

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202392950** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2023.12.21

(51) Int. Cl. *G01N 33/68* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2022.04.22

(54) **СПОСОБЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ ПАРТНЕРОВ ПО СВЯЗЫВАНИЮ ПРОГРАНУЛИНА**

(31) 63/178,831

(72) Изобретатель:

(32) 2021.04.23

Цэн Вэйчжэн, Чан Джозеф,
Бонавентюр Паскаль, Лю Чанлу,
Бредт Дэвид С. (US)

(33) US

(86) PCT/EP2022/060724

(87) WO 2022/223796 2022.10.27

(71) Заявитель:

ЯНССЕН ФАРМАЦЕВТИКА НВ (BE)

(74) Представитель:

Веселицкий М.Б., Кузенкова Н.В.,
Каксис Р.А., Белоусов Ю.В., Куликов
А.В., Кузнецова Е.В., Соколов Р.А.,
Кузнецова Т.В. (RU)

(57) В настоящем документе описаны способы скрининга для идентификации рецепторов клеточной поверхности для програнулина. В настоящем документе также описаны способы скрининга для идентификации внутриклеточных белков, связывающих програнулин.



202392950

A1

A1

202392950

СПОСОБЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ ПАРТНЕРОВ ПО СВЯЗЫВАНИЮ ПРОГРАНУЛИНА

5

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННУЮ ЗАЯВКУ

Настоящая заявка испрашивает преимущество предварительной заявки на патент США № 63/178 831, поданной 23 апреля 2021 г., которая полностью включена в настоящий документ путем ссылки.

10

ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к высокопроизводительным способам скрининга для идентификации партнеров по связыванию програнулина.

ССЫЛКА НА ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ, ПОДАННЫЙ В ЭЛЕКТРОННОМ ВИДЕ

Рассматриваемая в данный момент заявка содержит перечень последовательностей, представленный в электронном виде в формате ASCII и в полном объеме включенный в настоящий документ путем ссылки. Копия указанного перечня в формате ASCII, созданная 28 февраля 2022 г., называется PRD4129WOPCT1_SL.txt и имеет размер 16 384 байта.

20

ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Нейродегенеративные заболевания возникают, когда клетки нервной системы (нейроны) головного и спинного мозга начинают разрушаться. Сегодня 5,4 миллиона американцев страдают от болезни Альцгеймера; 500 000 — от болезни Паркинсона; и 50 000–60 000 — от лобно-височной деменции (FTD). Поскольку нейродегенеративные заболевания поражают преимущественно людей среднего и пожилого возраста, ожидается, что их заболеваемость будет стремительно расти по мере старения населения. К 2030 году каждый пятый американец будет старше 65 лет. Поиск методов лечения нейродегенеративных заболеваний становится все более актуальной задачей.

30

Програнулин (PGRN) представляет собой богатый цистеином секретируемый белок, кодируемый геном GRN и известный своим участием в нейродегенерации и других заболеваниях. Снижение уровней PGRN в головном мозге коррелирует с

семейными формами лобно-височной лобарной дегенерации (FTLD). Несмотря на сильную корреляцию, биологический механизм, вызывающий нейродегенерацию, остается неясным. Хотя были предложены рецепторы клеточной поверхности, которые связываются с PGRN, связь между этими рецепторами и нейродегенерацией остается
5 неясной, что позволяет предположить, что могут быть задействованы и другие партнеры по связыванию. Существует потребность в способах идентификации этих партнеров по взаимодействию высокопроизводительным и объективным способом.

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

10 В настоящем документе предложен способ высокопроизводительного скрининга для идентификации трансмембранных белков, связывающих програнулин (PGRN), включающий: а) обеспечение набора кДНК, содержащего множество экспрессионных векторов, причем каждый экспрессионный вектор кодирует отдельный трансмембранный белок; б) обеспечение планшета, содержащего множество лунок,
15 причем каждая из одной или более его лунок содержит клетки-хозяева; в) введение в каждую из одной или более лунок отдельного экспрессионного вектора из указанного набора и таким образом получение отдельных трансфицированных клеток в каждой лунке; д) культивирование трансфицированных клеток в условиях, обеспечивающих экспрессию отдельного трансмембранного белка в каждой лунке; е) приведение в
20 контакт трансфицированных клеток в каждой из одной или более лунок с целевым белком, содержащим PGRN, присоединенным к обнаруживаемой метке; ф) фиксацию трансфицированных клеток фиксирующим агентом после контакта с целевым белком; г) промывку фиксированных клеток; и) определение, после промывки фиксированных клеток, присутствия обнаруживаемой метки в каждой из одной или более лунок,
25 причем при определении присутствия обнаруживаемой метки в лунке трансмембранный белок, экспрессируемый трансфицированными клетками в лунке, идентифицируют как трансмембранный белок, связывающий PGRN.

В одном варианте осуществления способа высокопроизводительного скрининга клетки-хозяева выбраны из группы, состоящей из клетки почки эмбриона человека
30 293Т (HEK293Т), клеток HEK293F, клеток HeLa, клеток яичника китайского хомяка (CHO), клеток NIH 3T3, клеток MCF-7, клеток Нер G2, клеток почки детеныша хомяка (ВНК), клеток BV-2 (мышь, C57BL/6, головного мозга, микроглии), клеток Neuro-2a (N2a) и клеток Cos7.

В дополнительном варианте осуществления высокопроизводительного скрининга фиксирующий агент выбран из глутаральдегида, метанола и параформальдегида.

5 В еще одном варианте осуществления способа высокопроизводительного скрининга обнаруживаемая метка выбрана из группы, состоящей из зеленого флуоресцентного белка (GFP), мус, мус-пируваткиназы (мус-ПК), His6, мальтозосвязывающего белка (MBP), метки гемагглютинина (HA) вируса гриппа человека, FLAG-метки (FLAG) и метки глутатион-S-трансферазы (GST).

10 В еще одном варианте осуществления способа высокопроизводительного скрининга целевой белок представляет собой FLAG-меченный PGRN. В одном аспекте стадия h) включает в себя h1) добавление антитела к FLAG, которое ковалентно присоединено к флуоресцентному красителю, в лунки, содержащие трансфицированные клетки, для иммунного окрашивания FLAG-меченного PGRN, если он присутствует, и h2) обнаружение флуоресцентного красителя с помощью флуорометра или устройства для визуализации высокопроизводительным способом. В 15 другом аспекте флуоресцентный краситель представляет собой цианиновый краситель.

В еще одном варианте осуществления способа высокопроизводительного скрининга целевой белок представляет собой HA-меченный PGRN. В одном аспекте стадия h) включает в себя h1) воздействие на клетки антителом к HA, которое 20 ковалентно присоединено к флуоресцентному красителю, для иммунного окрашивания HA-меченного PGRN, если он присутствует, и h2) обнаружение флуоресцентного красителя с помощью флуорометра или устройства для визуализации. В другом аспекте флуоресцентный краситель представляет собой Dylight 650.

В еще одном варианте осуществления способа высокопроизводительного скрининга между стадиями g) и h) способ дополнительно включает в себя 25 пермеабиллизацию фиксированных клеток с помощью агента для пермеабиллизации и промывку пермеабиллизированных клеток.

В еще одном варианте осуществления способа высокопроизводительного скрининга агент для пермеабиллизации выбран из группы, состоящей из сапонаина, 30 тритона X-100, лизолецитина, n-октил-β-D-глюкопиранозида и твина 20.

В настоящем документе дополнительно предложен способ идентификации внутриклеточных белков, которые связывают PGRN, включающий: а) введение в клетки-хозяева экспрессионного вектора, кодирующего гетерологичный белок, с получением таким образом трансфицированных клеток; б) культивирование

трансфицированных клеток в условиях, обеспечивающих экспрессию гетерологичного белка; с) пермеабиллизацию трансфицированных клеток агентом для пермеабиллизации; d) приведение пермеабиллизированных клеток в контакт с целевым белком, содержащим PGRN, присоединенным к обнаруживаемой метке; e) фиксацию трансфицированных клеток фиксирующим агентом после контакта с целевым белком; f) промывку фиксированных клеток; и g) определение, после промывки фиксированных клеток, присутствия обнаруживаемой метки на промытых клетках, причем при определении присутствия обнаруживаемой метки гетерологичный белок, экспрессируемый клетками, идентифицируют как внутриклеточный белок, связывающий PGRN.

10 В одном варианте осуществления способа клетки-хозяева выбраны из группы, состоящей из клетки почки эмбриона человека 293Т (НЕК293Т), клеток НЕК293F, клеток HeLa, клеток яичника китайского хомяка (СНО), клеток НИН 3Т3, клеток МСF-7, клеток Нер G2, клеток почки детеныша хомяка (ВНК), клеток BV-2 (мышь, C57BL/6, головного мозга, микроглии), клеток Neuro-2a (N2a) и клеток Cos7.

15 В дополнительном варианте осуществления способа обнаруживаемая метка выбрана из группы, состоящей из зеленого флуоресцентного белка (GFP), мус, мус-пируваткиназы (мус-ПК), His6, мальтозосвязывающего белка (MBP), метки гемагглютинина (НА) гриппа человека, FLAG-метки (FLAG) и метки глутатион-S-трансферазы (GST).

20 В еще одном варианте осуществления способа целевой белок представляет собой FLAG-меченный PGRN. В одном аспекте стадия g) включает в себя g1) воздействие на клетки антителом к FLAG, которое ковалентно присоединено к флуоресцентному красителю, для иммунного окрашивания FLAG-меченного PGRN, если он присутствует, и g2) обнаружение флуоресцентного красителя с помощью флуорометра или устройства для визуализации. В другом аспекте флуоресцентный краситель представляет собой цианиновый краситель.

30 В еще одном варианте осуществления способа высокопроизводительного скрининга целевой белок представляет собой НА-меченный PGRN. В одном аспекте стадия g) включает в себя g1) воздействие на клетки антителом к НА, которое ковалентно присоединено к флуоресцентному красителю, для иммунного окрашивания НА-меченного PGRN, если он присутствует, и g2) обнаружение флуоресцентного красителя с помощью флуорометра или устройства для визуализации. В другом аспекте флуоресцентный краситель представляет собой Dylight 650.

В еще одном варианте осуществления способа между стадиями b) и c) способ дополнительно включает в себя фиксацию культивируемых клеток фиксирующим агентом и промывку фиксированных клеток.

5 В еще одном варианте осуществления способа фиксирующий агент выбран из глутаральдегида, метанола и параформальдегида.

В еще одном варианте осуществления способа между стадиями f) и g) способ дополнительно включает в себя пермеабиллизацию фиксированных клеток с помощью агента для пермеабиллизации и промывку пермеабиллизированных клеток.

10 В еще одном варианте осуществления способа агент для пермеабиллизации выбран из группы, состоящей из сапонины, тритона X-100, лизолецитина, n-октил-β-D-глюкопиранозиды и твина 20.

В настоящем документе дополнительно предложен способ высокопроизводительного скрининга для идентификации внутриклеточных белков, которые связывают PGRN, включающий: а) обеспечение набора кДНК, содержащего
15 множество экспрессионных векторов, причем каждый экспрессионный вектор кодирует отдельный гетерологичный белок; б) обеспечение планшета, содержащего множество лунок, причем каждая из одной или более его лунок содержит клетки-хозяева; в) введение в каждую из одной или более лунок отдельного экспрессионного вектора из указанного набора и таким образом получение отдельных трансфицированных клеток в
20 каждой лунке; г) культивирование трансфицированных клеток в условиях, обеспечивающих экспрессию отдельного гетерологичного белка в каждой лунке; д) пермеабиллизацию трансфицированных клеток агентом для пермеабиллизации; е) приведение в контакт пермеабиллизированных клеток в каждой из одной или более лунок с целевым белком, содержащим PGRN, присоединенным к обнаруживаемой
25 метке; ж) фиксацию трансфицированных клеток фиксирующим агентом после контакта с целевым белком; з) промывку фиксированных клеток; и) определение, после промывки фиксированных клеток, присутствия обнаруживаемой метки в каждой из одной или более лунок, причем при определении присутствия обнаруживаемой метки в лунке гетерологичный белок, экспрессируемый трансфицированными клетками в лунке,
30 идентифицируют как внутриклеточный белок, связывающий PGRN.

В одном варианте осуществления способа высокопроизводительного скрининга клетки-хозяева выбраны из группы, состоящей из клетки почки эмбриона человека 293Т (HEK293Т), клеток HEK293F, клеток HeLa, клеток яичника китайского хомяка (CHO), клеток NIH 3T3, клеток MCF-7, клеток Hep G2, клеток почки детеныша хомяка

(ВНК), клеток BV-2 (мышь, C57BL/6, головного мозга, микроглии), клеток Neuro-2a (N2a) и клеток Cos7.

В дополнительном варианте осуществления способа высокопроизводительного скрининга обнаруживаемая метка выбрана из группы, состоящей из зеленого
5 флуоресцентного белка (GFP), мус, мус-пируваткиназы (мус-ПК), His6, мальтозосвязывающего белка (MBP), метки гемагглютинина (HA) гриппа человека, FLAG-метки (FLAG) и метки глутатион-S-трансферазы (GST).

В еще одном варианте осуществления способа высокопроизводительного скрининга целевой белок представляет собой FLAG-меченный PGRN. В одном аспекте
10 стадия i) включает в себя i1) добавление антитела к FLAG, которое ковалентно присоединено к флуоресцентному красителю, в лунки, содержащие трансфицированные клетки, для иммунного окрашивания FLAG-меченного PGRN, если он присутствует, и i2) обнаружение флуоресцентного красителя с помощью флуорометра или устройства для визуализации высокопроизводительным способом. В
15 другом аспекте флуоресцентный краситель представляет собой цианиновый краситель.

В еще одном варианте осуществления способа высокопроизводительного скрининга целевой белок представляет собой HA-меченный PGRN. В одном аспекте
стадия i) включает в себя i1) воздействие на клетки антителом к HA, которое ковалентно присоединено к флуоресцентному красителю, для иммунного окрашивания
20 HA-меченного PGRN, если он присутствует, и i2) обнаружение флуоресцентного красителя с помощью флуорометра или устройства для визуализации. В другом аспекте флуоресцентный краситель представляет собой Dylight 650.

В еще одном варианте осуществления способа высокопроизводительного скрининга между стадиями d) и e) способ дополнительно включает в себя фиксацию
25 культивируемых клеток фиксирующим агентом и промывку фиксированных клеток.

В еще одном варианте осуществления способа высокопроизводительного скрининга фиксирующий агент выбран из глутаральдегида, метанола и параформальдегида.

В еще одном варианте осуществления способа высокопроизводительного скрининга между стадиями h) и i) способ дополнительно включает в себя
30 пермеабиллизацию фиксированных клеток с помощью агента для пермеабиллизации и промывку пермеабиллизированных клеток.

В еще одном варианте осуществления способа высокопроизводительного скрининга агент для пермеабилзации выбран из группы, состоящей из сапонина, тритона X-100, лизолецитина, n-октил-β-D-глюкопиранозида и твина 20.

5 **КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ**

На Фиг. 1 представлена схема, изображающая стратегию скрининга для обнаружения внутриклеточных белков, связывающих PGRN.

10 На Фиг. 2 показана интенсивность Су3 клеток, трансфицированных вектором рсDNA3 (отрицательный контроль), клеток, трансфицированных экспрессионным вектором, несущим кодирующую последовательность сортина (положительный контроль), и клеток, трансфицированных экспрессионной плазмидой, несущей кодирующую последовательность попадающего внутриклеточного белка.

15 На Фиг. 3А и 3В показана интенсивность Су3 или интенсивность Dylight 650 трансфицированных клеток (отрицательный контроль, положительный контроль и Hit #1), которые были подвергнуты воздействию FLAG-меченого PGRN или НА-меченого PGRN с последующим иммунным окрашиванием антителом к Flag M2-Су3 или антителом к НА Dylight 650 соответственно. На Фиг. 3Б показаны сигнал Су3 и сигнал Dylight 650 для клеток, трансфицированных плазмидой Hit #1, но не подвергнутых воздействию меченого PGRN перед иммунным окрашиванием.

20 На Фиг. 4 показаны интенсивность Су3 или интенсивность Dylight 650 трансфицированных клеток (отрицательный контроль, положительный контроль и Hit #1), которые не были пермеабиллизированы до воздействия на них FLAG-меченого PGRN или НА-меченого PGRN и иммунного окрашивания.

25 **ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

В разделе «Предпосылки создания изобретения» и в тексте настоящей заявки приведены цитаты или описания различных публикаций, статей и патентов; каждая из этих ссылок полностью включена в настоящее описание путем ссылки. Описание документов, актов, материалов, устройств, изделий и т. п., которые были включены в настоящее
30 описание, приведено в качестве контекста для изобретения. Такое описание не является допущением того, что любой из таких источников или все такие источники являются частью предшествующего уровня техники в отношении каких-либо описываемых или заявленных изобретений.

Если не указано иное, все технические и научные термины в настоящем документе имеют общепринятое значение, понятное любому специалисту в области, к которой относится данное изобретение. В ином случае определенные термины в настоящем документе имеют значения, установленные в описании.

5 Необходимо отметить, что в настоящем документе и в приложенной формуле изобретения форма единственного числа включает в себя объекты и во множественном числе, если из контекста явно не следует иное.

10 Если не указано иное, любые числовые значения, такие как концентрация или диапазон концентраций, описанные в настоящем документе, следует понимать как модифицированные во всех случаях термином «около». Таким образом, числовое значение, как правило, включает в себя $\pm 10\%$ от указанного значения. Например, концентрация 1 мг/мл включает от 0,9 мг/мл до 1,1 мг/мл. Аналогичным образом диапазон концентраций от 1% до 10% (масс./об.) включает в себя от 0,9% (масс./об.) до 11% (масс./об.). В настоящем документе применение числового диапазона явным
15 образом включает все возможные поддиапазоны, все отдельные числовые значения в пределах этого диапазона, включая целые числа в пределах таких диапазонов и дробные значения, если из контекста явно не следует иное.

 Если не указано иное, термин «по меньшей мере», предшествующий ряду элементов, следует понимать как относящийся к каждому элементу в этом ряду.
20 Специалисты в данной области смогут определять или с помощью лишь стандартных экспериментов смогут устанавливать множество эквивалентов конкретных вариантов осуществления изобретения, описанного в настоящем документе. Подразумевается, что такие эквиваленты включены в изобретение.

 В настоящем документе термины «содержит», «содержащий», «включает»,
25 «включающий», «имеет», «имеющий», «содержит» или «содержащий» или любая другая их вариация подразумевают включение указанного целого числа или группы целых чисел, но не исключение из него какого-либо другого целого числа или группы целых чисел, и они являются неисключающими или неограничивающими. Например, композиция, смесь, процесс, способ, изделие или устройство, которое содержит
30 перечень элементов, не обязательно ограничивается только этими элементами, но может включать другие элементы, не перечисленные прямо или присущие такой композиции, смеси, процессу, способу, изделию или устройству. Кроме того, если в явной форме не указано иное, союз «или» относится к включающему «или», а не к исключаящему «или». Например, условие А или В удовлетворяется любым из

следующих условий: А истинно (или присутствует), и В ложно (или отсутствует), А ложно (или отсутствует), и В истинно (или присутствует), и оба А и В являются истинными (или присутствуют).

5 В настоящем документе соединительный термин «и/или» между множеством перечисляемых элементов следует понимать как включающий в себя как отдельные, так и комбинированные варианты. Например, если два элемента соединены «и/или», первый вариант относится к возможности применения первого элемента без второго. Второй вариант относится к возможности применения второго элемента без первого. Третий вариант относится к возможности одновременного применения первого и
10 второго элементов. Подразумевается, что любой из этих вариантов соответствует значению и, соответственно, удовлетворяет требованию термина «и/или» в контексте настоящего документа. Кроме того, подразумевается, что одновременное применение более одного из этих вариантов соответствует значению и, соответственно, удовлетворяет требованию термина «и/или».

15 В настоящем документе термин «состоять из» или его варианты, такие как «состоит из» или «состоящий из», используемые в описании и формуле изобретения, указывают на включение любого указанного целого числа или группы целых чисел, но при этом никакое дополнительное целое число или группа целых чисел не могут быть добавлены к указанному способу, структуре или композиции.

20 В контексте настоящего документа термин «состоять по существу из» или варианты, такие как «состоит по существу из» или «состоящий по существу из», используемые в описании и формуле изобретения, указывают на включение любого указанного целого числа или группы целых чисел, а также на необязательное включение любого перечисленного целого числа или группы целых чисел, которые
25 существенно не изменяют основные или новые свойства указанного способа, структуры или композиции. См. М.Р.Е.Р. § 2 111.03.

Следует также понимать, что термины «около», «приблизительно», «по существу», «главным образом» и подобные термины, используемые в настоящем документе при упоминании размера или характеристики компонента
30 предпочтительного изобретения, указывают на то, что описанный размер/характеристика не является строгой границей или параметром и не исключает незначительных отклонений от них, которые функционально одинаковы или аналогичны, как будет понятно обычному специалисту в данной области. Как минимум такие ссылки, которые включают числовой параметр, будут включать отклонения,

которые при использовании математических и промышленных принципов, принятых в данной области (например, округление, измерение или другие систематические ошибки, производственные допуски и т. д.), не изменяют наименьшую значащую цифру.

В настоящем документе термин «полинуклеотид», который является синонимом термина «молекула нуклеиновой кислоты», «нуклеотиды» или «нуклеиновые кислоты», 5 относится к любому полирибонуклеотиду или полидезоксирибонуклеотиду, который может представлять собой немодифицированную РНК или ДНК или модифицированную РНК или ДНК. «Полинуклеотиды» включают, без ограничений, одно- и двухцепочечные ДНК, ДНК, которые представляют собой смесь одно- и 10 двухцепочечных областей, одно- и двухцепочечные РНК, РНК, которые представляют собой смесь одно- и двухцепочечных областей, слитые молекулы, содержащие ДНК и РНК, которые могут быть одноцепочечными или, как правило, двухцепочечными или представлять собой смесь одно- и двухцепочечных областей. Кроме того, «полинуклеотидом» называют трехцепочечные области, содержащие РНК или ДНК, 15 или как РНК, так и ДНК. Термин «полинуклеотид» также включает ДНК или РНК, содержащую одно или более модифицированных оснований, и ДНК или РНК с основными цепями, модифицированными для стабильности или для других целей. «Модифицированные» основания включают, например, тритилированные основания и нетипичные основания, такие как инозин. В ДНК и РНК могут быть внесены различные 20 модификации; следовательно, термин «полинуклеотид» охватывает химически, ферментативно или метаболически модифицированные формы полинуклеотидов, как правило, встречающиеся в природе, а также химические формы ДНК и РНК, характерные для вирусов и клеток. Термин «полинуклеотид» также охватывает относительно короткие цепи нуклеиновых кислот, часто называемые 25 олигонуклеотидами.

В настоящем документе термины «пептид», «полипептид» или «белок» могут относиться к молекуле, образованной из аминокислот, и могут быть признаны специалистами в данной области как белок. В настоящем документе используется 30 обычный однобуквенный или трехбуквенный код для аминокислотных остатков. Термины «пептид», «полипептид» и «белок» могут применяться взаимозаменяемо и относятся к полимерам аминокислот любой длины. Полимер может быть линейным или разветвленным, он может содержать модифицированные аминокислоты и неаминокислотные перемычки. Термины также охватывают аминокислотный полимер, который был модифицирован естественным образом или посредством вмешательства;

например, это может быть образование дисульфидной связи, гликозилирование, липидизация, ацетилирование, фосфорилирование или любая другая манипуляция или модификация, такая как конъюгация с маркирующим компонентом. Определение также включает в себя, например, полипептиды, содержащие один или более аналогов

5 аминокислот (включая, например, неприродные аминокислоты и т. п.), а также другие модификации, известные в данной области.

Пептидные последовательности, описанные в настоящем документе, написаны в соответствии с обычной процедурой, где N-концевая область пептида находится слева, а C-концевая область расположена справа. Хотя известны изомерные формы

10 аминокислот, они представляют собой L-форму представленной аминокислоты, если явным образом не указано иное.

Идентификация трансмембранных белков, связывающих PGRN

В одном аспекте описанное в настоящем документе изобретение представляет собой способы скрининга трансмембранных белков, которые связываются с

15 програнулином (PGRN) высокопроизводительным (HTP) способом.

В частности, в способах скрининга применяют целевой белок, состоящий из PGRN, слитого с обнаруживаемой меткой, библиотекой или набором кДНК и клетками-хозяевами.

PGRN представляет собой богатый цистеином секретлируемый белок, кодируемый геном GRN (номер доступа к NCBI NM_002087.3). При образовании

20 целевого белка PGRN сливается с пептидом с обнаруживаемой меткой. Такие пептиды с метками хорошо известны в данной области и включают в себя, без ограничений, зеленый флуоресцентный белок (GFP), мус, мус-пируваткиназу (мус-ПК), полигистидиновую (His6) метку, мальтозосвязывающий белок (MBP), метку

25 гемагглютиниона (HA) вируса гриппа человека (YPYDVPDYA, SEQ ID NO: 1), FLAG-метку (FLAG) (DYKDDDDK, SEQ ID NO: 2) и метку глутатион-S-трансферазы (GST). Однако изобретение никоим образом не должно толковаться как ограниченное вышеуказанными метками. Скорее, любой пептид или полипептид, который может

30 функционировать по существу аналогично этим меткам, следует рассматривать как включенный в настоящее изобретение.

Библиотека кДНК содержит множество экспрессионных векторов, каждый из которых кодирует отдельный трансмембранный белок. В одном варианте осуществления каждый из экспрессионных векторов кодирует трансмембранный белок

человека. Термин «вектор» относится к молекуле нуклеиновой кислоты, способной транспортировать другую нуклеиновую кислоту, с которой она связана. Один тип вектора представляет собой «плазмиду», которая относится к кольцевой петле двухцепочечной ДНК, в которую могут быть вставлены дополнительные сегменты ДНК. Другой тип вектора представляет собой вирусный вектор, в который могут быть вставлены дополнительные сегменты ДНК. Экспрессионные векторы представляют собой векторы, способные направлять экспрессию генов, с которыми они функционально связаны. В контексте настоящего документа экспрессионные векторы содержат нуклеиновую кислоту, кодирующую белковую последовательность, в форме, приемлемой для экспрессии нуклеиновой кислоты в клетке-хозяине. Таким образом, экспрессионные векторы могут содержать одну или более регуляторных последовательностей, таких как промотор, выбранных на основе клеток-хозяев, которые будут использоваться для экспрессии, функционально связанных с последовательностью нуклеиновой кислоты, подлежащей экспрессии. При использовании со ссылкой на экспрессионный вектор термин «функционально связанный» означает, что представляющая интерес нуклеотидная последовательность связана с регуляторной последовательностью (последовательностями) таким образом, который обеспечивает экспрессию нуклеотидной последовательности (например, в системе транскрипции/трансляции *in vitro* или в клетке-хозяине при введении вектора в клетку-хозяина). Специалистам в данной области будет понятно, что конструкция экспрессионного вектора может зависеть от таких факторов, как выбор трансформируемой клетки-хозяина, требуемый уровень экспрессии белка, а также предполагаемое использование вектора. Иллюстративные библиотеки кДНК, приемлемые в настоящем документе, могут включать в себя, без ограничений, клоны ORF Ultimate® от ThermoFisher, наборы клонов кДНК человека для исследования путей или скрининга НТР от OriGene и т. д.

В настоящем документе могут быть использованы любые приемлемые клетки-хозяева. В одном варианте осуществления клетки-хозяева в контексте настоящего документа представляют собой клетки млекопитающих. Приемлемые клетки млекопитающих могут быть выбраны из клетки почки эмбриона человека 293Т (НЕК293Т), клеток НЕК293F, клеток HeLa, клеток яичника китайского хомяка (СНО), клеток NIH 3Т3, клеток MCF-7, клеток Нер G2, клеток почки детеныша хомяка (ВНК), клеток BV-2 (мыши, C57BL/6, головного мозга, микроглии), клеток Neuro-2a (N2a) и клеток Cos7.

В способе высокопроизводительного скрининга для идентификации трансмембранных белков, связывающих програнулин (PGRN), используют многолуночные планшеты, такие как 96-луночные, 384-луночные или 1536-луночные планшеты, в которых клетки-хозяева в культуральной среде помещают в по меньшей мере одну лунку планшета. Высокопроизводительным способом экспрессионные векторы из библиотеки кДНК вводят в каждую из лунок, содержащих клетки-хозяева, и многолуночный планшет поддерживают в приемлемых условиях культивирования, чтобы обеспечить трансфекцию и экспрессию трансмембранных белков, кодируемых экспрессионными векторами. Культуральные среды в контексте настоящего документа не имеют конкретных ограничений. Иллюстративные культуральные среды включают в себя, без ограничений, среду Игла, модифицированную по Дульбекко (DMEM), среду 1640 Онкологического института имени Розуэлла Парка (RPMI 1640), питательную смесь Хэма F-12 (F-12), среду Игла, модифицированную по Дульбекко: питательную смесь F-12 (DMEM/F-12) и минимально поддерживающую среду (MEM). Приемлемые условия культивирования могут составлять 5% CO₂ при температуре около 30–37°C в течение 1–3 суток.

После удаления культуральной среды высокопроизводительным способом целевой белок (т. е. PGRN, слитый с обнаруживаемой меткой) распределяют в каждую из лунок, содержащих трансфицированные клетки-хозяева, и многолуночный планшет поддерживают в приемлемых условиях, чтобы обеспечить потенциальную связь между трансмембранными белками и целевым белком. В одном варианте осуществления трансфицированные клетки поддерживают в контакте с целевым белком при температуре около 20–37°C в течение 1–3 часов. Затем в каждую лунку многолуночного планшета добавляют фиксирующий агент для фиксации трансфицированных клеток с последующей промывкой промывочным буфером для удаления несвязавшегося целевого белка. Примеры приемлемых фиксирующих агентов включают в себя глутаральдегид, метанол и параформальдегид. Диапазон концентраций этих фиксаторов обычно составляет от 0,01 до 8% для параформальдегида и от 0,001 до 2% для глутаральдегида. Также можно применять комбинации этих двух реагентов. Предпочтительные концентрации параформальдегида составляют от 0,1 до 6%, наиболее предпочтительные концентрации составляют от 1 до 5%. Предпочтительные концентрации глутаральдегида составляют от 0,01 до 1%, наиболее предпочтительные концентрации составляют от 0,05 до 0,5%. Конкретные концентрации фиксаторов подбирают для оптимальной фиксации определенного типа

клеток. Примеры приемлемого промывочного буфера включают в себя сбалансированный солевой раствор HEPES (HBSS), фосфатно-буферный солевой раствор (PBS), трис-буферизированный солевой раствор (TBS) и т. д.

И наконец, планшеты подвергают скринингу на присутствие обнаруживаемой метки в каждой лунке, причем при определении присутствия обнаруживаемой метки в лунке трансмембранный белок, экспрессируемый трансфицированными клетками, содержащимися в лунке, идентифицируют как трансмембранный белок, связывающий PGRN. Предпочтительно скрининг обнаруживаемой метки представляет собой автоматизированный процесс.

Необязательно перед окончательным скринингом обнаруживаемой метки клетки в каждой лунке пермеабилзируют агентом для пермеабиллизации с последующей промывкой промывочным буфером. Агенты для пермеабиллизации обычно представляют собой детергенты или соединения, подобные детергентам, и могут включать в себя, без ограничений, сапонин, тритон X-100, лизолецитин, н-октил-β-D-глюкопиранозид и твин 20.

Начиная с помещения клеток-хозяев в одну или более лунок и до скрининга на присутствие обнаруживаемой метки каждую стадию процесса можно выполнять высокопроизводительным способом, например, с помощью роботизированной руки.

В одном варианте осуществления обнаруживаемая метка представляет собой FLAG-метку, а целевой белок представляет собой N-концевой FLAG-меченный PGRN. Окончательный скрининг включает в себя добавление антитела к FLAG, ковалентно присоединенного к флуоресцентному красителю (такому как цианиновый краситель, например Cy3 или Cy5), в лунки, содержащие трансфицированные клетки, для иммунного окрашивания FLAG-меченного PGRN, если он присутствует, и обнаружение флуоресцентного красителя с помощью, например, флуорометров или устройств для визуализации.

N-концевой FLAG-меченный PGRN:

SEQ ID NO: 3

ATGTGGACTCTGGTCTCATGGGTGGCTCTGACTGCTGGACTGGTGGCTGGA
ACCGACTACAAGGACGACGACGACAAACTCGCTGCCCTGACGGCCAGTTC
TGCGACAAATGGCCCACAACACTGAGCAGGCATCTGGGTGGCCCCTGCCA
GGTTGATGCCCACTGCTCTGCCGGCCACTCCTGCATCTTTACCGTCTCAGG
GACTTCCAGTTGCTGCCCTTCCCAGAGGCCGTGGCATGCGGGGATGGCCA

TCACTGCTGCCACGGGGCTTCCACTGCAGTGCAGACGGGGCGATCCTGCTT
CCAAAGATCAGGTAACAACCTCCGTGGGTGCCATCCAGTGCCCTGATAGTC
AGTTCGAATGCCCCGACTTCTCCACGTGCTGTGTTATGGTCGATGGCTCCT
GGGGGTGCTGCCCCATGCCCCAGGCTTCCCTGCTGTGAAGACAGGGTGCAC
5 TGCTGTCCGCACGGTGCCTTCTGCGACCTGGTTCACACCCGCTGCATCACA
CCCACGGGCACCCACCCCCTGGCAAAGAAGCTCCCTGCCCAGAGGACTAA
CAGGGCAGTGGCCTTGTCCAGCTCGGTTCATGTGTCCGGACGCACGGTCCCG
GTGCCCTGATGGTTCTACCTGCTGTGAGCTGCCCAGTGGGAAGTATGGCTG
CTGCCCAATGCCAACGCCACCTGCTGCTCCGATCACCTGCACTGCTGCCC
10 CCAAGACACTGTGTGTGACCTGATCCAGAGTAAGTGCCTCTCCAAGGAGA
ACGCTACCACGGACCTCCTACTAAGCTGCCTGCGCACACAGTGGGGGAT
GTGAAATGTGACATGGAGGTGAGCTGCCCAGATGGCTATACCTGCTGCCG
TCTACAGTCGGGGGCCTGGGGCTGCTGCCCTTTTACCCAGGCTGTGTGCTG
TGAGGACCACATACTGCTGTCCCGCGGGGTTTACGTGTGACACGCAGA
15 AGGGTACCTGTGAACAGGGGCCCCACCAGGTGCCCTGGATGGAGAAGGCC
CCAGCTCACCTCAGCCTGCCAGACCCACAAGCCTTGAAGAGAGATGTCCC
CTGTGATAATGTCAGCAGCTGTCCCTCCTCCGATACCTGCTGCCAACTCAC
GTCTGGGGAGTGGGGCTGCTGTCCAATCCCAGAGGCTGTCTGCTGCTCGGA
CCACCAGCACTGCTGCCCCAGGGCTACACGTGTGTAGCTGAGGGGCGAGT
20 GTCAGCGAGGAAGCGAGATCGTGGCTGGACTGGAGAAGATGCCTGCCCCG
CGGGCTTCCTTATCCCACCCCAGAGACATCGGCTGTGACCAGCACACCAGC
TGCCCGGTGGGGCAGACCTGCTGCCCCAGCCTGGGTGGGAGCTGGGCCTG
CTGCCAGTTGCCCCATGCTGTGTGCTGCGAGGATCGCCAGCACTGCTGCCC
GGCTGGCTACACCTGCAACGTGAAGGCTCGATCCTGCGAGAAGGAAGTGG
25 TCTCTGCCCAGCCTGCCACCTTCCCTGGCCCGTAGCCCTCACGTGGGTGTGA
AGGACGTGGAGTGTGGGGAAGGACACTTCTGCCATGATAACCAGACCTGC
TGCCGAGACAACCGACAGGGCTGGGCCTGCTGTCCCTACCGCCAGGGCGT
CTGTTGTGCTGATCGGCGCCACTGCTGTCCCTGCTGGCTTCCGCTGCGCAGC
CAGGGGTACCAAGTGTGTTGCGCAGGGAGGCCCGCGCTGGGACGCCCTT
30 TGAGGGACCCAGCCTTGAGACAGCTGCTGTGAGGGACAGTACTGAAGACT
CTGCAGCCCTCGGGACCCCACTCGGAGGGTGCCCTCTGCTCA

SEQ ID NO: 4

MWTLVSWVALTAGLVAGTDYKDDDDKRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCC
RPLLDKWPTTLRHLGGPCQVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPEAVACGDG

HHCCPRGFHCSADGRSCFQRSGNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCCVMVDGSW
 GCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTHPLAKKLPARTNRA
 VALSSVMCPDARSRCPDGSTCCELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCCPQDT
 VCDLIQSKCLSKENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCRLQSGA
 5 WGCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPWMEKAPAHLSL
 PDPQALKRDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQG
 YTCVAEGQCQRGSEIVAGLEKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCCPSL
 GGSWACCQLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVSAQPATFLARS
 PHVGVKDVECGEGHFCHDNQTCCRDNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPA
 10 GFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDPALRQLL

В одном варианте осуществления обнаруживаемая метка представляет собой
 HA-метку, а целевой белок представляет собой N-концевой HA-меченный PGRN.
 Окончательный скрининг включает в себя добавление антитела к HA, которое
 15 ковалентно присоединенного к красителю (такому как антитело к HA Dylight 650[®]), в
 лунки, содержащие трансфицированные клетки, для иммунного окрашивания HA-
 меченного PGRN, если он присутствует, и обнаружение красителя.

N-концевой HA-меченный PGRN:

20 SEQ ID NO: 5
 ATGTGGACTCTGGTCTCATGGGTGGCTCTGACTGCTGGACTGGTGGCTGGA
 ACCTACCCATACGATGTTCCAGATTACGCTCGCTGCCCTGACGGCCAGTTC
 TGCGACAAATGGCCCACAACACTGAGCAGGCATCTGGGTGGCCCCTGCCA
 GGTTGATGCCCACTGCTCTGCCGGCCACTCCTGCATCTTTACCGTCTCAGG
 25 GACTTCCAGTTGCTGCCCTTCCCAGAGGCCGTGGCATGCGGGGATGGCCA
 TCACTGCTGCCACGGGGCTTCCACTGCAGTGCAGACGGGCGATCCTGCTT
 CCAAAGATCAGGTAACAACCTCCGTGGGTGCCATCCAGTGCCCTGATAGTC
 AGTTCGAATGCCCGGACTTCTCCACGTGCTGTGTTATGGTCGATGGCTCCT
 GGGGGTGCTGCCCCATGCCCCAGGCTTCCCTGCTGTGAAGACAGGGTGAC
 30 TGCTGTCCGCACGGTGCCCTTCTGCGACCTGGTTCACACCCGCTGCATCACA
 CCCACGGGCACCCACCCCCTGGCAAAGAAGCTCCCTGCCCAGAGGACTAA
 CAGGGCAGTGGCCTTGTCCAGCTCGGTTCATGTGTCCGGACGCACGGTCCCG
 GTGCCCTGATGGTTCTACCTGCTGTGAGCTGCCCAGTGGGAAGTATGGCTG
 CTGCCCAATGCCCAACGCCACCTGCTGCTCCGATCACCTGCACTGCTGCC

CCAAGACACTGTGTGTGACCTGATCCAGAGTAAGTGCCTCTCCAAGGAGA
 ACGCTACCACGGACCTCCTCACTAAGCTGCCTGCGCACACAGTGGGGGAT
 GTGAAATGTGACATGGAGGTGAGCTGCCAGATGGCTATACCTGCTGCCG
 TCTACAGTCGGGGGCTGGGGCTGCTGCCCTTTTACCCAGGCTGTGTGCTG
 5 TGAGGACCACATACTGCTGTCCCGCGGGGTTTACGTGTGACACGCAGA
 AGGGTACCTGTGAACAGGGGCCCCACCAGGTGCCCTGGATGGAGAAGGCC
 CCAGCTCACCTCAGCCTGCCAGACCCACAAGCCTTGAAGAGAGATGTCCC
 CTGTGATAATGTCAGCAGCTGTCCCTCCTCCGATACCTGCTGCCAACTCAC
 GTCTGGGGAGTGGGGCTGCTGTCCAATCCCAGAGGCTGTCTGCTGCTCGGA
 10 CCACCAGCACTGCTGCCCCAGGGCTACACGTGTGTAGCTGAGGGGCAGT
 GTCAGCGAGGAAGCGAGATCGTGGCTGGACTGGAGAAGATGCCTGCCCGC
 CGGGCTTCCTTATCCCACCCCAGAGACATCGGCTGTGACCAGCACACCAGC
 TGCCCGGTGGGGCAGACCTGCTGCCCCGAGCCTGGGTGGGAGCTGGGCCTG
 CTGCCAGTTGCCCCATGCTGTGTGCTGCGAGGATCGCCAGCACTGCTGCC
 15 GGCTGGCTACACCTGCAACGTGAAGGCTCGATCCTGCGAGAAGGAAGTGG
 TCTCTGCCCAGCCTGCCACCTCCTGGCCCGTAGCCCTCACGTGGGTGTGA
 AGGACGTGGAGTGTGGGGAAGGACACTTCTGCCATGATAACCAGACCTGC
 TGCCGAGACAACCGACAGGGCTGGGCCTGCTGTCCCTACCGCCAGGGCGT
 CTGTTGTGCTGATCGGCGCCACTGCTGTCCCTGCTGGCTTCCGCTGCGCAGC
 20 CAGGGGTACCAAGTGTGTTGCGCAGGGAGGCCCCGCGCTGGGACGCCCTT
 TGAGGGACCCAGCCTTGAGACAGCTGCTGTGAGGGACAGTACTGAAGACT
 CTGCAGCCCTCGGGACCCCACTCGGAGGGTGCCCTCTGCTCA

SEQ ID NO: 6

MWTLVSWVALTAGLVAGTYPYDVPDYARCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCC
 25 RPLLDKWPTTLSRHLGGPCQVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPEAVACGDG
 HHCCPRGFHCSADGRSCFQRSGNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCCVMVDGSW
 GCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTHPLAKKLPARTNRA
 VALSSVMCPDARSRCPDGSTCCELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCCPQDT
 VCDLIQSKCLSKENATDILLTKLPAHTVGDVKCDMEVSPDGYTCCRLQSGA
 30 WGCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPWMEKAPAHLSL
 PDPQALKRDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQG
 YTCVAEGQCQRGSEIVAGLEKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCCPSL
 GGSWACCQLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVSAQPATFLARS

PHVGVKDVECGEGHFCNDNQTCCRDNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPA
GFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDPALRQL

Предпочтительно для обнаружения меченого PGRN используют
5 высокопроизводительное устройство для визуализации.

Идентификация внутриклеточных белков, связывающих PGRN

В другом аспекте изобретение, описанное в настоящем документе, представляет
собой способы скрининга внутриклеточных белков, связывающих програнулин (PGRN).
10 Схематическое представление данного способа показано на Фиг. 1.

В этом способе применяют целевой белок, состоящий из PGRN, слитого с
обнаруживаемой меткой (как описано выше), библиотеки или набора кДНК,
содержащего множество экспрессионных векторов, каждый из которых кодирует
отдельный белок (предпочтительно белки человека, более предпочтительно
15 внутриклеточные белки человека), и клетки-хозяева (как описано выше).

Способ включает в себя введение экспрессионного вектора из библиотеки кДНК
в клетку-хозяина и поддержание экспрессионного вектора и клетки-хозяина в
приемлемой культуральной среде в приемлемых условиях культивирования, чтобы
обеспечить трансфекцию и экспрессию белка, кодируемого экспрессионным вектором.
20 Приемлемые условия культивирования аналогичны описанным выше.

После удаления культуральной среды трансфицированные клетки
пермеабилзируют с помощью агента для пермеабилзации (как описано выше) с
последующей промывкой промывочным буфером. Агент для пермеабилзации может в
достаточной степени разрушить клеточную мембрану клетки, чтобы позволить
25 целевым белкам проникнуть в клетку. Затем пермеабилзированные клетки приводят в
контакт с целевым белком и поддерживают в приемлемых условиях (как описано
выше), чтобы обеспечить потенциальную связь между внутриклеточными белками и
целевым белком. Необязательно перед пермеабилзацией трансфицированные клетки
фиксируют фиксирующим агентом с последующей промывкой промывочным буфером.

30 После контакта с целевым белком клетки фиксируют фиксирующим агентом
(как описано выше) и промывают промывочным буфером для удаления несвязавшегося
целевого белка.

И наконец, определяют присутствие обнаруживаемой метки, причем при определении присутствия обнаруживаемой метки белок, кодируемый экспрессионным вектором, идентифицируют как внутриклеточный белок, связывающий PGRN.

5 Не обязательно перед обнаружением обнаруживаемой метки фиксированные клетки снова подвергают пермеабиллизации с помощью агента для пермеабиллизации с последующей промывкой промывочным буфером.

В одном варианте осуществления обнаруживаемая метка представляет собой FLAG-метку, а целевой белок представляет собой N-концевой FLAG-меченный PGRN. Для определения присутствия FLAG-метки антитело к FLAG, которое ковалентно
10 присоединено к флуоресцентному красителю (такому как цианиновый краситель, например Cy3 или Cy5), добавляют для иммунного окрашивания FLAG-меченного PGRN, если он присутствует, и используют устройство для визуализации или флуорометр для обнаружения присутствия флуоресцентного красителя на клетках.

В одном варианте осуществления обнаруживаемая метка представляет собой
15 HA-метку, а целевой белок представляет собой N-концевой HA-меченный PGRN. Окончательный скрининг включает в себя добавление антитела к HA, которое ковалентно присоединено к красителю (такому как антитело к HA Dylight 650®), в лунки, содержащие трансфицированные клетки, для иммунного окрашивания HA-меченного PGRN, если он присутствует, и обнаружение красителя.

20 В одном варианте осуществления скрининг внутриклеточных белков, связывающих програнулин (PGRN), проводят высокопроизводительным способом. В высокопроизводительном процессе используют многолуночные планшеты, например 96-луночные, 384-луночные или 1536-луночные планшеты. Клетки-хозяева в приемлемой культуральной среде помещают в одну или более лунок планшета. И
25 начиная с помещения клеток-хозяев в одну или более лунок до скрининга на присутствие обнаруживаемой метки каждую стадию процесса выполняют высокопроизводительным способом, например, с помощью роботизированной руки.

ПРИМЕР

30 Специалистам в данной области будет понятно, что в варианты осуществления, описанные выше, можно вносить изменения без отступления от общей концепции изобретения. Таким образом, следует понимать, что данное изобретение не ограничено конкретными описанными вариантами осуществления, но предполагается, что оно

охватывает модификации в пределах сущности и объема настоящего изобретения, определяемых настоящим описанием.

Идентификация рецептора клеточной поверхности для програнулина

5 В этом исследовании использовали набор кДНК, содержащий более 4000 готовых к трансфекции плазмид кДНК как для белков человека, так и для мышинных белков с трансмембранным доменом (полученных от OriGene). Открытые рамки считывания человека (ORF) расположены на основных цепях pCMV6-AC pCMV6-XL4, 10 pCMV6-XL5, pCMV6-XL6 или pCMV6-NEO, а ORF мыши расположены на каркасе pCMV6-Kan/Neo. Плазмиды кДНК трансфицировали отдельно в клетки HEK293T (ATCC) в 384-луночных планшетах, покрытых поли-D-лизином (Perkin Elmer) с помощью Fugene 6 (Promega). В каждую лунку высевали по 10 000 клеток. С помощью Fugene 6 в соответствии с инструкциями производителя каждую лунку трансфицировали 60 нг плазмидной ДНК, 0,3 нг из которых составляли плазмиду GFP 15 (ген зеленого флуоресцентного белка (GFP), экспрессируемый на pcDNA3.1) в качестве контроля эффективности трансфекции. Клетки инкубировали в течение 1 дня при 37°C, после чего их переводили на 30°C и инкубировали в течение 2 дней. Через три (3) дня после трансфекции клетки в каждой лунке инкубировали со 100 нМ N-концевого FLAG-меченного PGRN при комнатной температуре в течение 2 часов. После 20 инкубации PGRN среду удаляли и клетки фиксировали 4% параформальдегидом в течение 40 минут при комнатной температуре. После этого клетки промывали сбалансированным солевым раствором HEPES (HBSS) 3 раза и пермеабилizировали 0,3% тритоном X-100 в течение 30 минут при комнатной температуре. После пермеабилizации клетки снова промывали 3 раза, а затем осуществляли иммунное 25 окрашивание с помощью 400 нг/мл антитела к Flag M2-Cy3 (Sigma) при 4°C в течение ночи. На следующий день клетки снова промывали 3 раза, а затем окрашивали реагентом NucBlue Live ReadyProbes (Invitrogen) в соответствии с инструкциями производителя. Затем планшет визуализировали с помощью высокопроизводительной машины визуализации Opera Phenix (Perkin Elmer).

30

Идентификация внутриклеточного партнера по связыванию для програнулина

Были подвергнуты скринингу два отдельных набора кДНК, содержащие в общей сложности около 9000 плазмид. Первый набор кДНК содержит около 3000 готовых к трансфекции плазмид кДНК как для белков человека, так и для белков мышей,

экспрессируемых в центральной нервной системе (ЦНС). ORF человека аналогичны указанным выше и расположены на основных цепях pCMV6-AC pCMV6-XL4, pCMV6-XL5, pCMV6-XL6 или pCMV6-NEO. ORF мыши в этом наборе расположены на основной цепи pCMV6-Entry. Некоторые белки в этом наборе были помечены меткой Мус-DDK, и в этом случае для скрининга использовали НА-меченный PGRN. Второй набор кДНК, содержащий около 6000 готовых к трансфекции плазмид кДНК, выбранных из библиотеки hORFeome V8.1 (полученной от Института Брода). Плазмиды трансфицировали отдельно в клетки HEK293T (ATCC) в 384-луночных планшетах, покрытых поли-D-лизином (Perkin Elmer) с помощью Fugene 6 (Promega). В каждую лунку высевали по 10 000 клеток. С помощью Fugene 6 в соответствии с инструкциями производителя каждую лунку трансфицировали 60 нг плазмидной ДНК, 3 нг из которых представляли собой плазмиду GFP в качестве контроля трансфекции. Клетки инкубировали в течение 1 дня при 37°C, после чего их переводили на 30°C и инкубировали в течение 2 дней. Через три (3) дня после трансфекции среду удаляли и клетки фиксировали 4% параформальдегидом в течение 40 минут при комнатной температуре. После этого клетки промывали HBSS 3 раза и пермеабелизировали 0,3% тритоном X-100 в течение 30 минут при комнатной температуре. После пермеабелизации клетки снова промывали 3 раза и инкубировали в среде Игла, модифицированной по Дульбекко (DMEM), содержащей 100 нМ N-концевого FLAG-меченного PGRN, в течение 2 часов при комнатной температуре. После инкубации с PGRN DMEM удаляли и клетки снова фиксировали 4% параформальдегидом в течение 40 минут при комнатной температуре. После 2-й фиксации клетки снова промывали HBSS 3 раза, а затем осуществляли иммунное окрашивание с помощью 400 нг/мл антитела к Flag M2-Cy3 (Sigma) при 4°C в течение ночи. На следующий день клетки снова промывали 3 раза, а затем окрашивали реагентом NucBlue Live ReadyProbes (Invitrogen) в соответствии с инструкциями производителя. Затем планшет визуализировали с помощью высокопроизводительной машины визуализации Opera Phenix (Perkin Elmer). На Фиг. 2 показана интенсивность Cy3 для клеток, трансфицированных вектором pcDNA3 (отрицательный контроль), и клеток, трансфицированных экспрессионным вектором, несущим кодирующую последовательность сортина (положительный контроль). Также на Фиг. 2 показана интенсивность Cy3 для клеток, трансфицированных одной из 9000 экспрессионных плазмид, которая сопоставима с положительным контролем. Таким образом,

внутриклеточный белок, кодируемый экспрессионной плазмидой, был идентифицирован как Hit #1.

Подтверждение Hit #1

5 Плазмиду для Hit #1 вместе с вектором pcDNA3 (отрицательный контроль) и экспрессионным вектором, несущим кодирующую последовательность сортилина (положительный контроль), отдельно трансфицировали в клетки НЕК293. Следуя тому же процессу, который описан в разделе «Идентификация внутриклеточного партнера по связыванию для програнулина», трансфицированные клетки подвергали
10 воздействию N-концевого FLAG-меченного PGRN или N-концевого HA-меченного PGRN с последующим иммунным окрашиванием антителом к Flag M2-Cy3 и антителом к HA Dylight650 соответственно. Как показано на Фиг. 3А и 3В, интенсивность Cy3 и Dylight для клеток, трансфицированных плазмидой Hit #1, была сопоставима с интенсивностью для положительного контроля. Кроме того, клетки,
15 трансфицированные плазмидой Hit #1, также подвергали иммунному окрашиванию антителом к Flag M2-Cy3 и антителом к HA Dylight 650 без предварительного воздействия на них FLAG-меченного PGRN или HA-меченного PGRN. И, как показано на Фиг. 3Б, в обоих случаях флуоресцентный сигнал был таким же, как и в случае отрицательного контроля, что подтверждает, что идентификация Hit #1 не была связана
20 с неспецифическим связыванием антитела с клетками, трансфицированными плазмидой Hit #1.

Кроме того, следуя тому же процессу, который описан в разделе «Идентификация рецептора клеточной поверхности для програнулина», клетки НЕК293, трансфицированные вектором pcDNA3 (отрицательный контроль),
25 экспрессионным вектором, несущим кодирующую последовательность сортилина (положительный контроль), и плазмидой Hit #1, подвергались воздействию FLAG-меченного PGRN или HA-меченного PGRN без пермеабилзации с последующим иммунным окрашиванием антителом к Flag M2-Cy3 и антителом к HA Dylight 650 соответственно. Как показано на Фиг. 4, интенсивность флуоресцентного сигнала для
30 Hit #1 была такой же, как и в случае отрицательного контроля, что подтверждает, что Hit #1 не представляет собой поверхностный рецептор для PGRN.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ высокопроизводительного скрининга для идентификации трансмембранных белков, связывающих програнулин (PGRN), включающий:
- 5 a) обеспечение набора кДНК, содержащего множество экспрессионных векторов, причем каждый экспрессионный вектор кодирует отдельный трансмембранный белок;
- b) обеспечение планшета, содержащего множество лунок, причем каждая из одной или более его лунок содержит клетки-хозяева;
- 10 c) введение в каждую из одной или более лунок отдельного экспрессионного вектора из указанного набора и таким образом получение отдельных трансфицированных клеток в каждой лунке;
- d) культивирование трансфицированных клеток в условиях, обеспечивающих экспрессию отдельного трансмембранного белка в
- 15 каждой лунке;
- e) приведение в контакт трансфицированных клеток в каждой из одной или более лунок с целевым белком, содержащим PGRN, присоединенным к обнаруживаемой метке;
- f) фиксацию трансфицированных клеток фиксирующим агентом после
- 20 контакта с целевым белком;
- g) промывку фиксированных клеток; и
- h) определение, после промывки фиксированных клеток, присутствия обнаруживаемой метки в каждой из одной или более лунок, причем при
- 25 определении присутствия обнаруживаемой метки в лунке трансмембранный белок, экспрессируемый трансфицированными клетками в лунке, идентифицируют как трансмембранный белок, связывающий PGRN.
2. Способ высокопроизводительного скрининга по п. 1, в котором клетки-хозяева
- 30 выбраны из группы, состоящей из клетки почки эмбриона человека 293Т (HEK293Т), клеток HEK293F, клеток HeLa, клеток яичника китайского хомяка (CHO), клеток NIH 3Т3, клеток MCF-7, клеток Нер G2, клеток почки детеныша хомяка (ВНК), клеток BV-2 (мышь, C57BL/6, головного мозга, микроглии), клеток Neuro-2a (N2a) и клеток Cos7.

3. Способ высокопроизводительного скрининга по п. 1 или 2, в котором фиксирующий агент выбран из глутаральдегида, метанола и параформальдегида.
- 5 4. Способ высокопроизводительного скрининга по любому из пп. 1–3, в котором обнаруживаемая метка выбрана из группы, состоящей из зеленого флуоресцентного белка (GFP), мус, мус-пируваткиназы (мус-ПК), His6, мальтозосвязывающего белка (MBP), метки гемагглютинина (HA) вируса гриппа человека, FLAG-метки (FLAG) и метки глутатион-S-трансферазы (GST).
- 10 5. Способ высокопроизводительного скрининга по п. 4, в котором целевой белок представляет собой FLAG-меченный PGRN.
- 15 6. Способ высокопроизводительного скрининга по п. 5, в котором стадия h) включает в себя h1) добавление антитела к FLAG, которое ковалентно присоединено к флуоресцентному красителю, в лунки, содержащие трансфицированные клетки, для иммунного окрашивания FLAG-меченного PGRN, если он присутствует, и h2) обнаружение флуоресцентного красителя с помощью флуорометра или устройства для визуализации высокопроизводительным способом.
- 20 7. Способ высокопроизводительного скрининга по п. 6, в котором флуоресцентный краситель представляет собой цианиновый краситель.
- 25 8. Способ высокопроизводительного скрининга по п. 4, в котором целевой белок представляет собой HA-меченный PGRN.
- 30 9. Способ высокопроизводительного скрининга по п. 8, в котором стадия h) включает в себя h1) добавление антитела к HA, которое ковалентно присоединено к флуоресцентному красителю, в лунки, содержащие трансфицированные клетки, для иммунного окрашивания HA-меченного PGRN, если он присутствует, и h2) обнаружение флуоресцентного красителя с помощью флуорометра или устройства для визуализации высокопроизводительным способом.

10. Способ высокопроизводительного скрининга по п. 6, в котором флуоресцентный краситель представляет собой Dylight 650.
- 5 11. Способ высокопроизводительного скрининга по любому из пп. 1–10, в котором между стадиями g) и h) способ дополнительно включает в себя пермеабиллизацию фиксированных клеток с помощью агента для пермеабиллизации и промывку пермеабиллизированных клеток.
- 10 12. Способ высокопроизводительного скрининга по п. 11, в котором агент для пермеабиллизации выбран из группы, состоящей из сапонины, тритона X-100, лизолецитина, n-октил-B-D-глюкопиранозида и твина 20.
- 15 13. Способ идентификации внутриклеточных белков, связывающих PGRN, включающий:
- a) введение в клетки-хозяева экспрессионного вектора, кодирующего гетерологичный белок, с получением таким образом трансфицированных клеток;
- b) культивирование трансфицированных клеток в условиях, обеспечивающих экспрессию гетерологичного белка;
- 20 c) пермеабиллизацию трансфицированных клеток агентом для пермеабиллизации;
- d) приведение пермеабиллизированных клеток в контакт с целевым белком, содержащим PGRN, присоединенным к обнаруживаемой метке;
- 25 e) фиксацию трансфицированных клеток фиксирующим агентом после контакта с целевым белком;
- f) промывку фиксированных клеток; и
- g) определение, после промывки фиксированных клеток, присутствия обнаруживаемой метки на промытых клетках, причем при определении присутствия обнаруживаемой метки гетерологичный белок, экспрессируемый клетками, идентифицируют как внутриклеточный белок, связывающий PGRN.
- 30

14. Способ по п. 13, в котором клетки-хозяева выбраны из группы, состоящей из клетки почки эмбриона человека 293Т (НЕК293Т), клеток НЕК293Е, клеток HeLa, клеток яичника китайского хомяка (СНО), клеток НИН 3Т3, клеток МСF-7, клеток Нер G2, клеток почки детеныша хомяка (ВНК), клеток BV-2 (мышь, C57BL/6, головного мозга, микроглии), клеток Neuro-2a (N2a) и клеток Cos7.
- 5
15. Способ по п. 13 или 14, в котором обнаруживаемая метка выбрана из группы, состоящей из зеленого флуоресцентного белка (GFP), мус, мус-пируваткиназы (мус-ПК), His6, мальтозосвязывающего белка (MBP), метки гемагглютинина (НА) вируса гриппа человека, FLAG-метки (FLAG) и метки глутатион-S-трансферазы (GST).
- 10
16. Способ по п. 15, в котором целевой белок представляет собой PGRN, меченный FLAG.
- 15
17. Способ по п. 16, в котором стадия g) включает в себя g1) воздействие на клетки антителом к FLAG, которое ковалентно присоединено к флуоресцентному красителю, для иммунного окрашивания FLAG-меченного PGRN, если он присутствует, и g2) обнаружение флуоресцентного красителя с помощью флуорометра или устройства для визуализации.
- 20
18. Способ по п. 17, в котором флуоресцентный краситель представляет собой цианиновый краситель.
- 25
19. Способ по п. 15, в котором целевой белок представляет собой PGRN, меченный НА.
- 20.
- 30
20. Способ по п. 19, в котором стадия g) включает в себя g1) воздействие на клетки антителом к НА, которое ковалентно присоединено к флуоресцентному красителю, для иммунного окрашивания НА-меченного PGRN, если он присутствует, и g2) обнаружение флуоресцентного красителя с помощью флуорометра или устройства для визуализации.

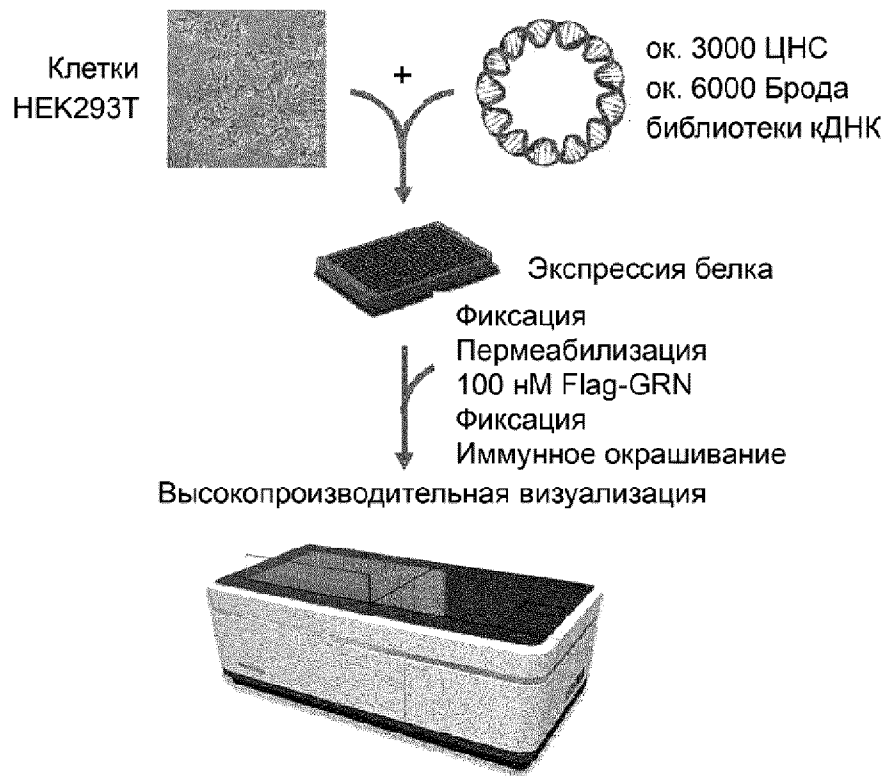
21. Способ по п. 20, в котором флуоресцентный краситель представляет собой Dylight 650.
22. Способ по любому из пп. 13–21, в котором между стадиями b) и c) способ дополнительно включает в себя фиксацию культивируемых клеток фиксирующим агентом и промывку фиксированных клеток.
23. Способ по любому из пп. 13–22, в котором фиксирующий агент выбран из глутаральдегида, метанола и параформальдегида.
24. Способ по любому из пп. 13–23, в котором между стадиями f) и g) способ дополнительно включает в себя пермеабиллизацию фиксированных клеток с помощью агента для пермеабиллизации и промывку пермеабиллизированных клеток.
25. Способ по любому из пп. 13–24, в котором агент для пермеабиллизации выбран из группы, состоящей из сапонаина, тритона X-100, лизолецитина, n-октил-B-D-глюкопиранозида и твина 20.
26. Способ высокопроизводительного скрининга для идентификации внутриклеточных белков, связывающих PGRN, включающий:
- обеспечение набора кДНК, содержащей множество экспрессионных векторов, причем каждый экспрессионный вектор кодирует отдельный гетерологичный белок;
 - обеспечение планшета, содержащего множество лунок, причем каждая из одной или более его лунок содержит клетки-хозяева;
 - введение в каждую из одной или более лунок отдельного экспрессионного вектора из указанного набора и таким образом получение отдельных трансфицированных клеток в каждой лунке;
 - культивирование трансфицированных клеток в условиях, обеспечивающих экспрессию отдельного гетерологичного белка в каждой лунке;
 - пермеабиллизацию трансфицированных клеток агентом для пермеабиллизации;

- f) приведение в контакт пермеабиллизированных клеток в каждой из одной или более лунок с целевым белком, содержащим PGRN, присоединенным к обнаруживаемой метке;
- g) фиксацию трансфицированных клеток фиксирующим агентом после
5 контакта с целевым белком;
- h) промывку фиксированных клеток; и
- i) определение, после промывки фиксированных клеток, присутствия
10 обнаруживаемой метки в каждой из одной или более лунок, причем при
определении присутствия обнаруживаемой метки в лунке
гетерологичный белок, экспрессируемый трансфицированными клетками
в лунке, идентифицируют как внутриклеточный белок, связывающий
PGRN.
27. Способ высокопроизводительного скрининга по п. 26, в котором клетки-хозяева
15 выбраны из группы, состоящей из клетки почки эмбриона человека 293Т
(НЕК293Т), клеток НЕК293F, клеток HeLa, клеток яичника китайского хомяка
(СНО), клеток NIH 3Т3, клеток MCF-7, клеток Hep G2, клеток почки детеныша
хомяка (ВНК), клеток BV-2 (мыши, C57BL/6, головного мозга, микроглии),
клеток Neuro-2a (N2a) и клеток Cos7.
- 20
28. Способ высокопроизводительного скрининга по п. 26 или 27, в котором
обнаруживаемая метка выбрана из группы, состоящей из зеленого
флуоресцентного белка (GFP), мус, мус-пируваткиназы (мус-ПК), His6,
мальтозосвязывающего белка (MBP), метки гемагглютинина вируса гриппа
25 человека, FLAG-метки (FLAG) и метки глутатион-S-трансферазы (GST).
29. Способ высокопроизводительного скрининга по п. 28, в котором целевой белок
представляет собой FLAG-меченный PGRN.
- 30
30. Способ высокопроизводительного скрининга по п. 29, в котором стадия i)
включает в себя i1) добавление антитела к FLAG, которое ковалентно
присоединено к флуоресцентному красителю, в лунки, содержащие
трансфицированные клетки, для иммунного окрашивания FLAG-меченного
PGRN, если он присутствует, и i2) обнаружение флуоресцентного красителя с

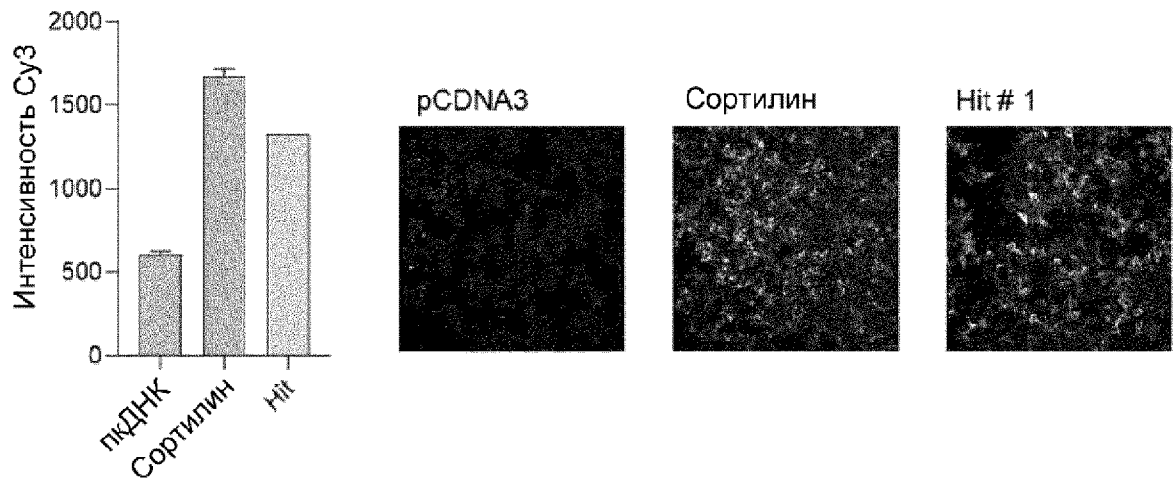
помощью флуорометра или устройства для визуализации высокопроизводительным способом.

31. Способ высокопроизводительного скрининга по п. 30, в котором
5 флуоресцентный краситель представляет собой цианиновый краситель.
32. Способ высокопроизводительного скрининга по п. 28, в котором целевой белок представляет собой НА-меченный PGRN.
- 10 33. Способ высокопроизводительного скрининга по п. 32, в котором стадия i) включает в себя i1) добавление антитела к НА, которое ковалентно присоединено к флуоресцентному красителю, в лунки, содержащие трансфицированные клетки, для иммунного окрашивания НА-меченного PGRN, если он присутствует, и i2) обнаружение флуоресцентного красителя с помощью
15 флуорометра или устройства для визуализации высокопроизводительным способом.
34. Способ высокопроизводительного скрининга по п. 33, в котором флуоресцентный краситель представляет собой Dylight 650.
20
35. Способ высокопроизводительного скрининга по любому из пп. 26–34, в котором между стадиями d) и e) способ дополнительно включает в себя фиксацию культивируемых клеток фиксирующим агентом и промывку фиксированных
25 клеток.
36. Способ высокопроизводительного скрининга по любому из пп. 26–35, в котором фиксирующий агент выбран из глутаральдегида, метанола и параформальдегида.
37. Способ высокопроизводительного скрининга по любому из пп. 26–36, в котором
30 между стадиями h) и i) способ дополнительно включает в себя пермеабиллизацию фиксированных клеток с помощью агента для пермеабиллизации и промывку пермеабиллизированных клеток.

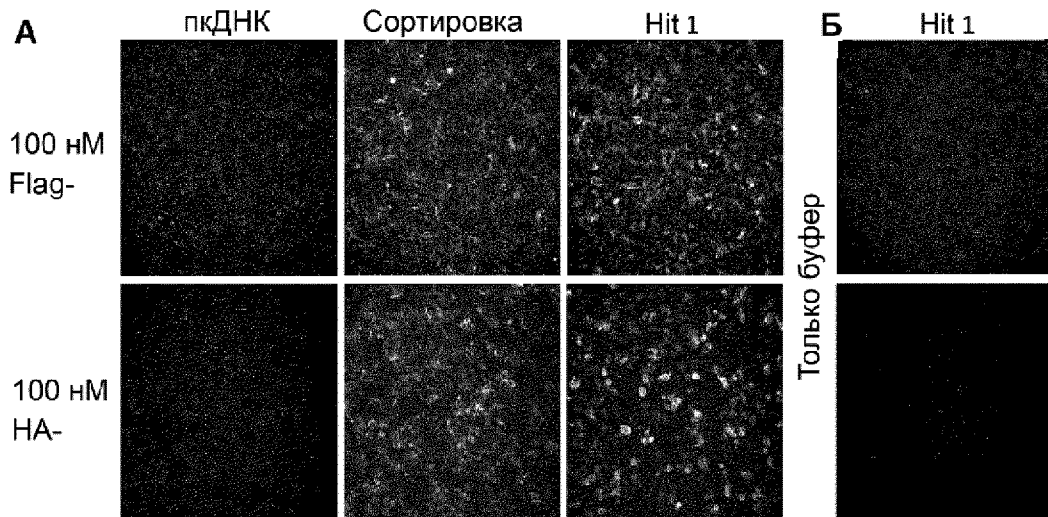
38. Способ высокопроизводительного скрининга по любому из пп. 26–37, в котором агент для пермеабилзации выбран из группы, состоящей из сапонины, тритона X-100, лизолецитина, н-октил-β-D-глюкопиранозида и твина 20.



Фиг. 1

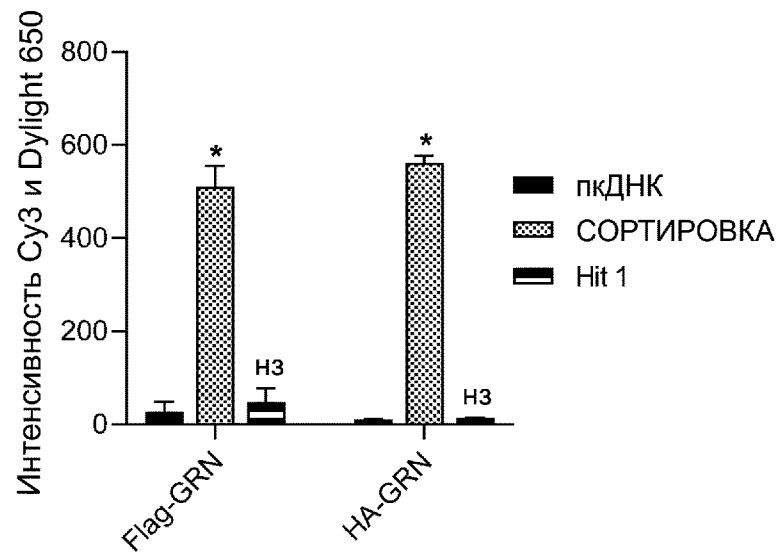


Фиг. 2



Фиг. 3А-3Б





Фиг. 4