC окрашивали иммуногистохимическим методом, используя антитела (1/500) против белков семейства FAM25A (Abcam ab 177969). Вторичными антителами служили козы антигены (1/1500) против кроличьего IgG (H+L), конъюгированные с флуоресцентным красителем Alexa Fluor® 594 (Thermo-Fisher Scientific A-11037). Используя программу Image J (<http://rsbweb.nih.gov/ij/index.html>), определяли скорректированную суммарную флуоресценцию клеток (CTCF) из 10 полей при увеличении $\times 20$. По величине CTCF оценивают суммарное содержание белка R2R1 в ядре. Фиг. 12 дает представление о характерной картине флуоресценции в разных условиях (MC, FH, FHR2R1, кшПНК_ОК и кшПНК_R2R1) в данный момент времени AE (воздействие воздуха). Точечная диаграмма (черточки - средние значения со стандартным отклонением SD) демонстрирует картину флуоресценции в клетках PBEC от донора с хроническим обструктивным заболеванием легких (Br370) в первую неделю воздействия воздуха. На фиг. 13 показана временная последовательность картин флуоресценции в клетках PBEC от донора без обструктивного поражения легких (Br331). На фиг. 14 суммированы на одной диаграмме данные, полученные в три различных момента времени по фиг. 13.

Результаты CTCF доказывают, что вслед за регуляцией (повышением или понижением уровня экспрессии) экспрессии генов R2R1 соответственно изменяется количество (регулируется уровень экспрессии) белка R2R1 в ядре. Кроме того, локализация белка R2R1 в ядре согласуется с взаимодействием R2R1-PcG и R2R1-TrxG.

2.5. Нокаут экспрессии R2R1 инициирует программу экспрессии генов, связанных с цилиогенезом, в клетках PBEC от донора с хроническим обструктивным заболеванием легких и от донора без такого поражения. Повышение же уровня экспрессии R2R1 приводит к подавлению транскрипции генов, имеющих отношение к цилиогенезу.

Для того чтобы продемонстрировать сказанное в пункте 2.5, мы провели независимый анализ (SPM) уровней генной экспрессии для всех образцов, использовавшихся в эксперименте. В этом наборе были образцы, соответствовавшие условиям MC, FH, FHR2R1, кшПНК_ОК и кшПНК_R2R1, которые брали на

1-ю, 2-ю и 3-ю недели воздействия воздуха из клеток РВЕС от донора с хроническим обструктивным заболеванием легких (Br370) и от донора без обструктивного поражения легких (Br331). Полученные результаты показывают, что подгруппа генов, ответственных за наибольшие изменения дифференциальной экспрессии, состоит целиком из генов, имеющих отношение к ресничкам (см. фиг. 15). То же верно для условий, в которых уровень экспрессии R2R1 понижается (образцы, отвечающие условиям MC, кшПНК_ОК, кшПНК_R2R1), и повышается (образцы, отвечающие условиям MC, FH, FHR2R1); см. фиг. 16 и 17 соответственно. На каждой из картограмм выделен ген ROPN1L, взятый для примера.

При более пристальном рассмотрении полученных данных оказалось, что образцы с пониженным уровнем экспрессии R2R1 группируются вблизи кластера генов, имеющих отношение к ресничкам (см. фиг. 15 и 16). Например, образцы от донора без обструктивного поражения легких (Br331) в условиях кшПНК_R2R1, взятые на 3-ю неделю воздействия воздуха (3АЕ), располагаются очень близко к кластеру генов, имеющих отношение к ресничкам. Для образцов с повышенным уровнем экспрессии R2R1 имеет место обратная ситуация: образцы с повышенным уровнем экспрессии R2R1 в условиях FHR2R1 располагаются на большем расстоянии от кластера генов, имеющих отношение к ресничкам, по осям XY. Например, образцы от донора с хроническим обструктивным заболеванием легких (Br370) в условиях FHR2R1, взятые в 1-ю неделю воздействия воздуха (1АЕ) располагаются на противоположном конце кластера генов, относящихся к цилиогенезу. На картограммах, представленных на фиг. 15, 16 и 17, влияние "выключения" генов R2R1 на цилиогенез в клетках РВЕС от донора с хроническим обструктивным заболеванием легких (Br370) не вполне очевидно. Однако дальнейший анализ выявил, что "выключение" экспрессии генов R2R1 в клетках РВЕС от донора с хроническим обструктивным заболеванием легких (Br370) приводит к смещению ближе к кластеру генов, относящихся к цилиогенезу, по осям XY (см. фиг. 18). Результаты этого независимого анализа указывают на восстановление цилиогенеза в клетках РВЕС при хроническом обструктивном заболевании легких.

Наконец, анализ с помощью пакета программ LIMMA ("от гена к гену") подтверждает влияние нокдауна генов R2R1 на цилиогенез в клетках РВЕС от донора с хроническим обструктивным заболеванием легких (Br370). Графики логарифмической (\log_2) зависимости интенсивности для экспрессии служившего примером гена ROPN1L (фиг. 19, 20 и 21) иллюстрируют восстановление цилиогенеза в клетках РВЕС от донора с хроническим обструктивным заболеванием легких (Br370).

2.6. Изменения транскриптома должно отражаться в фенотипе клетки. Наличие транскриптов генов, имеющих отношение к цилиогенезу, должно приводить к увеличению количества реснитчатых клеток в выращиваемых в условиях ALI культурах РВЕС от индивидов с хроническими обструктивными заболеваниями легких.

Чтобы клеточный фенотип, характерный при хронических обструктивных заболеваниях легких, изменился в сторону нормы, нужно увеличение количества реснитчатых клеток. Поэтому следовало доказать, что повышение уровня экспрессии генов, имеющих отношение к цилиогенезу, сопровождается увеличением количества реснитчатых клеток.

Клетки РВЕС (культивирувавшиеся параллельно в описанных выше экспериментах) окрашивали иммуногистохимическими методами, а именно:

окрашивание ядра: флуоресцентный краситель 4,6-диамино-2-фенилиндо-дигидрохлорид (DAPI);

окрашивание клеток, продуцирующих слизь: антитела(45M1) против MUC5AC + вторичные антитела (куриные антитела против мышинового IgG (H+L), конъюгированные с флуоресцентным красителем Alexa Fluor® 488);

окрашивание реснитчатых клеток: моноклональные антитела против ацетилированного тубулина (клон 6-11B-1)+вторичные антитела (козьи антитела против мышинового IgG (H+L), конъюгированные с флуоресцентным красителем Alexa Fluor® 594);

Окрасившиеся клетки подсчитывали из 10 полей (увеличение $\times 20$). На фиг. 22 точечная диаграмма (черточки - средние значения со стандартным отклонением SD) иллюстрирует, что понижение уровня экспрессии R2R1 (в условиях кшПНК_R2R1) приводит к увеличению количества реснитчатых клеток среди РВЕС в отсутствие обструктивных поражений легких (Br331) и при хроническом обструктивном заболевании легких (Br370). Верно и обратное: повышение уровня экспрессии R2R1 ведет к исчезновению реснитчатых клеток (см. фиг. 23). Отрицательный контроль для опосредованного кшПНК_R2R1 нокдауна экспрессии R2R1 - экспрессия отрицательной контрольной кшПНК_ОК. Отрицательный контроль для экспрессии FHR2R1 - экспрессия конструкции, FH-метка.

Изменения экспрессии R2R1 не ведут к изменению количества клеток, продуцирующих слизь (см. фиг. 24, 25). Это чрезвычайно важно, поскольку увеличение количества клеток, продуцирующих слизь, усугубляет симптомы заболевания. Собственно, и при хроническом обструктивном заболевании легких (Br370) и в отсутствие обструктивного поражения легких (Br331) клетки РВЕС дают одинаковое количество клеток, продуцирующих слизь, на 3-ю неделю воздействия воздуха (не зависимо от условий). Этим еще раз подчеркивается тот факт, что основным движущим фактором фенотипа, характерного для хронических обструктивных заболеваний легких, является дефектный цилиогенез.

В иллюстративных целях приведены фиг. 26-29. На каждой из них верхний ряд представляет тройное окрашивание клеток РВСЕ (синий цвет - ядра; зеленый - клетки, продуцирующие слизь; красный - реснитчатые клетки). Нижний ряд представляет только реснитчатые клетки (красные) в тех же полях, что и в верхнем ряду.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Применение соединения, которое связывается, ассоциирует или взаимодействует с репрессорным комплексом 1 Polysomb (PRC1) и/или с группой Trithorax - лейкемия смешанного происхождения (TrxG-MLL), для лечения и/или профилактики заболеваний и/или состояний, связанных с аномальным или недостаточным цилиогенезом, где соединение создает помехи, предотвращает или ингибирует связывание между нативным регенеративным геном респираторных клеток 1 (R2R1) или R2R1 дикого типа с PRC1 и/или с TrxG-MLL и/или с каким-либо из их компонентов или субъединиц.

2. Применение по п.1, где соединение связывается или ассоциирует с сайтами связывания R2R1 в комплексе PRC1 и/или в комплексе TrxG-MLL.

3. Применение по любому из предыдущих пунктов, где соединение связывается или ассоциирует с белком 2, содержащим домен RING (RNF2) - субъединицей PRC1.

4. Применение по любому из предыдущих пунктов, где соединение связывается или ассоциирует с белковыми субъединицами DPY-30 и/или ASH2L комплекса TrxG-MLL.

5. Применение по любому из предыдущих пунктов, где соединение выбирают из группы, состоящей из нуклеиновых кислот; антисмысловых олигонуклеотидов; углеводов; белков/пептидов; низкомолекулярных соединений и антител или их антиген-связывающих или мишень-связывающих фрагментов.

6. Применение по любому из предыдущих пунктов, где соединение создает помехи, предотвращает или ингибирует связывание между нативным R2R1 или R2R1 дикого типа с PRC1 и/или с TrxG-MLL, и соединение содержит последовательность, соответствующую SEQ ID NO: 1, 2, 3 или 4, последовательность, по меньшей мере на 70% идентичную ей или ее фрагмент, связывающий PRC1 и/или с TrxG-MLL.

7. Применение по любому из предыдущих пунктов, где соединение создает помехи, предотвращает или ингибирует связывание между нативным R2R1 или R2R1 дикого типа с PRC1 и/или с TrxG-MLL, белок или пептид содержит последовательность, соответствующую последовательности SEQ ID NO: 5 или 6, или последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную им, или ее фрагмент, связывающий PRC1 и/или с TrxG-MLL.

8. Применение по любому из предыдущих пунктов, где соединение является антисмысловым олигонуклеотидом, ослабляющим, подавляющим и/или прекращающим экспрессию, функцию и/или активность гена R2R1.

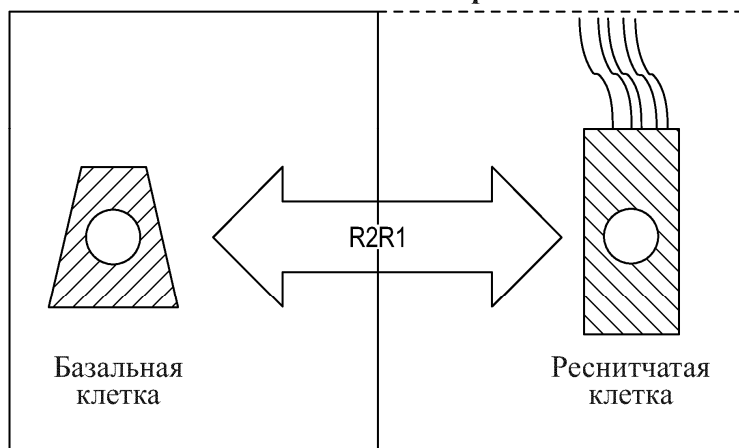
9. Применение по любому из предыдущих пунктов, где соединение является антителом, способным связываться с R2R1 или с сайтами связывания R2R1 в комплексе PRC1 и/или в комплексе TrxG-MLL.

10. Применение по любому из предыдущих пунктов, где соединение предназначено для использования при лечении или профилактике аномального цилиогенеза.

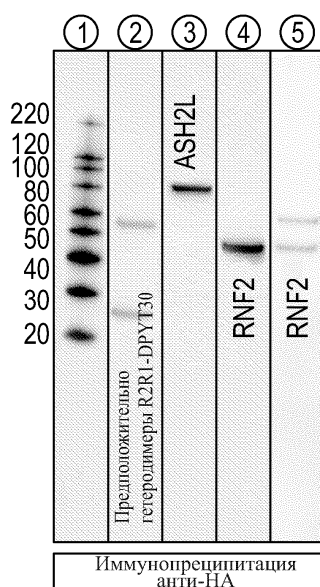
11. Применение по любому из предыдущих пунктов, где соединение предназначено для использования при лечении или профилактике цилиопатий.

12. Применение по любому из предыдущих пунктов, где соединение предназначено для использования при лечении или профилактике хронических обструктивных заболеваний легких (COPD).

13. Применение по п.1 или 11, где заболевание или состояние, вызванное аномальным или неполноценным цилиогенезом или цилиопатией, выбрано из первичной цилиарной дискинезии, гидроцефалии, поликистоза печени и поражений почек, дегенерацией сетчатки, нефронофтиса, синдрома Барде-Бидля, синдрома Альстрема и синдрома Меккеля-Грубера.

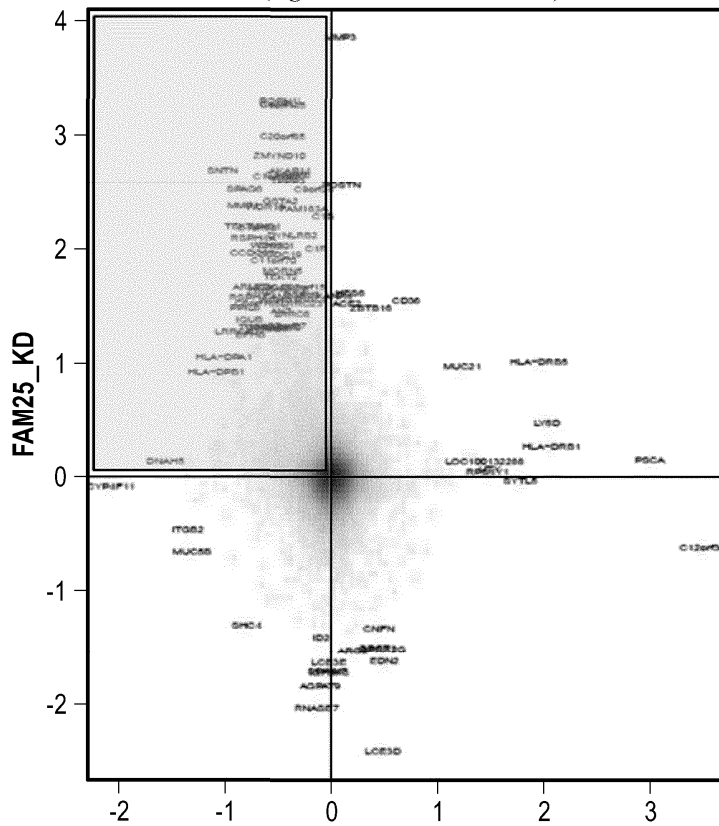
Равновесие базальные клетки \rightleftharpoons реснитчатые клетки

Фиг. 1



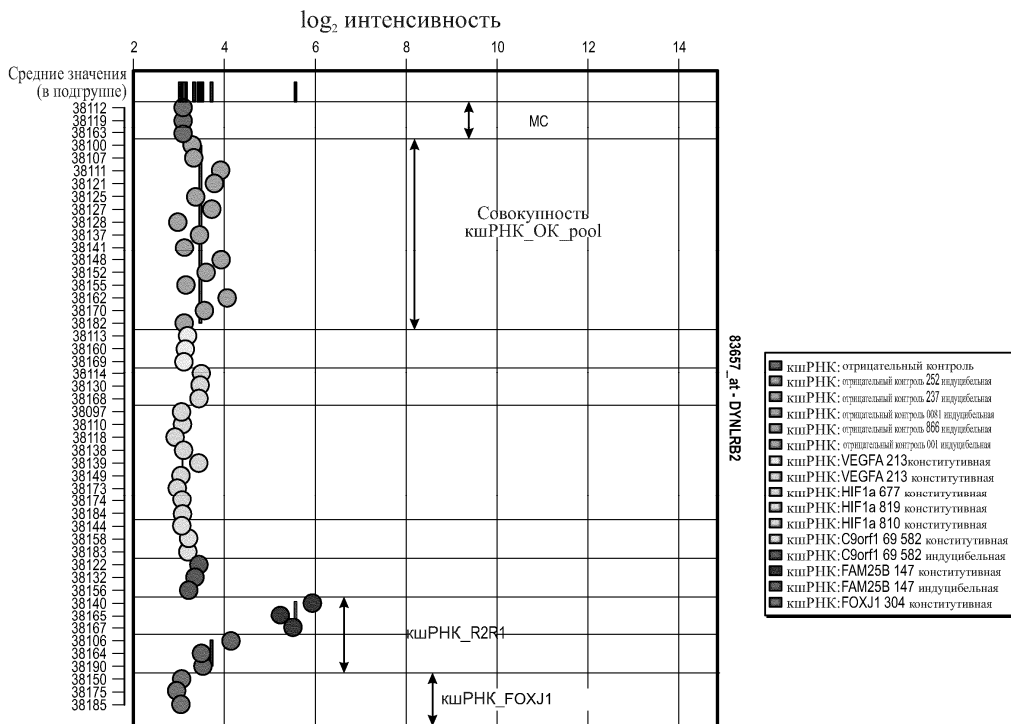
Фиг. 2

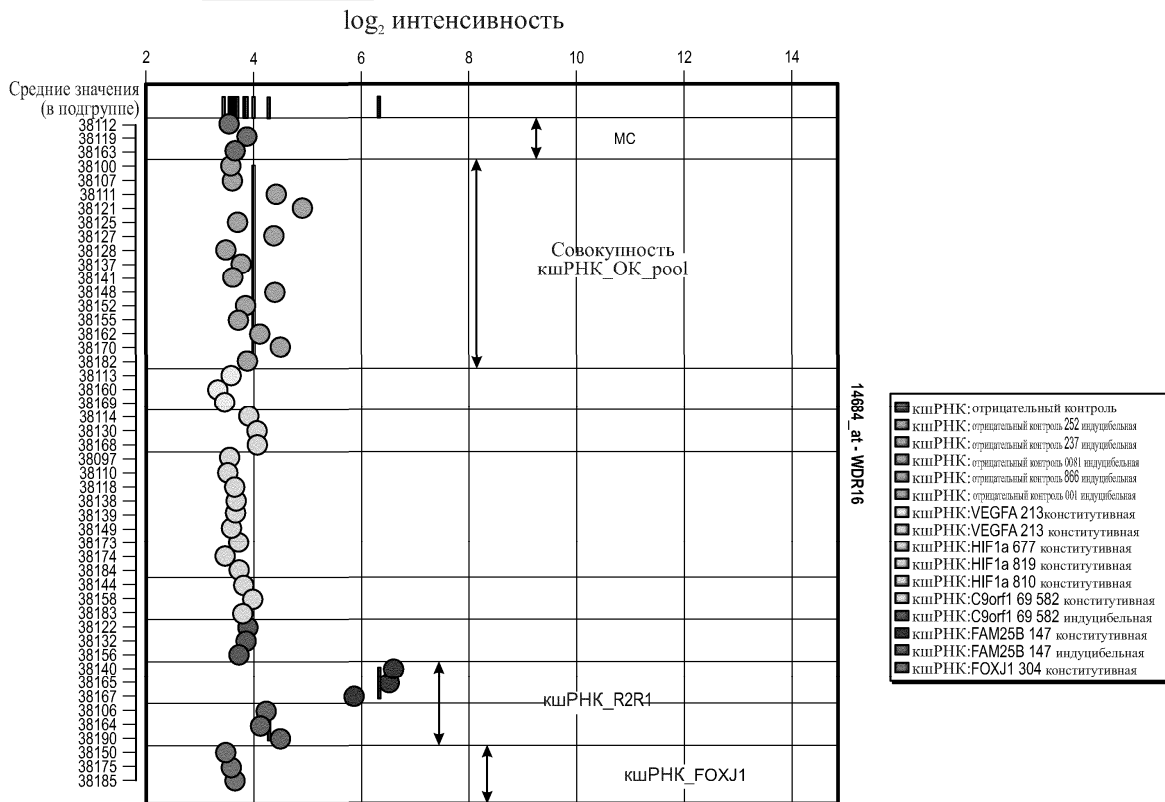
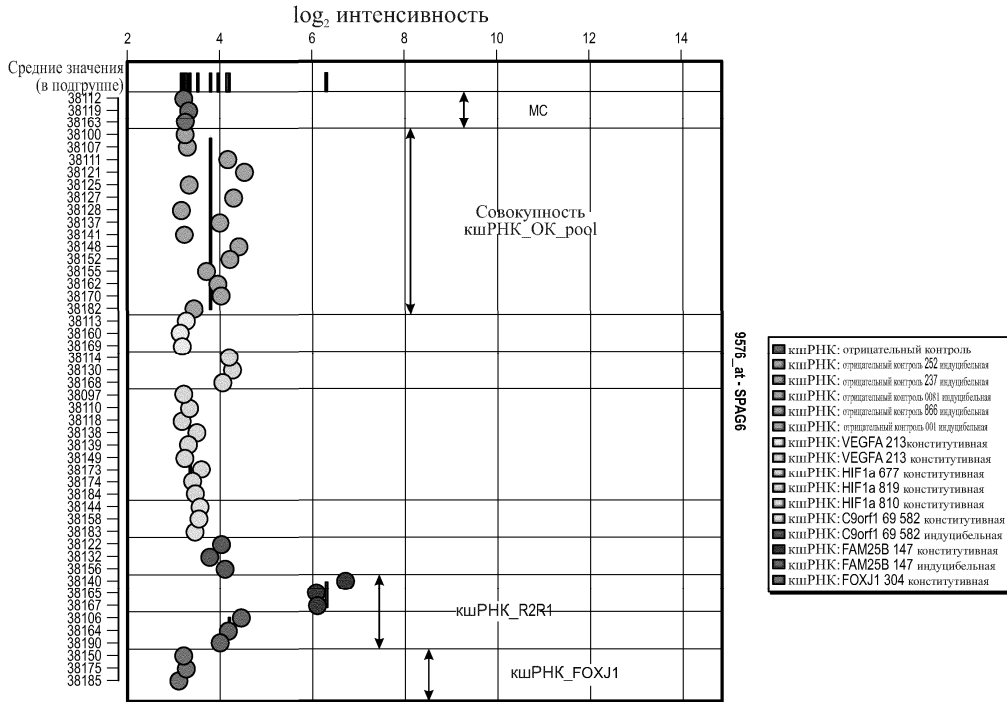
Сравнение дифференциальной экспрессии
(logRatio для каждого гена)

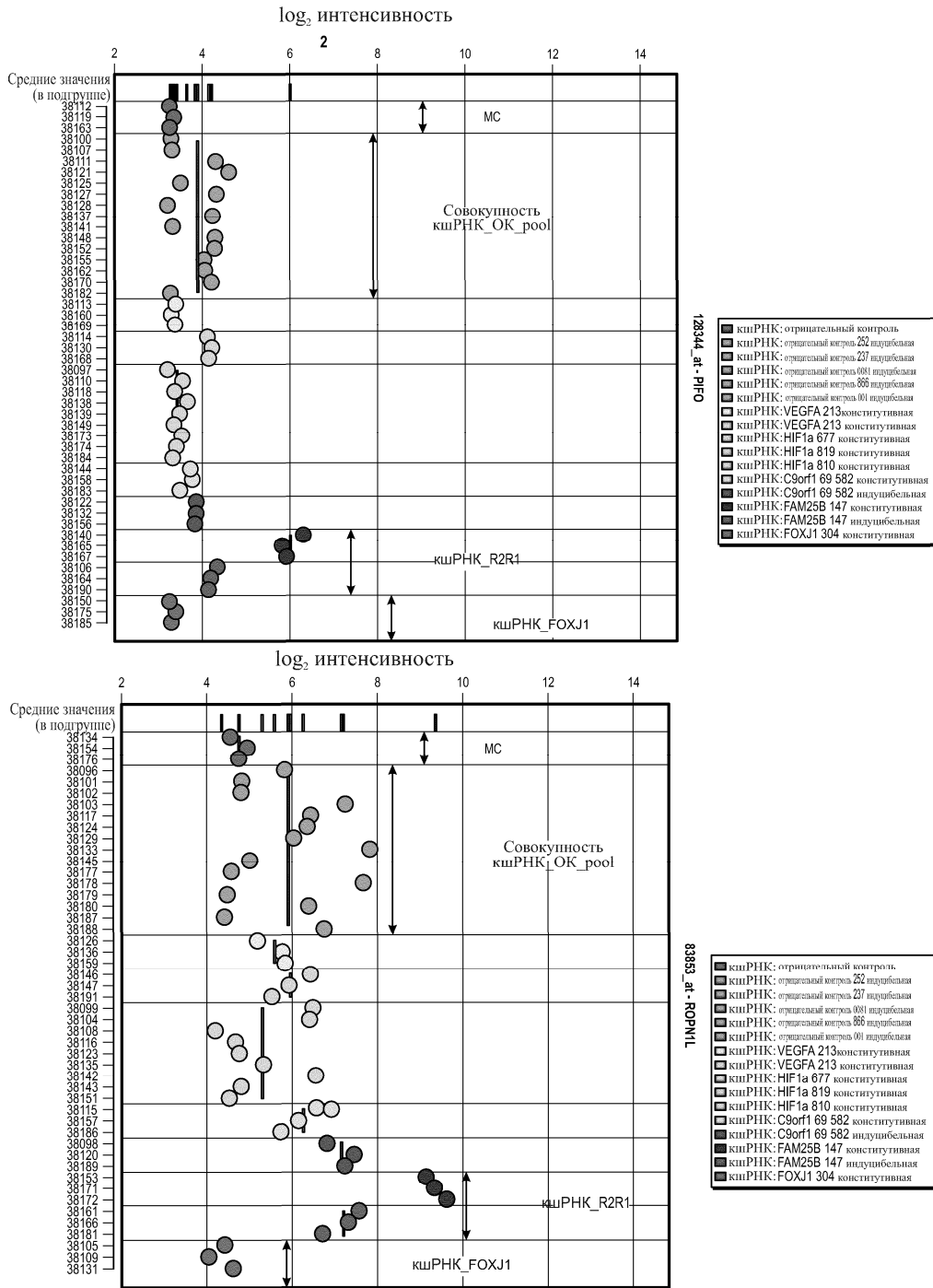


Хронические обструктивные
заболевания легких

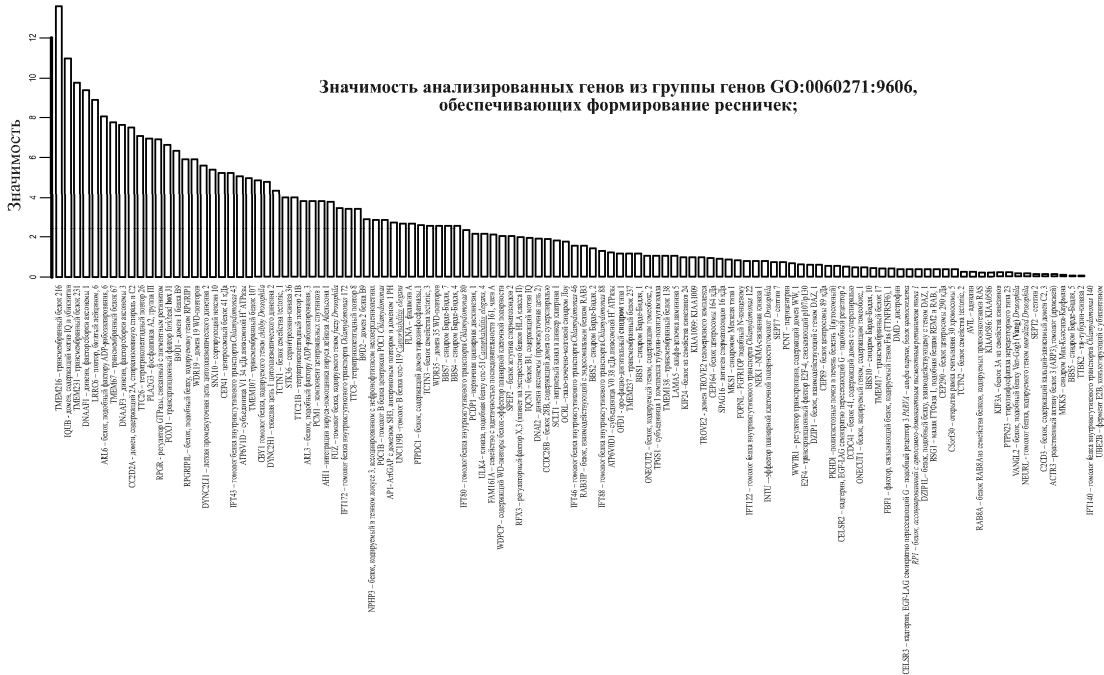
Фиг. 3

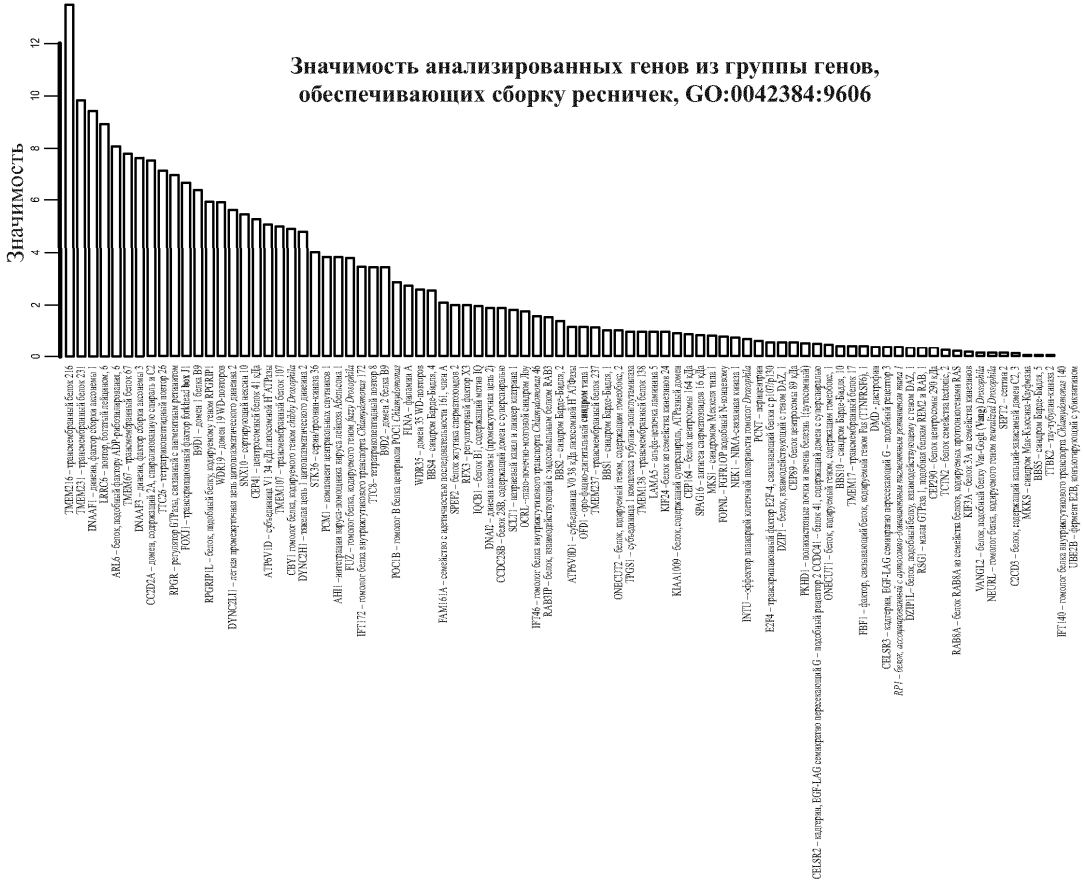




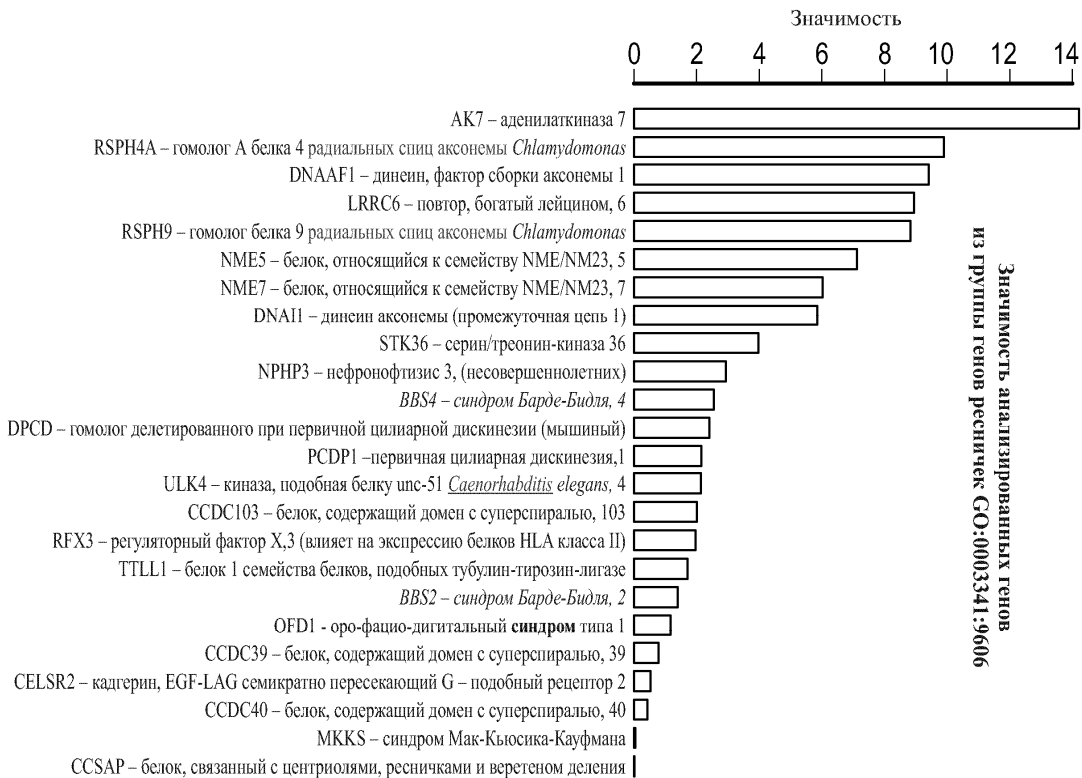


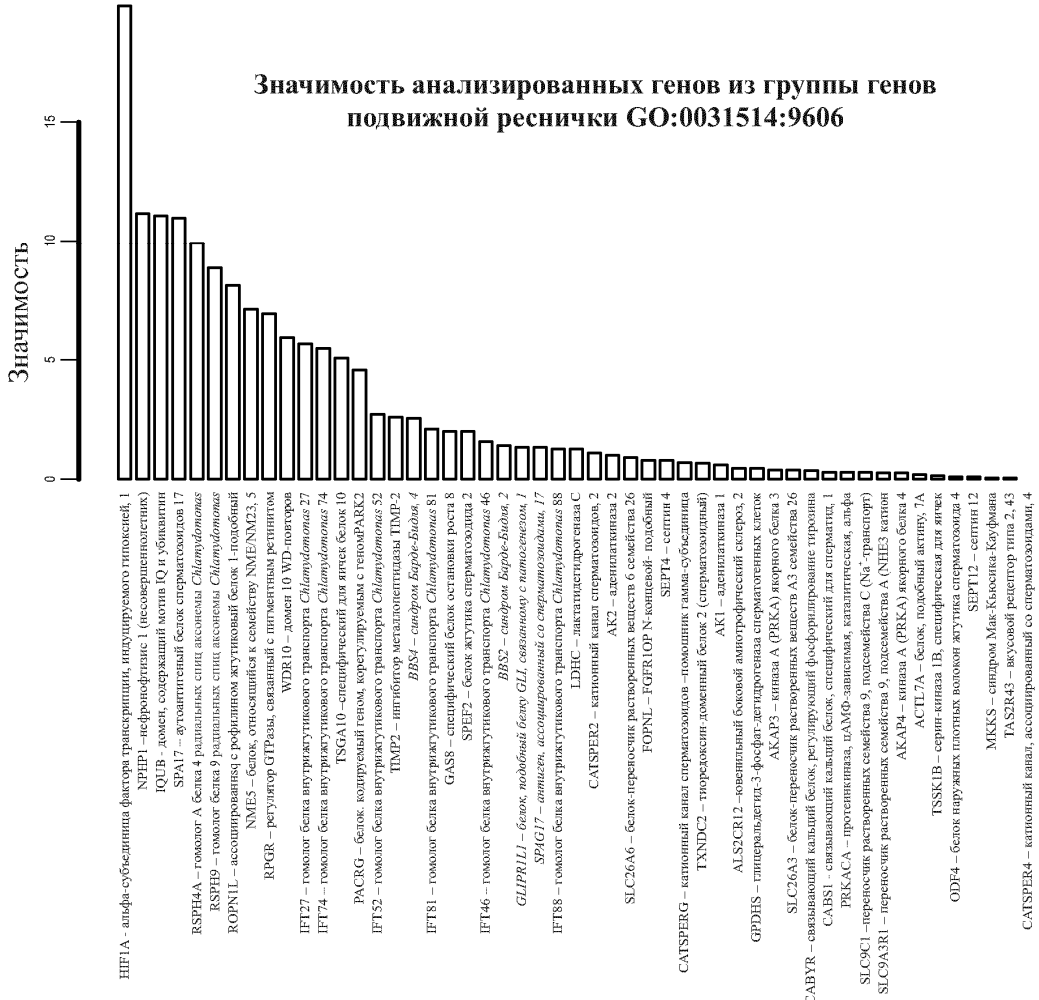
Фиг. 4



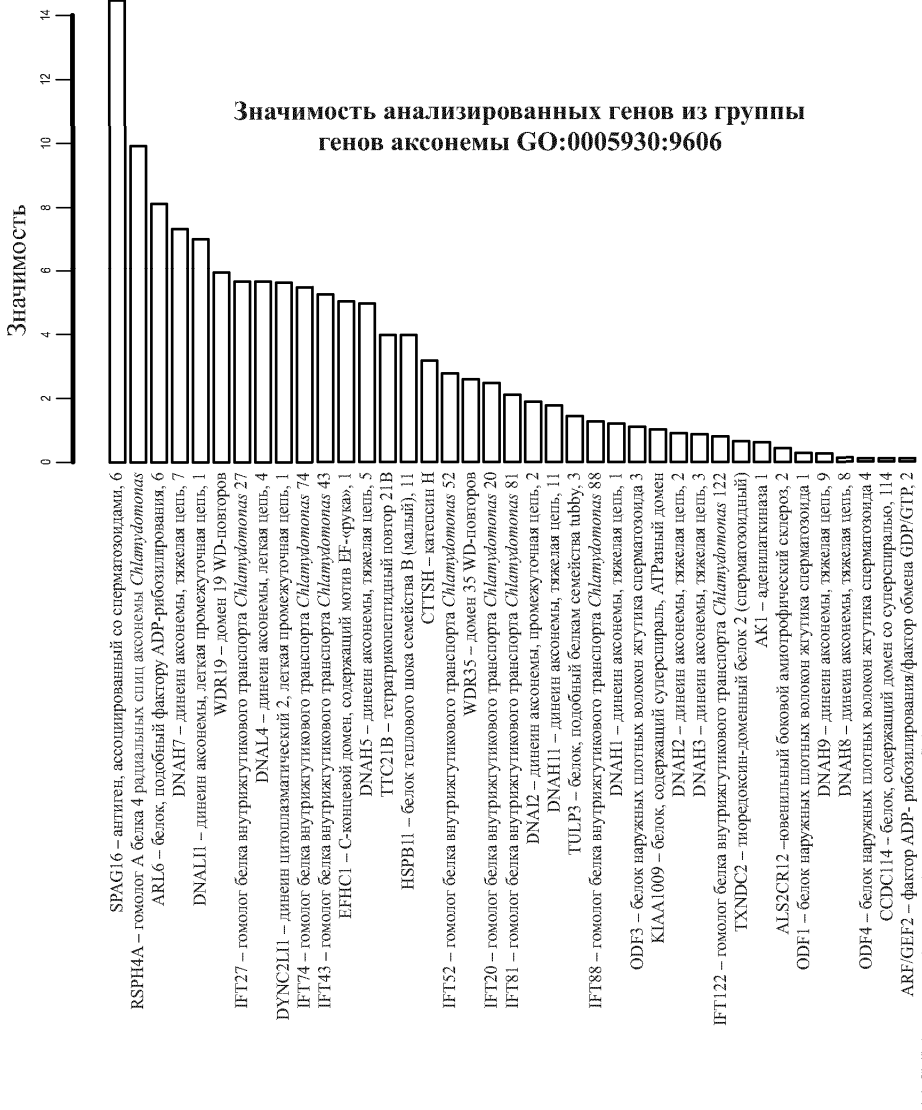


Значимость анализированных генов из группы генов, обеспечивающих сборку ресничек, GO:0042384:9606

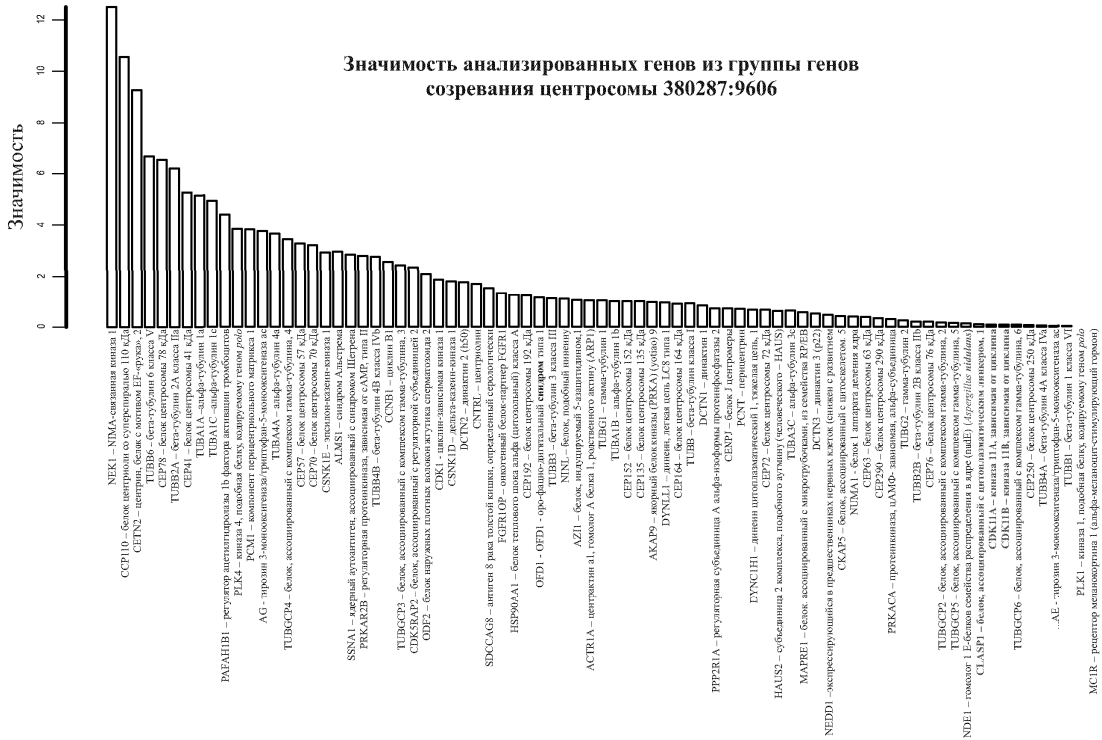




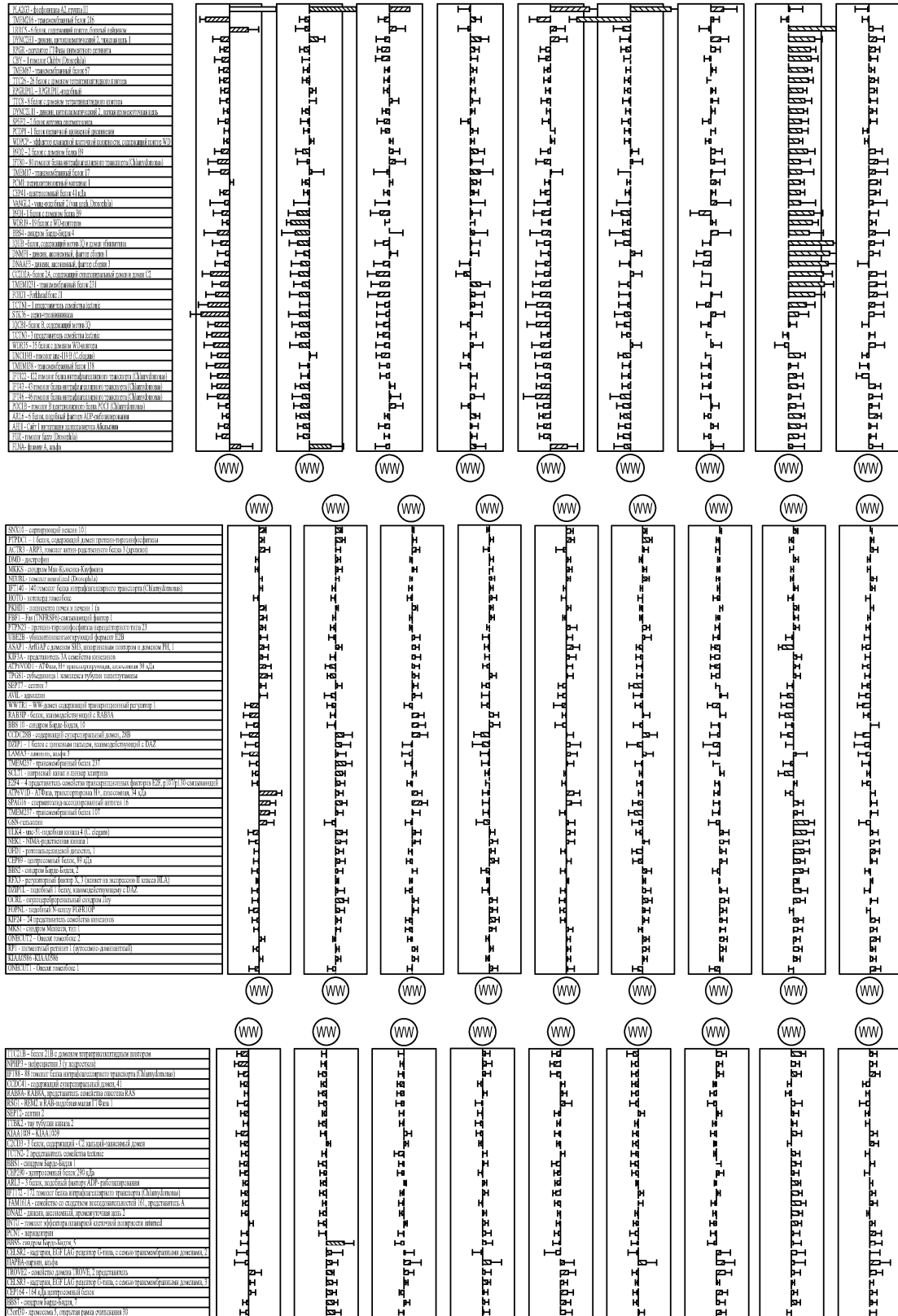
Значимость анализированных генов из группы генов аксоныемы GO:0005930:9606



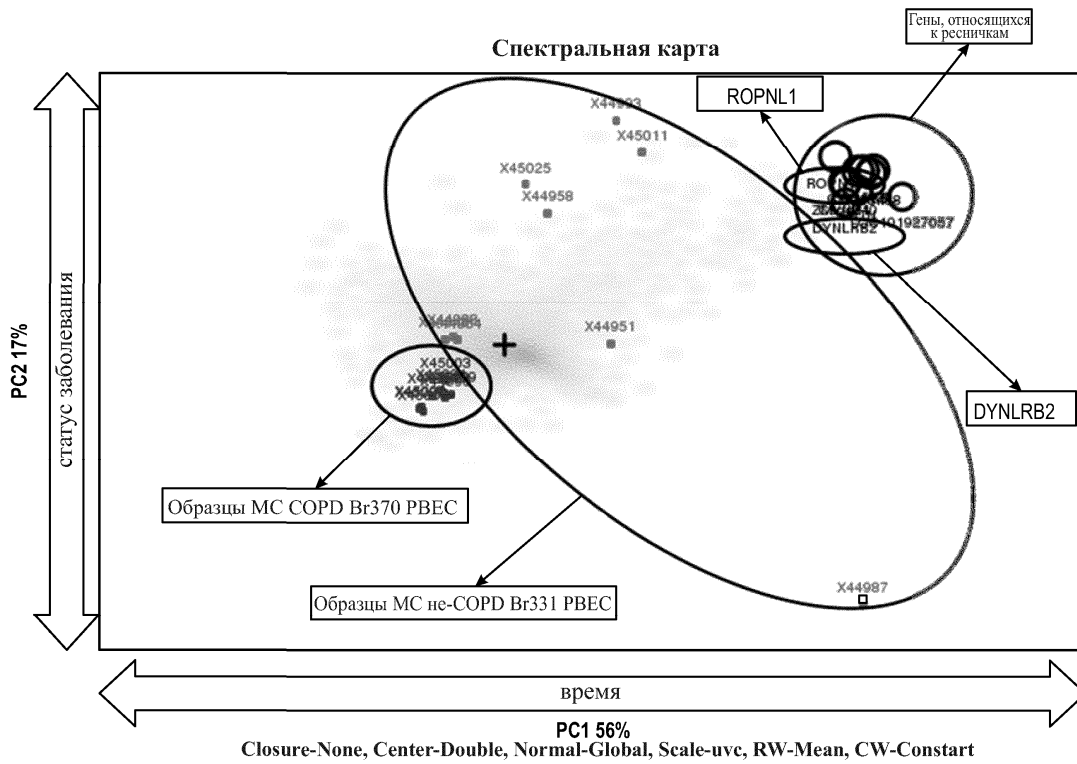
Значимость анализированных генов из группы генов созревания центросомы 380287:9606



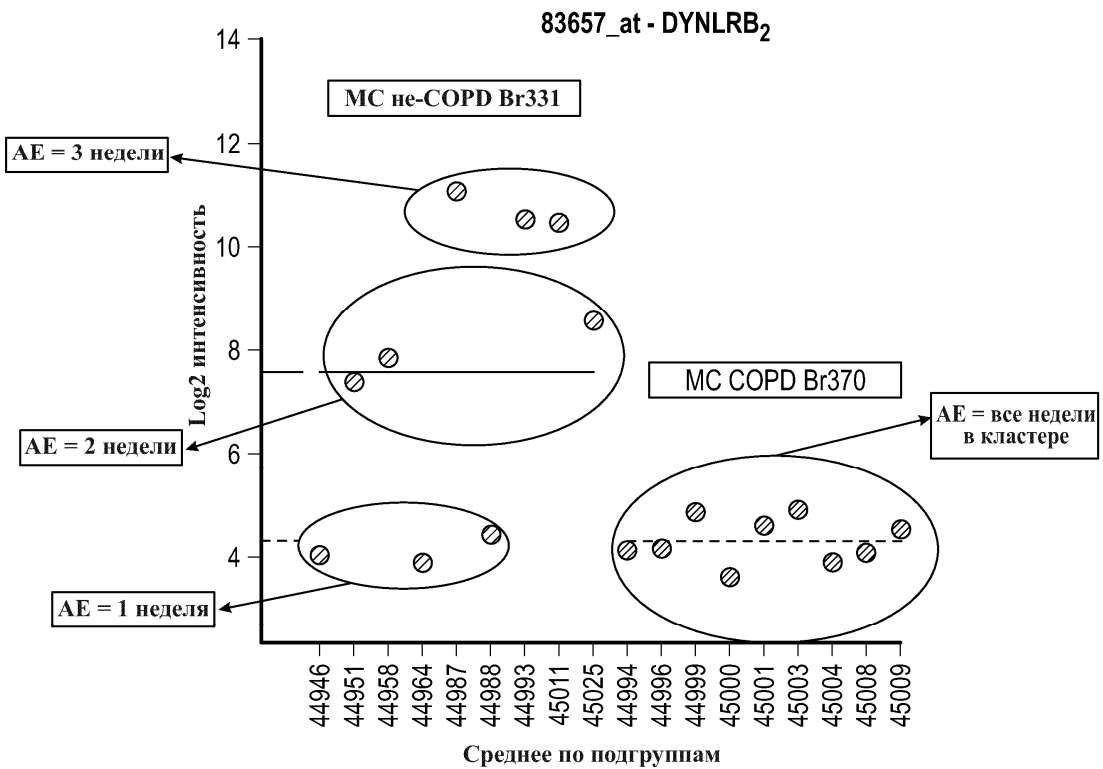
Группа 1: контроль среды
 Группа 3: VEGFA213 конститутивный
 Группа 4: VEGFA213 индуцибельный
 Группа 5: HF-1a 677 конститутивный
 Группа 6: C9orf169 582 конститутивный
 Группа 7: C9orf169 582 индуцибельный
 Группа 8: FAM55B 147 конститутивный
 Группа 9: FAM55B 147 индуцибельный
 Группа 10: FOXJ1 304 конститутивный



Фиг. 7

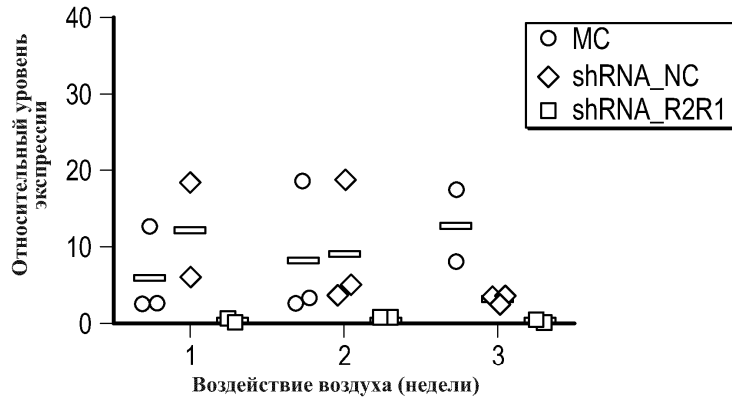


Фиг. 8

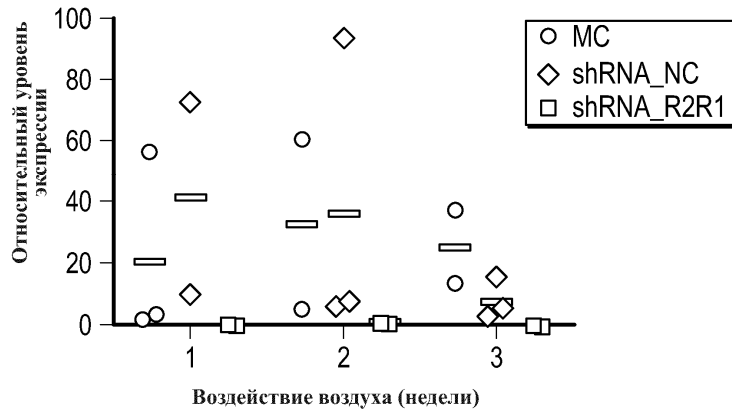


Фиг. 9

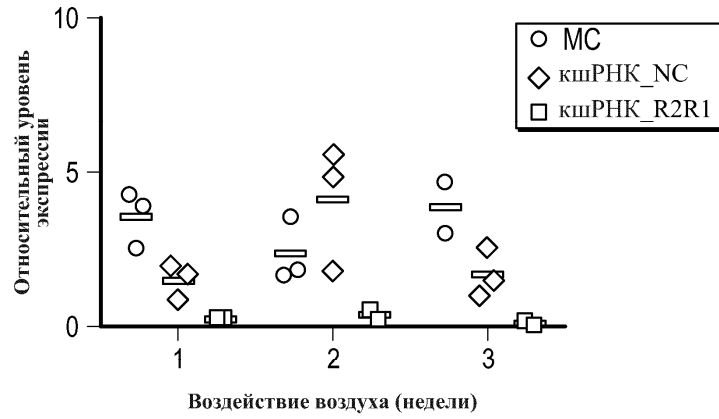
Донор без обструктивного поражения легких (Br331)///
 Относительный уровень экспрессии R2R1
 (опыт Hs04194072_mH ABI) /// Нормированные данные (PPIB)



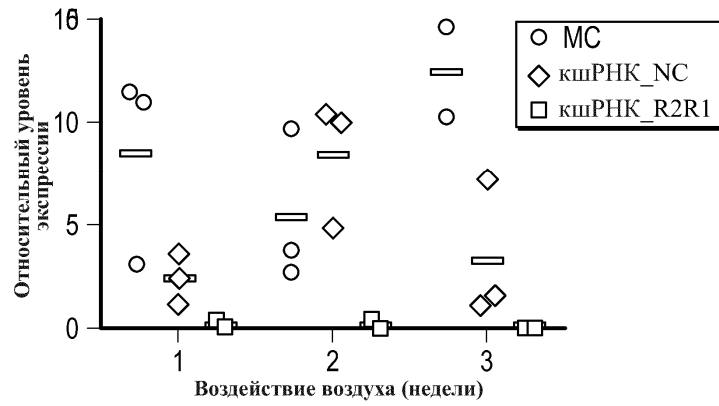
Донор без обструктивного поражения легких (Br331)///
 Относительный уровень экспрессии R2R1
 (опыт Hs04194073_mH ABI)



Донор с хроническим обструктивным заболеванием
 легких (Br370) // Относительный уровень экспрессии
 R2R1 (опыт Hs04194072_mH ABI) //
 Нормированные данные (PPiV)

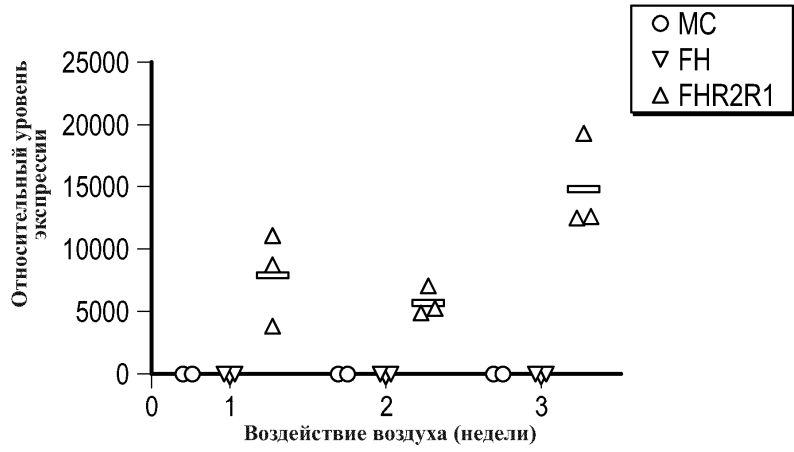


Донор с хроническим обструктивным заболеванием
 легких (Br370) // Относительный уровень экспрессии
 R2R1 (опыт Hs04194073_mH ABI)

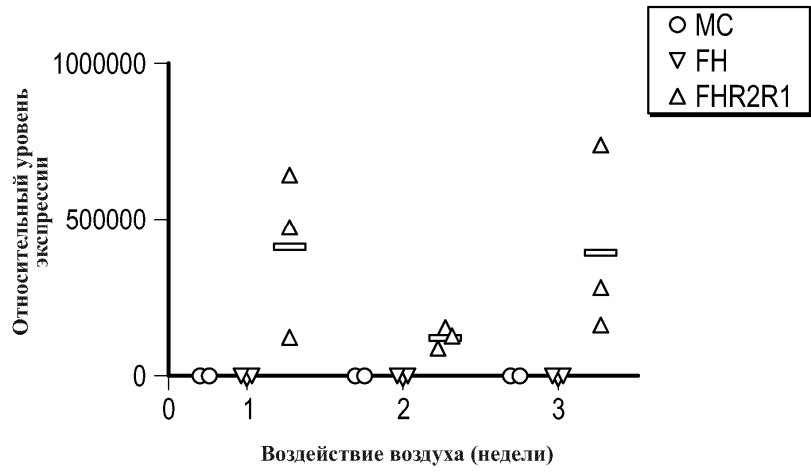


Фиг. 10

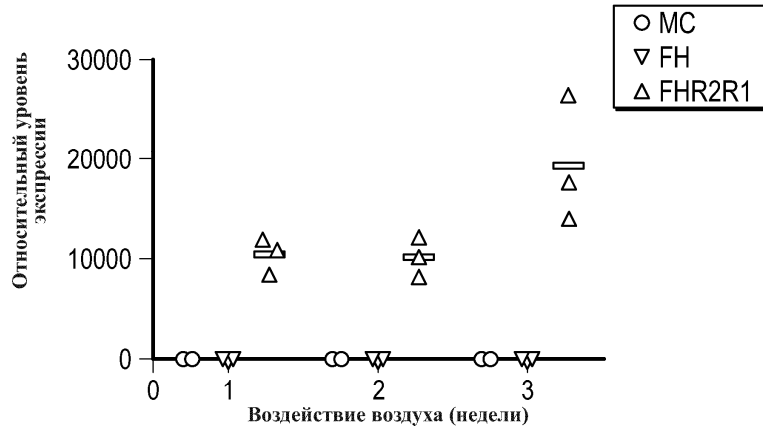
Донор без обструктивного поражения легких (Br331) ///
 Относительный уровень экспрессии
 R2R1 (опыт Hs04194072_mH ABI) /// Нормированные данные (PPIB)



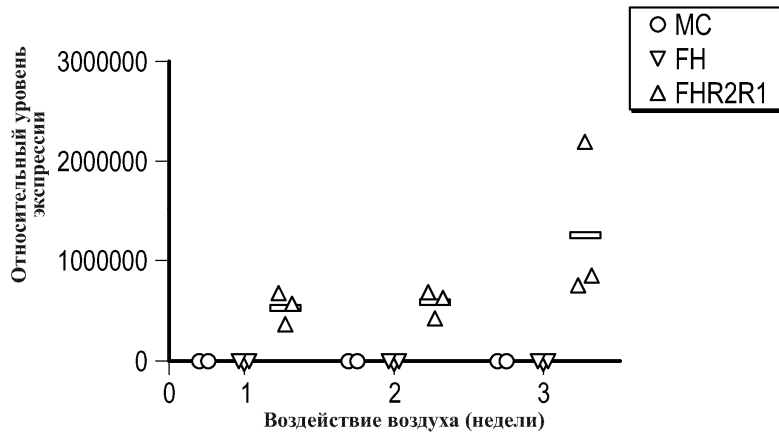
Донор без обструктивного поражения легких (Br331) ///
 Относительный уровень экспрессии
 R2R1 (опыт Hs04194073_mH ABI)



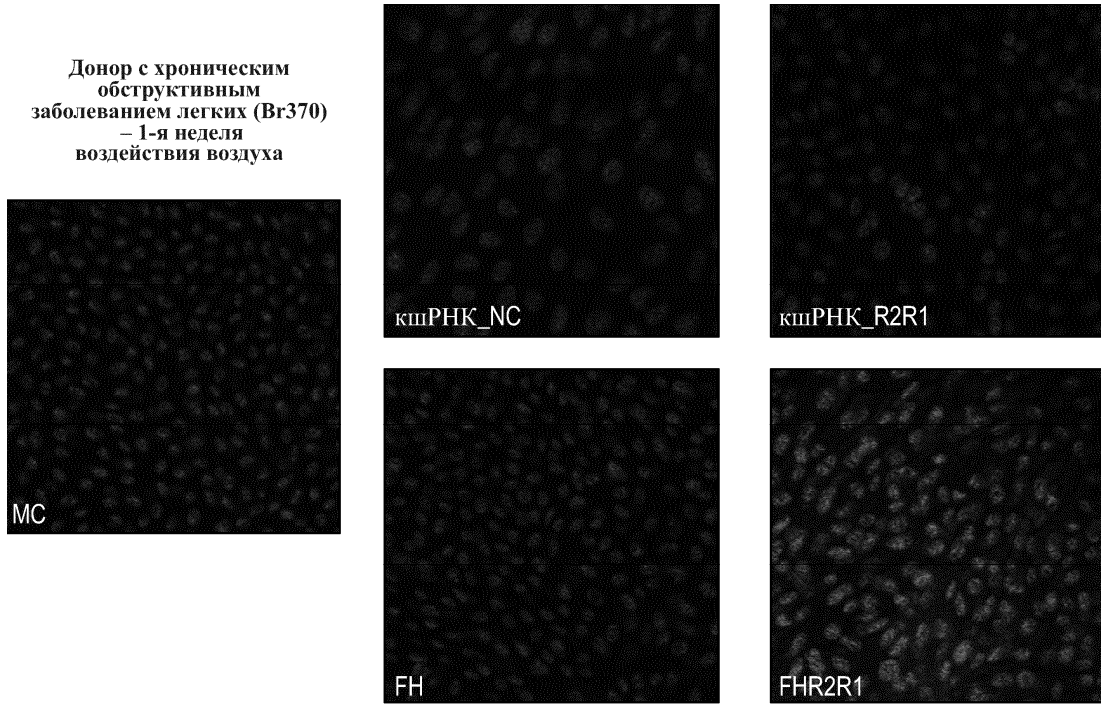
Донор с хроническим обструктивным заболеванием легких (Br370) ///
Относительный уровень экспрессии
R2R1 (опыт Hs04194072_mH ABI) /// Нормированные данные (PPIB)



Донор с хроническим обструктивным заболеванием легких (Br370) ///
Относительный уровень экспрессии R2R1 (опыт Hs04194073_mH ABI)

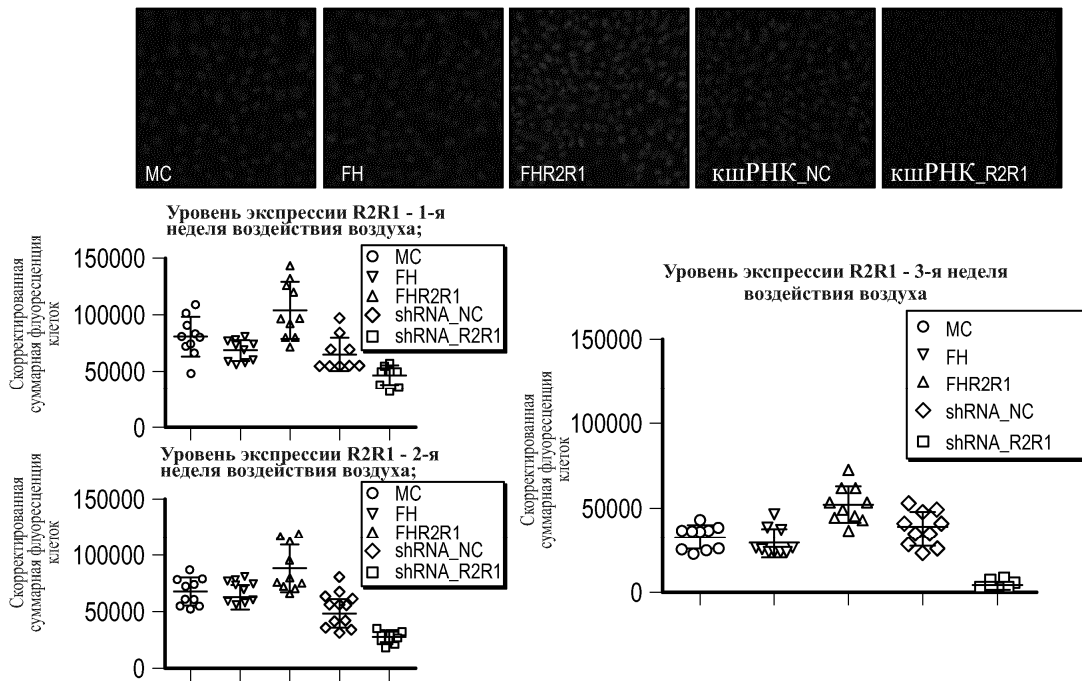


Фиг. 11



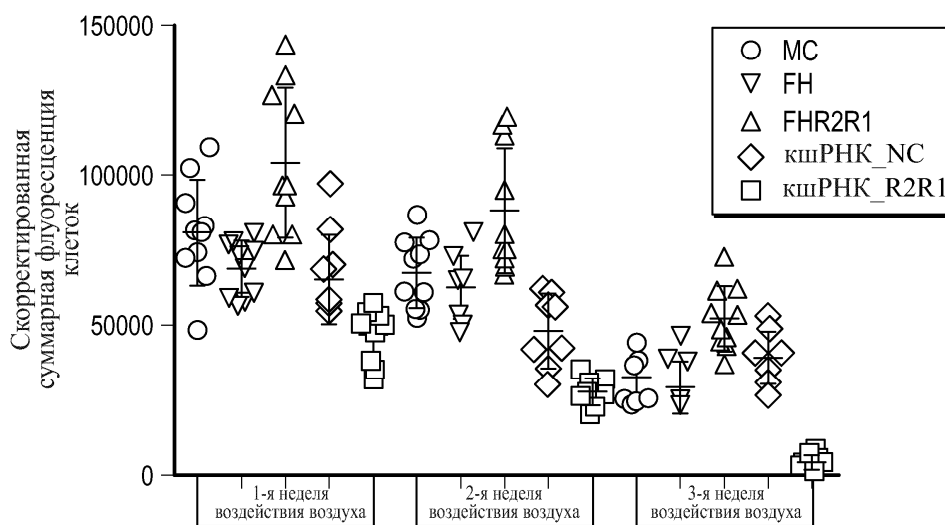
Фиг. 12

Донор без обструктивного поражения легких (Br331) – 3-я неделя воздействия воздуха;



Фиг. 13

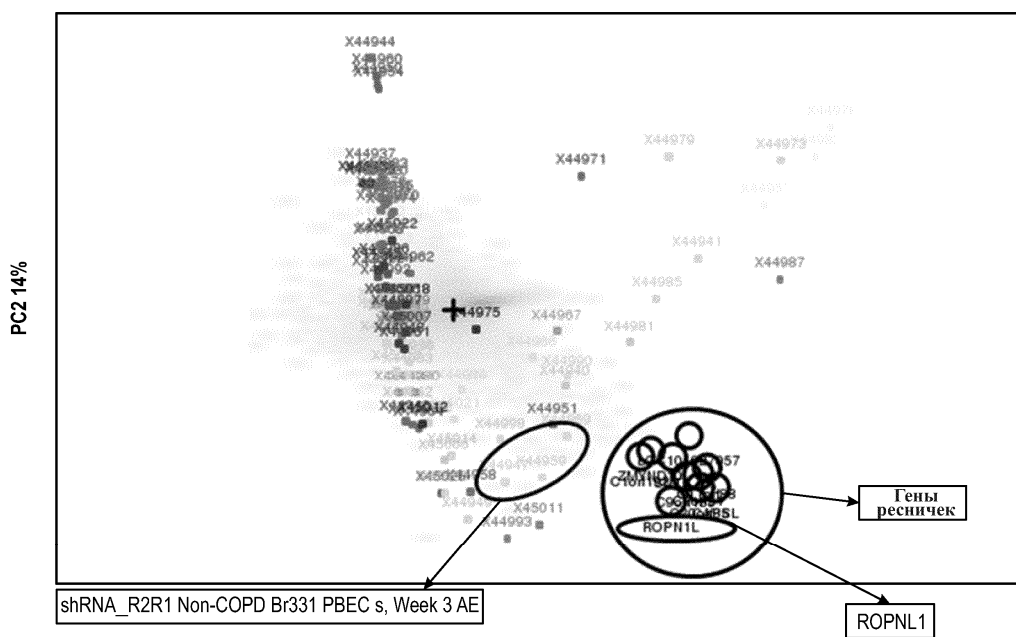
Донор без обструктивного поражения легких (Br331) ///
экспрессия белка R2R1 – 1-я, 2-я, 3-я неделя воздействия воздуха;



Фиг. 14

Спектральная карта

Условия опыта (MC, FH&FHR2R1,кшPHK-NC и кшPHK_R2R1) при хроническом обструктивном заболевании легких (Br370) и без него (Br331) ///
Все моменты времени: недели 1,2,3 воздействия воздуха

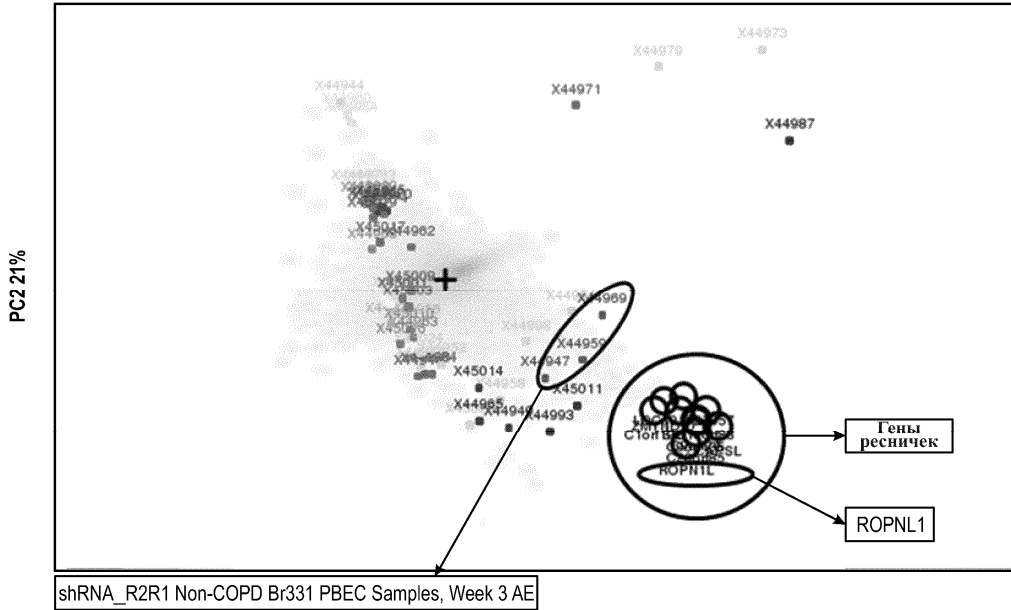


кшPHK_R2R1, образцы клеток PBEC от донора без обструктивного поражения легких (Br331) 3 недели воздействия воздуха

Фиг. 15

Спектральная карта

Условия опыта (МС, кшРНК-NC и кшРНК_R2R1) при хроническом обструктивном заболевании легких (Br370) и без него (Br331)
 Все моменты времени: недели 1,2,3 воздействия воздуха



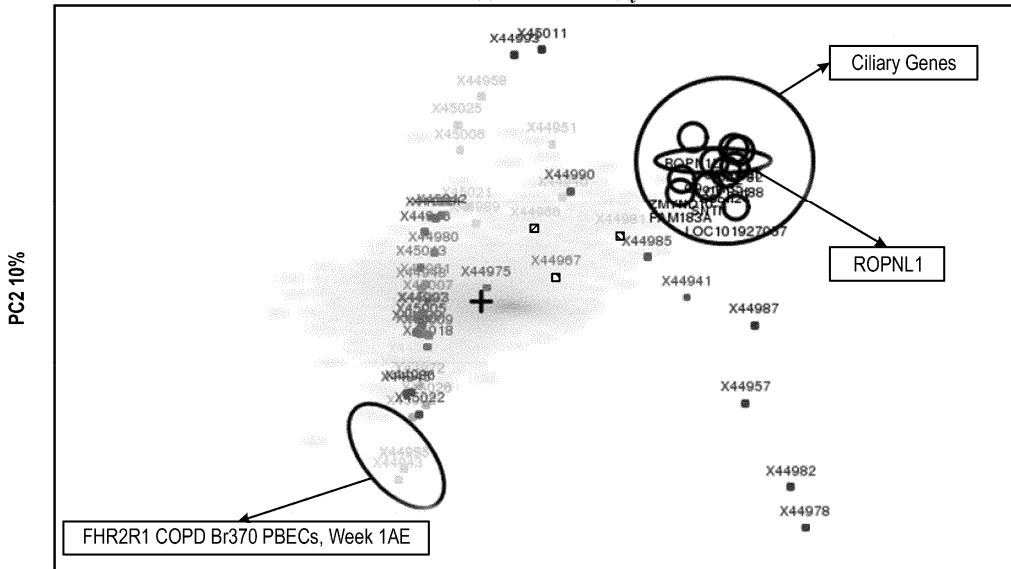
PC1 39%

кшРНК_R2R1, образцы клеток PBEC от донора без обструктивного поражения легких (Br331) 3 недели воздействия воздуха

Фиг. 16

Спектральная карта

FHR2R1, образцы клеток PBEC от донора с хроническим обструктивным заболеванием легких (Br370) \\\ 3 недели воздействия воздуха

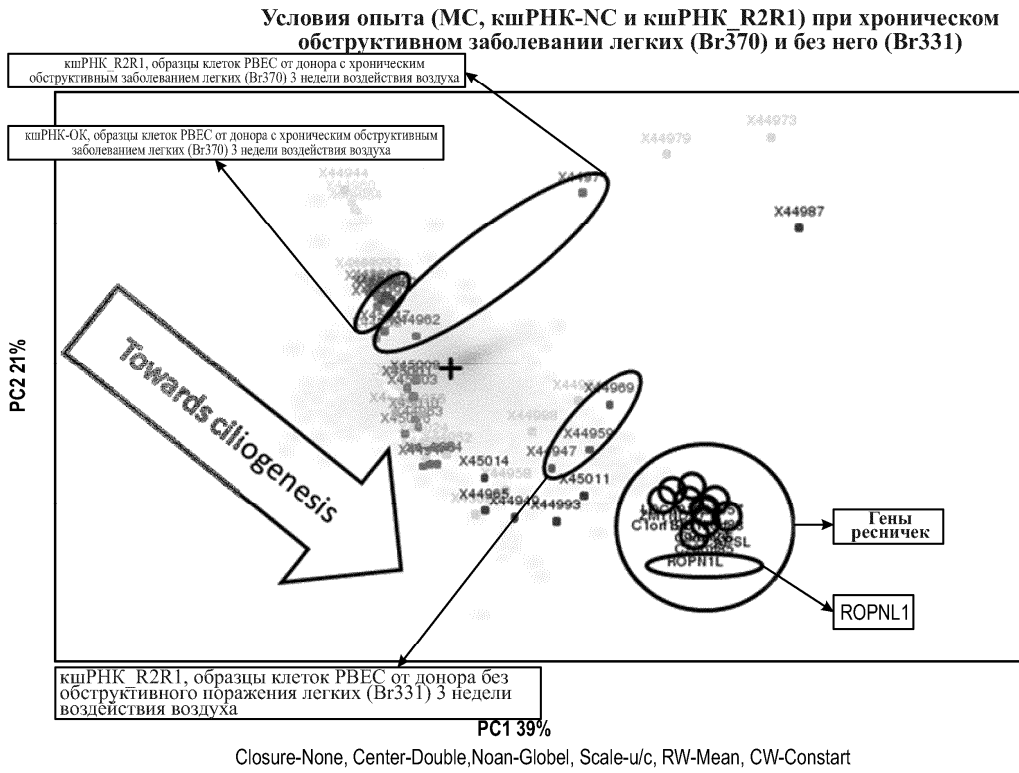


PC1 55%

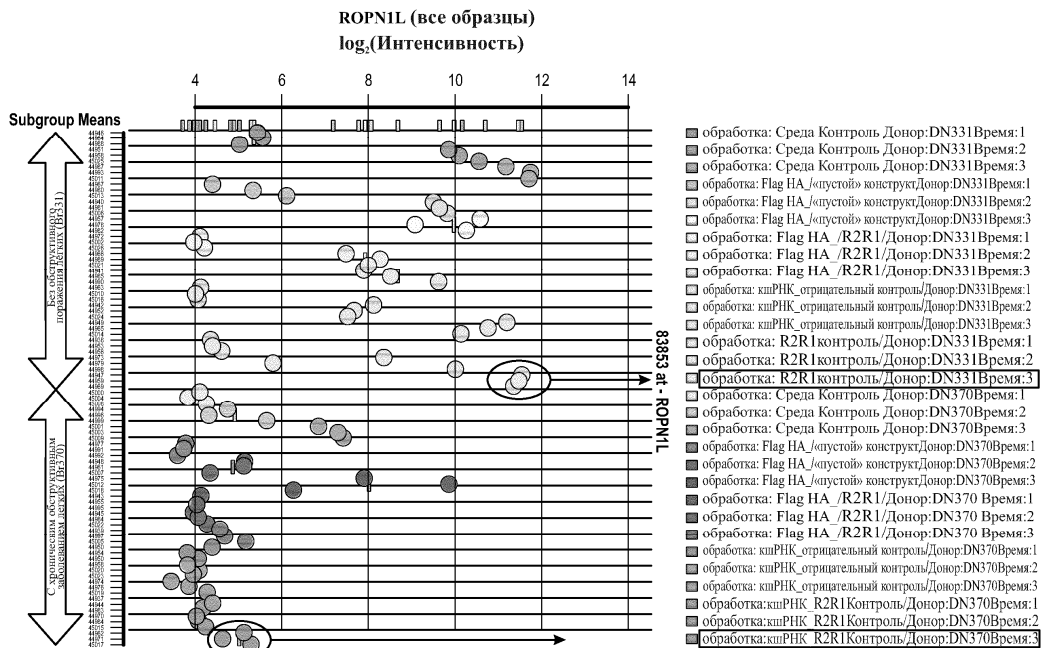
Closure-None, Center-Double, Noan-Globel, Scale-u/c, RW-Mean, CW-Constart

Фиг. 17

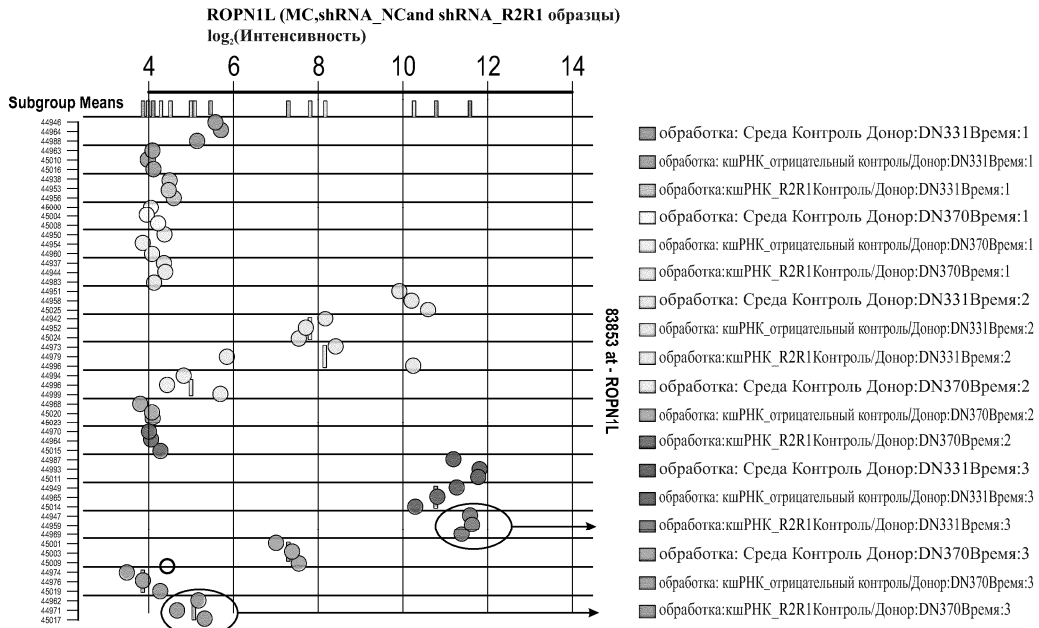
Спектральная карта



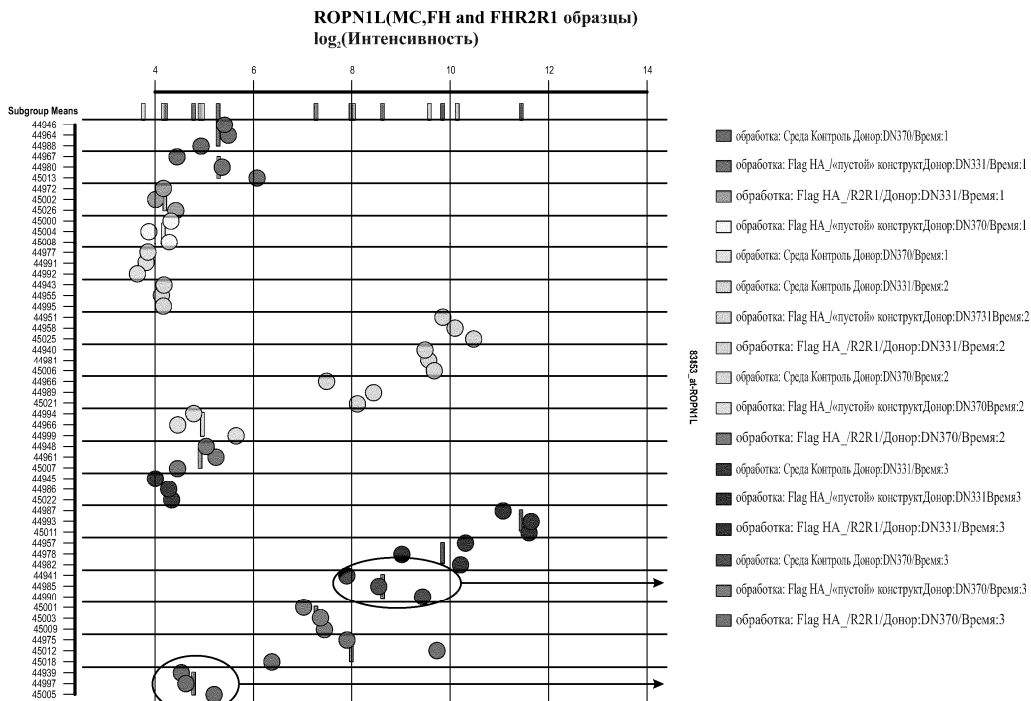
Фиг. 18



Фиг. 19

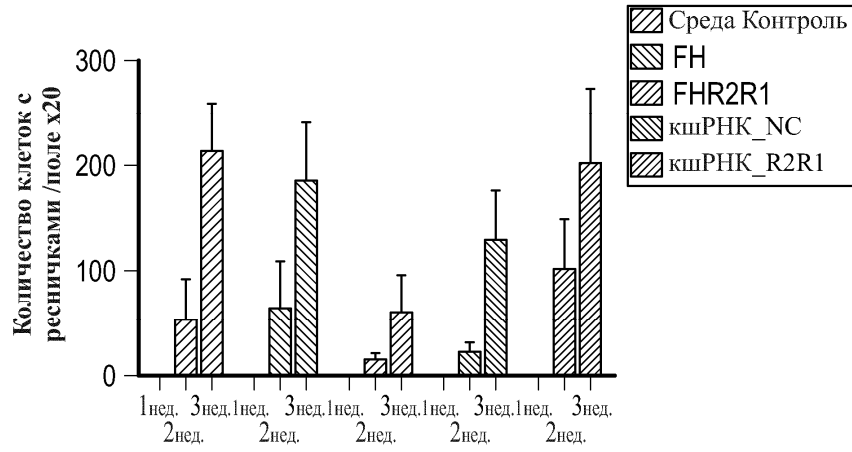


Фиг. 20

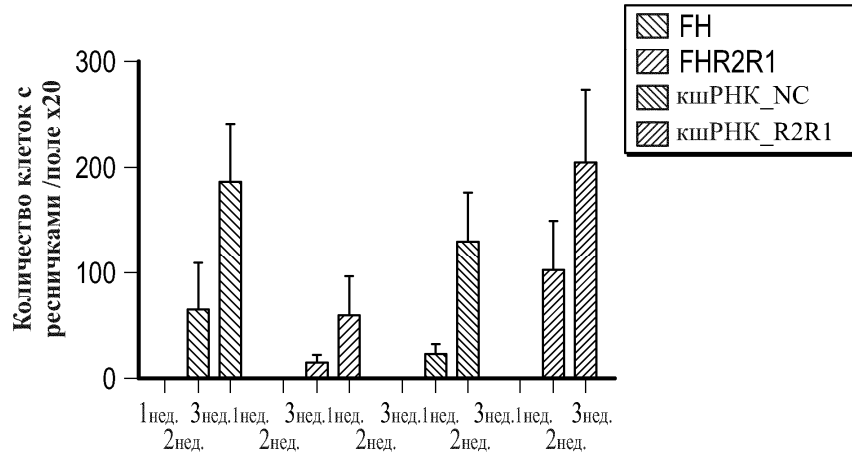


Фиг. 21

Цилиогенез в отсутствие обструктивного поражения легких (Br331)

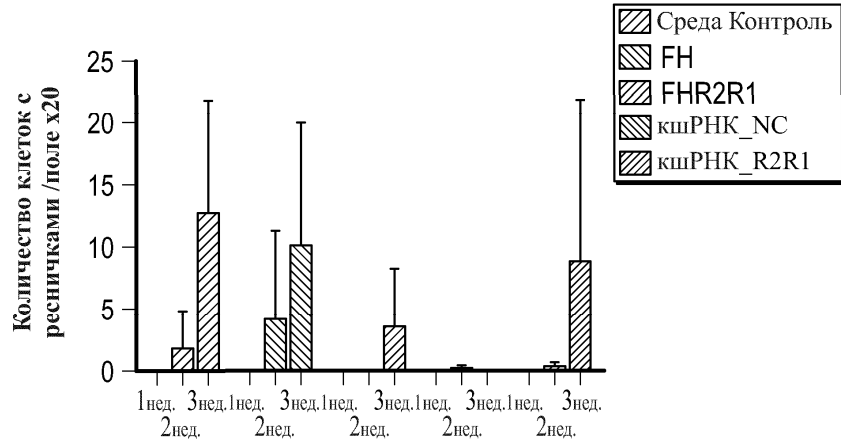


Цилиогенез в отсутствие обструктивного поражения легких (Br331)

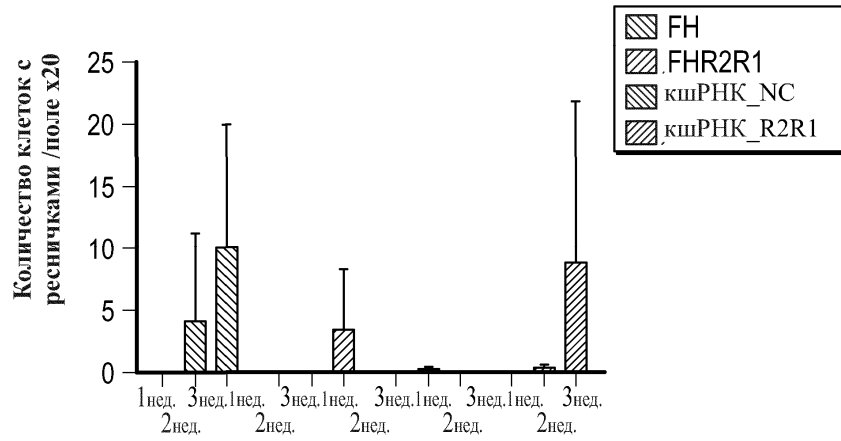


Фиг. 22

**Цилиогенез при хроническом
обструктивном заболевании легких (Br370)**

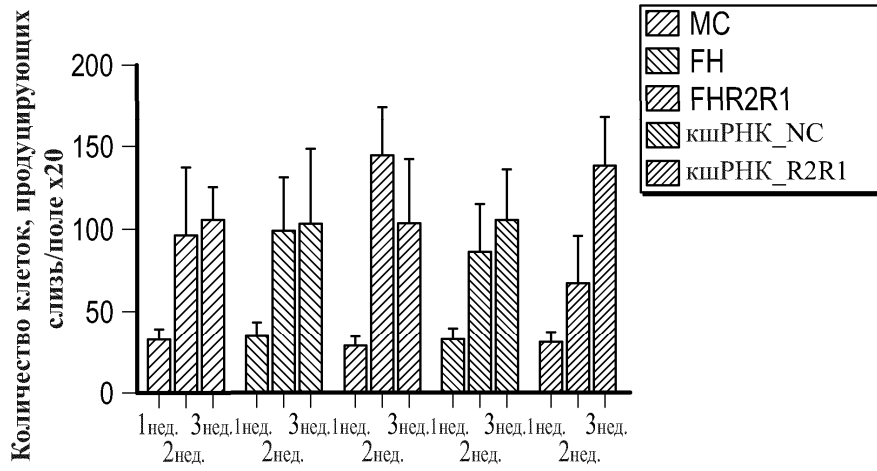


**Цилиогенез при хроническом
обструктивном заболевании легких (Br370)**

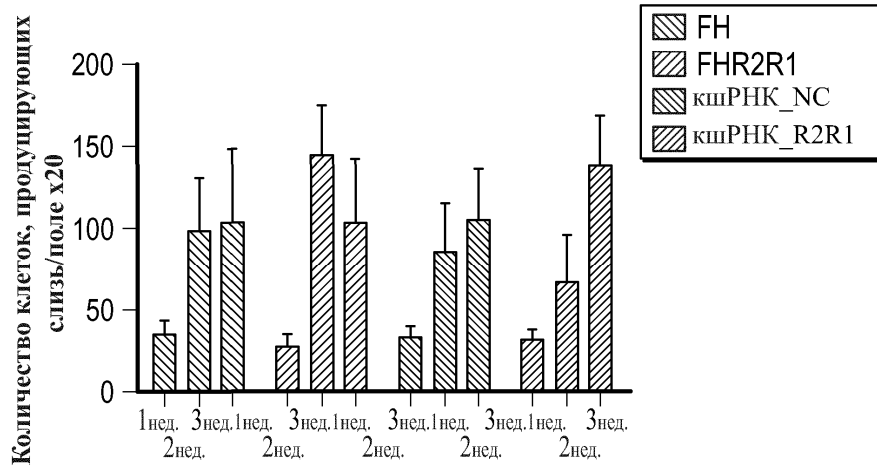


Фиг. 23

Клетки, продуцирующие слизь, в отсутствие обструктивного поражения легких (Br331)

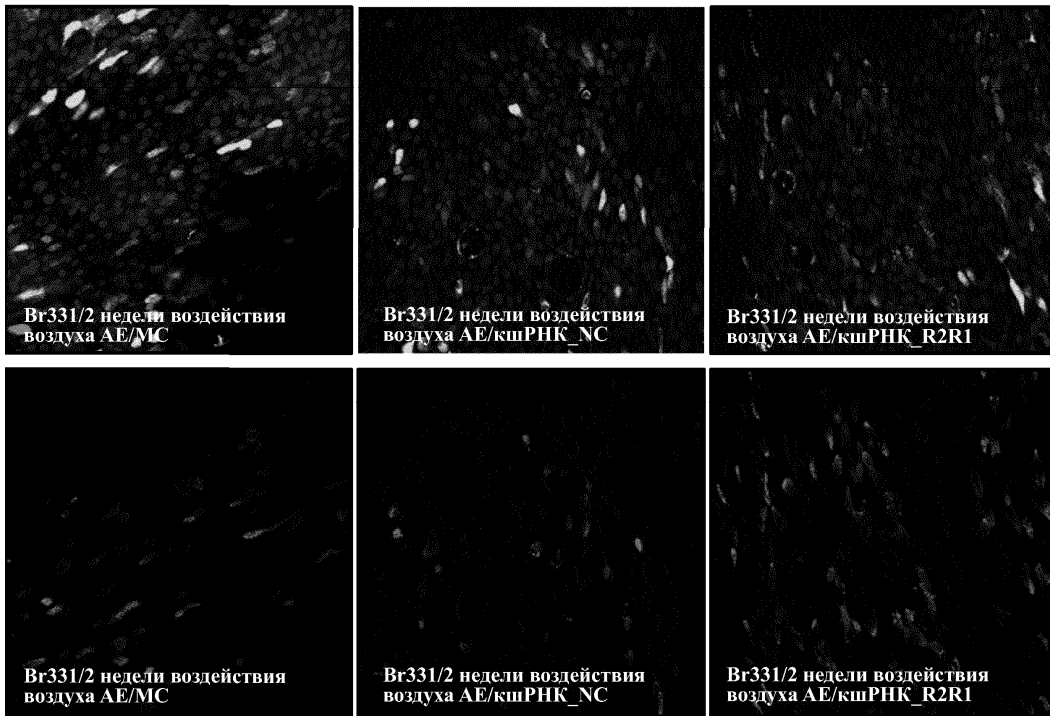


Клетки, продуцирующие слизь, в отсутствие обструктивного поражения легких (Br331)



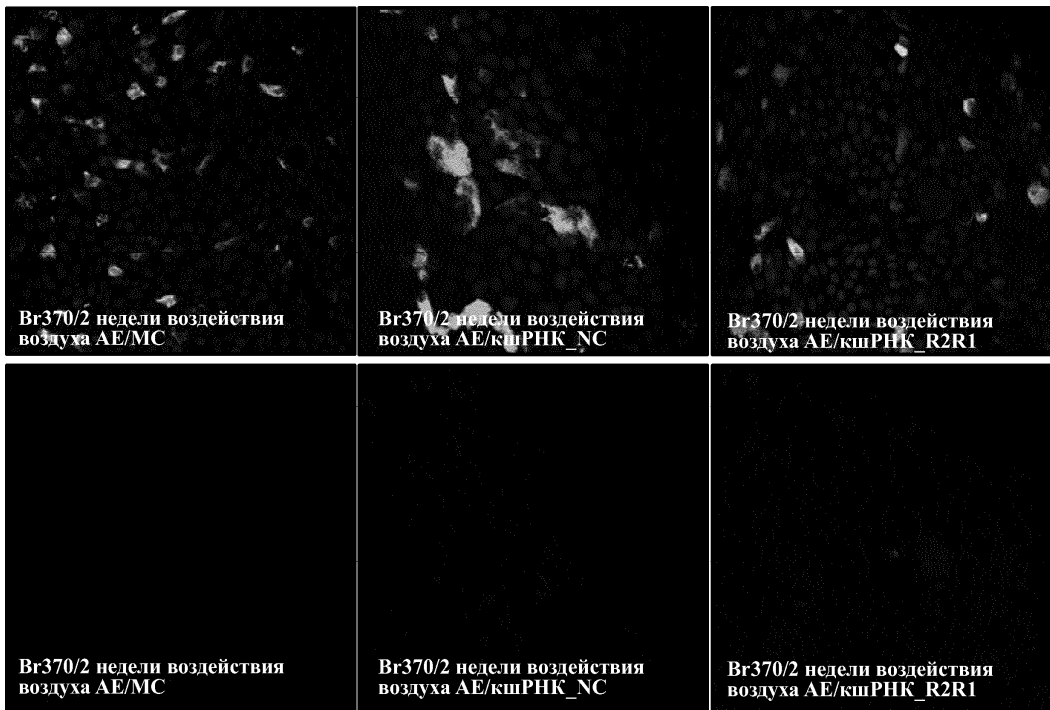
Фиг. 24

Обструктивного поражения легких нет (Br331)/
2 недели воздействия воздуха, кшPHK_NC, кшPHK_R2R1



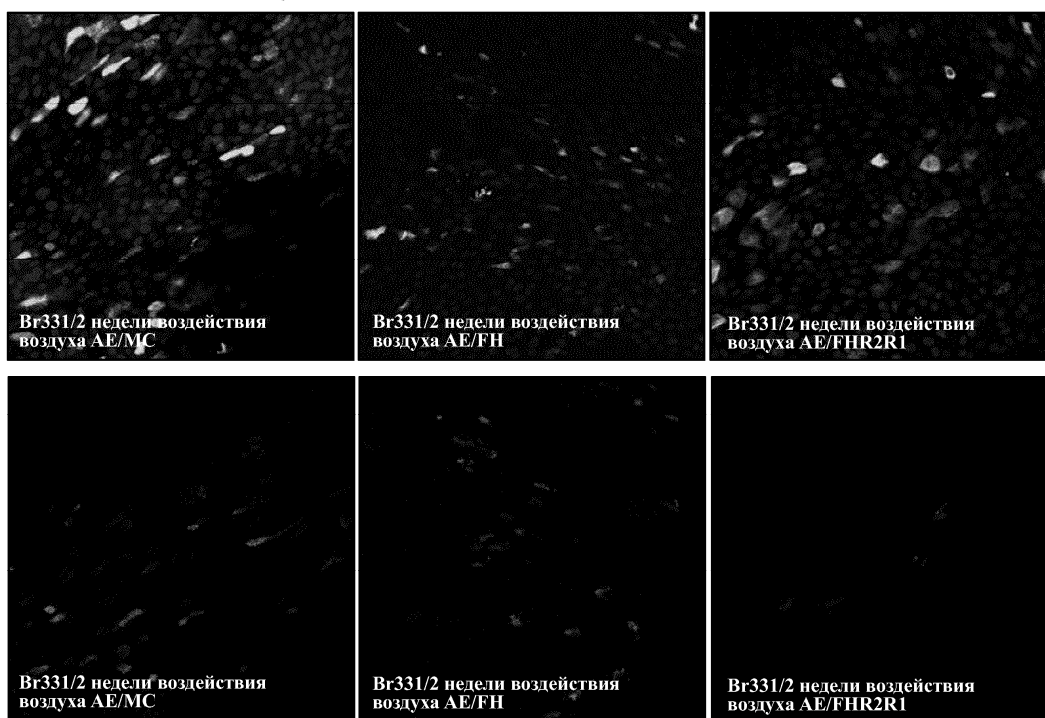
Фиг. 26

Хроническое обструктивное заболевание легких Br370/
2 недели воздействия воздуха, кшPHK_NC, кшPHK_R2R1



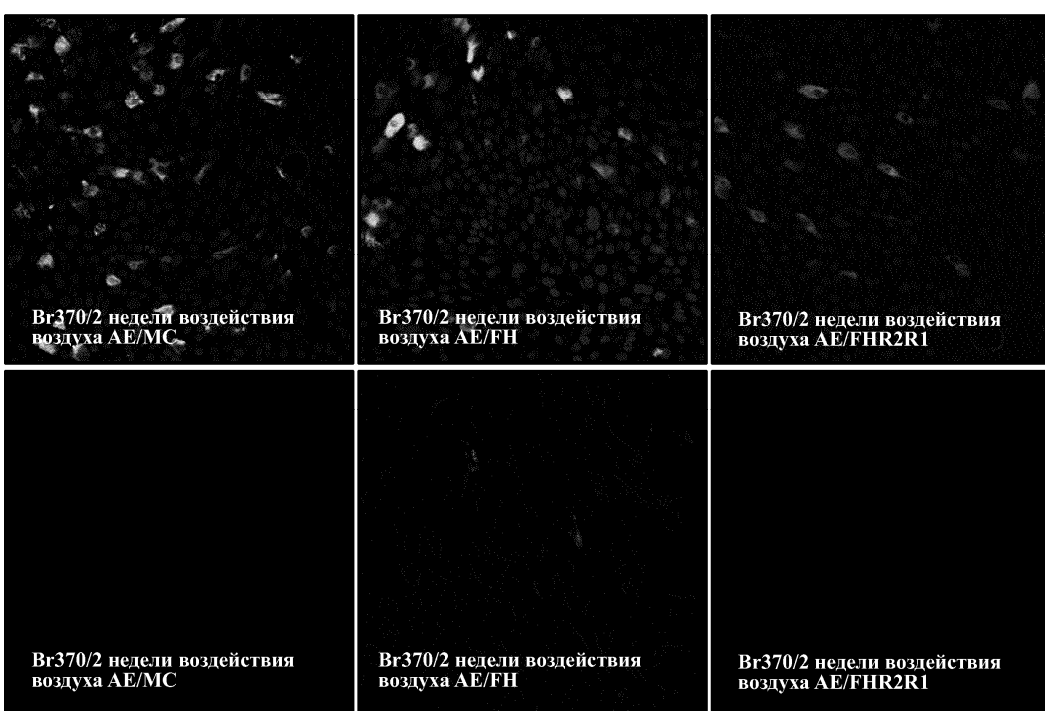
Фиг. 27

Обструктивного поражения легких нет Br331/
2 недели воздействия воздуха, АЕ/МС, FH FHR2R1



Фиг. 28

Хроническое обструктивное заболевание легких Br370/
2 недели воздействия воздуха, АЕ/МС, FH, FHR2R1



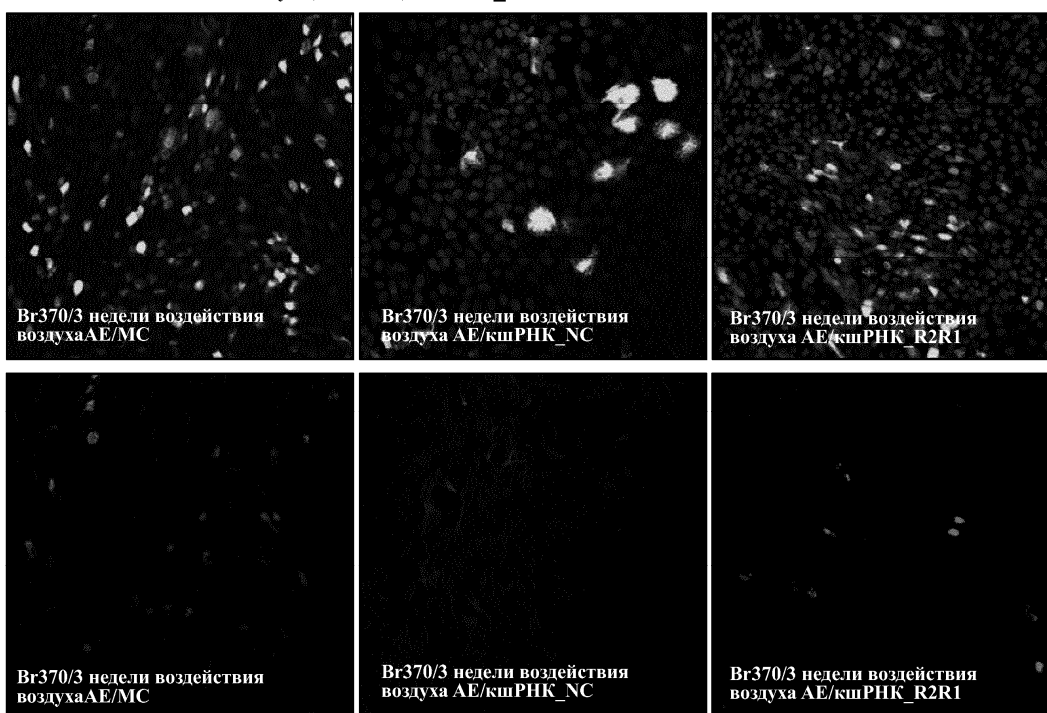
Фиг. 29

Обструктивного поражения легких нет (Br331)/
3 недели воздействия воздуха, АЕ/МС/кшРНК_NC,/кшРНК_R2R1



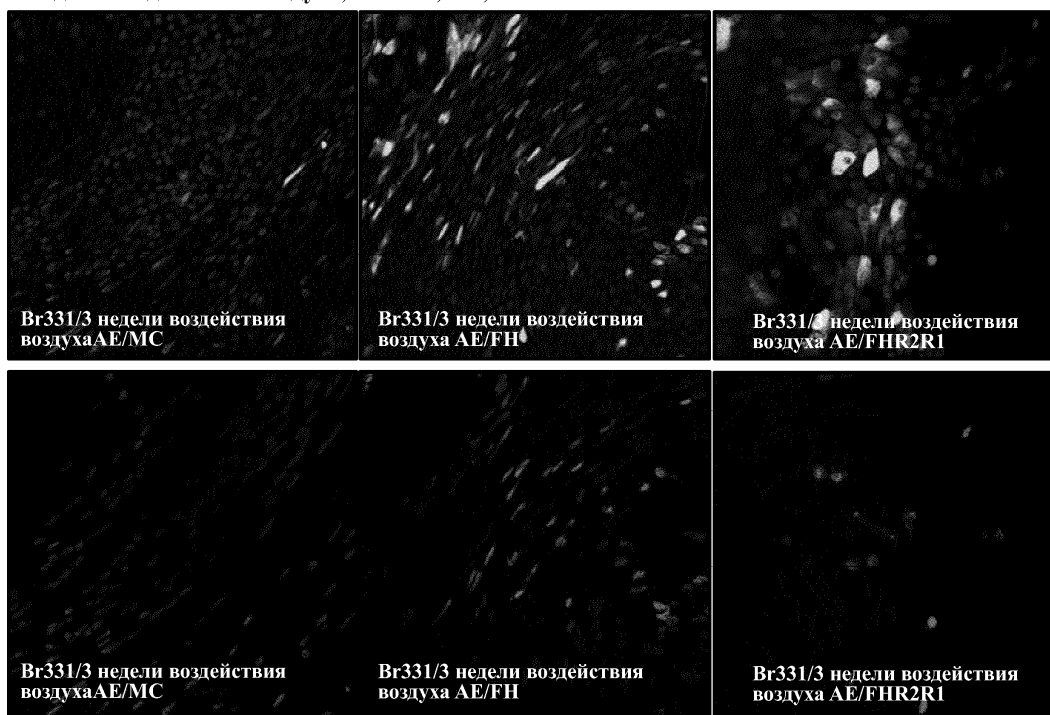
Фиг. 30

Хроническое обструктивное заболевание легких Br370/
3 недели воздействия воздуха, АЕ/МС, кшРНК_NCR2R1



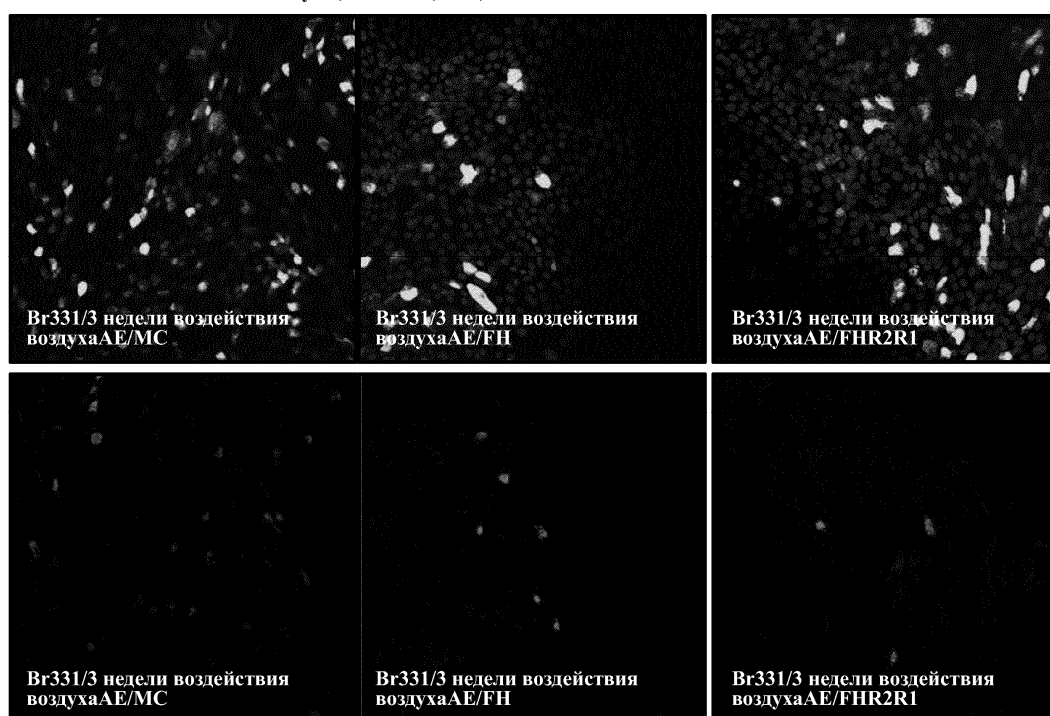
Фиг. 31

Обструктивного поражения легких нет Br331/
3 недели воздействия воздуха, AE/MC, FH, FHR2R1



Фиг. 32

Хроническое обструктивное заболевание легких Br370/
3 недели воздействия воздуха, AE/MC, FH, FHR2R1



Фиг. 33

