

(12) МЕЖДУНАРОДНАЯ ЗАЯВКА, ОПУБЛИКОВАННАЯ В
СООТВЕТСТВИИ С ДОГОВОРом О ПАТЕНТНОЙ КООПЕРАЦИИ (РСТ)

(19) Всемирная Организация
Интеллектуальной Собственности
Международное бюро

(43) Дата международной публикации
16 марта 2023 (16.03.2023)



(10) Номер международной публикации
WO 2023/038547 A1

(51) Международная патентная классификация:

C12N 15/63 (2006.01) C12Q 1/6897 (2018.01)

C12N 5/10 (2006.01) G01N 33/533 (2006.01)

(21) Номер международной заявки: PCT/RU2022/050279

(22) Дата международной подачи:

06 сентября 2022 (06.09.2022)

(25) Язык подачи:

Русский

(26) Язык публикации:

Русский

(30) Данные о приоритете:

2021126254 07 сентября 2021 (07.09.2021) RU

(71) Заявитель: АКЦИОНЕРНОЕ ОБЩЕСТВО "БИО-КАД" (JOINT STOCK COMPANY «BIOCAD») [RU/RU]; вн. тер. г. поселок Стрельна, п. Стрельна, ул. Связи, 38, стр. 1, помещ. 89 Санкт-Петербург, 198515, Saint Petersburg (RU).

(72) Изобретатели: КОНОНОВ, Алексей Владимирович (KONONOV, Aleksey Vladimirovich); Микрорайон "АБ", д. 28, кв. 30 Пушкино, Московская обл., 142290, Pushchino, Moskovskaya obl. (RU). ЖИРЯКОВА, Мария Владимировна (ZHIRIAKOVA, Mariia

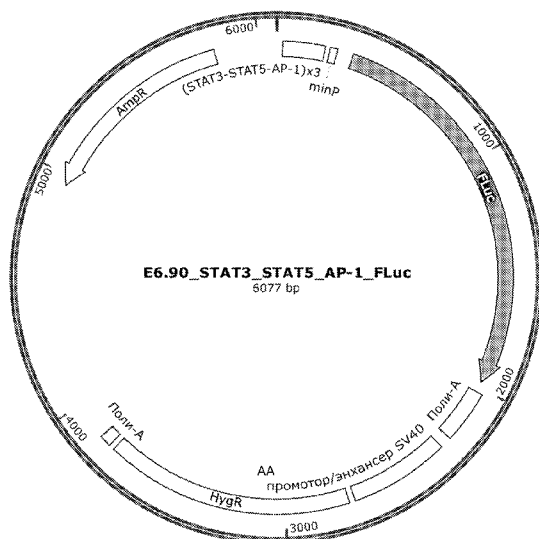
Vladimirovna); 4-й Новомихалковский пр., д. 7, кв. 17 Москва, 125183, Moscow (RU). ГОРДЕЕВ, Александр Андреевич (GORDEEV, Aleksandr Andreevich); Варшавское шоссе, д. 141А, корп.5, кв. 208 Москва, 117405, Moscow (RU). ПУЧКОВА, Мария Юрьевна (PUSHKOVA, Mariia Yurievna); ул. Кабакова, д.77А, кв. 52 Тула, 300036, Tula (RU). СОЛОВЬЕВ, Валерий Владимирович (SOLOVYEV, Valery Vladimirovich); Микрорайон "Д", д. 24, кв. 91 Пушкино, Московская обл., 142290, Pushchino, Moskovskaya obl. (RU). МОРОЗОВ, Дмитрий Валентинович (MOROZOV, Dmitry Valentinovich); Адмиралтейский р-н, ул. Почтамтская, д. 20, кв. 3 Санкт-Петербург, 190000, Saint Petersburg (RU).

(74) Агент: МЕЛЬЧАЕВА, Ольга Анатольевна (MELCHAEVA, Olga Anatolevna); вн. тер. г. поселок Стрельна, п. Стрельна, ул. Связи, 38, стр. 1, помещ. 89 Санкт-Петербург, 198515, Saint Petersburg (RU).

(81) Указанные государства (если не указано иначе, для каждого вида национальной охраны): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT,

(54) Title: INDUCIBLE PROMOTER, VECTOR AND HOST CELL BASED THEREON

(54) Название изобретения: ИНДУЦИБЕЛЬНЫЙ ПРОМОТОР, ВЕКТОР И КЛЕТКА-ХОЗЯИН НА ЕГО ОСНОВЕ



Фиг. 2

AA SV40 promoter/enhancer; Poly-A

(57) Abstract: The present invention relates to the field of biotechnology and molecular biology, and more particularly to a universal inducible promoter, a vector and a host cell based thereon, as well as to a method of obtaining said host cell. The proposed inventions make it possible to analyze the activity of a target protein such as, for example, a receptor ligand or a cytokine.

(57) Реферат: Настоящее изобретение относится к области биотехнологии и молекулярной биологии, а именно к универсальному индуцибельному промотору, вектору и клетке-хозяину на его основе, а также способу получения данной клетки-хозяина. Предложенные изобретения позволяют анализировать активность целевого белка, например, лиганда рецептора, например, цитокина.

HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) Указанные государства (если не указано иначе, для каждого вида региональной охраны): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), евразийский (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), европейский патент (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Опубликована:

- с отчётом о международном поиске (статья 21.3)
- до истечения срока для изменения формулы изобретения и с повторной публикацией в случае получения изменений (правило 48.2(h))
- с перечнем последовательностей в соответствии с Правилom 5.2(a)
- в черно-белом варианте; международная заявка в поданном виде содержит цвет или оттенки серого и доступна для загрузки из PATENTSCOPE.

Индукцибельный промотор, вектор и клетка-хозяин на его основе

Область техники

Настоящее изобретение относится к области биотехнологии и молекулярной биологии, а именно к универсальному индуцибельному промотору, вектору и клетке-хозяину на его основе, а также способу получения данной клетки-хозяина. Предложенные изобретения позволяют анализировать активность целевого белка, например, лиганда рецептора, например, цитокина.

Предшествующий уровень техники

Различные терапевтически активные полипептиды (например, моноклональные антитела, слитые белки, различные цитокины, лиганды рецепторов и так далее) доказали свою ценность в качестве эффективных лекарств для лечения ряда нарушений и заболеваний.

При разработке того или иного нового терапевтически активного полипептида необходимо проводить функциональные тесты для определения биологической активности данного терапевтически активного полипептида.

Тесты для определения биологической активности терапевтически активного полипептида представляют собой совокупность методик, применяемых для оценки кандидатов лекарственных препаратов, основой которых является исследование биологической активности молекулы *in vitro* с использованием как первичных клеточных культур, так и специализированных клеточных линий, либо *in vivo* с применением лабораторных животных. Данные, полученные при помощи функциональных тестов, позволяют получить информацию об активности того или иного кандидата терапевтически активного полипептида.

Функциональные тесты можно разделить на следующие группы:

1) анализ на специфическую активность (стимуляция и ингибирование клеточной пролиферации, цитотоксичность/апоптоз, противовирусная активность, дифференциация, миграция, и тп.);

2) анализ экспрессии репортерных генов.

Тесты на регуляцию пролиферации/цитотоксичности являются наиболее универсальными для большинства терапевтически активных полипептидов. В таких анализах уровень и активность терапевтически активных полипептидов измеряется через их способность повышать или снижать пролиферацию клеток. В основе метода лежит отслеживание роста либо гибели клеток в ответ на воздействие анализируемого образца (Banks RE. Measurement of cytokines in clinical samples using immunoassays: problems and pitfalls. Crit Rev Clin Lab Sci. 2000 Apr;37(2):131-82. doi: 10.1080/10408360091174187. PMID: 10811142).

Такие тесты нашли применение для анализа антипролиферативной активности, например, исследователи оценивали способность IFN- β -1a снижать рост клеток линии WISH (Renato Mastrangeli ET AL., In vitro biological characterization of IFN- β -1a major glycoforms, Glycobiology, Volume 25, Issue 1, January 2015, Pages 21–29, <https://doi.org/10.1093/glycob/cwu082>).

Другим ярким примером является анализ пролиферации лимфоцитов, который широко используется для оценки клеточного иммунитета (Nikbakht, M. ET ALL, Evaluation of a new lymphocyte proliferation assay based on cyclic voltammetry; an alternative method. Sci Rep 9, 4503 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41171-8>). На данный момент коммерчески доступны клеточные пролиферативные тесты для множества цитокинов: IFN- γ , IL-1 α , IL-1 β , IL-2,3,4,5,6,7,8,10,13,15,19,21,33.

Репортерные гены обычно используются в клеточных тестах для отслеживания изменений экспрессии, опосредованных рецепторами, на уровне транскрипции и/или трансляции. Эти оптимизированные гены экспрессируются под контролем чувствительного элемента в составе промотора, с которыми связываются транскрипционные факторы.

Phyllis A. Rees, R. Joel Lowy описывают использование репортерной клеточной линии для измерения интерферонов 1 типа, что служит альтернативой длительным и трудоёмким пролиферативным тестам (Phyllis A. ET ALL, Measuring type I interferon using reporter gene assays based on readily available cell lines, Journal of Immunological Methods, Volume 461, 2018, Pages 63-72, ISSN 0022-1759, <https://doi.org/10.1016/j.jim.2018.06.007>).

Jacqueline Mock и др разработали репортерную линию с геном люциферазы под контролем NF-κB зависимого промотора. Был получен аналог таким классическими тестами, как анализ пролиферативной активности CTLL-2, ИФА на выявление INF-γ индуцированного IL-12, определение цитотоксической активности TNF (Mock J. ET ALL, A universal reporter cell line for bioactivity evaluation of engineered cytokine products. Sci Rep. 2020;10(1):3234. Published 2020 Feb 24. doi:10.1038/s41598-020-60182-4).

Zeuner MT и др. показали применение линии репортерных клеток с NF-κB чувствительным промотором и геном люциферазы для исследования нейровоспаления. Данный анализ позволяет оценивать эффективность провоспалительных молекул и пептидов, а также противовоспалительных фармацевтических препаратов в нервных клетках (Marie-Theres Zeuner ET ALL., Development and Characterisation of a Novel NF- κ B Reporter Cell Line for Investigation of Neuroinflammation, Mediators Inflamm, 2017, doi: 10.1155/2017/6209865).

Wang et al. разработали аналог пролиферативного теста на основе клеточной линии, экспрессирующей люциферазу под контролем SIE (serum response element) (Wang L. et al., Development of reporter gene assays to determine the bioactivity of biopharmaceuticals, Biotechnology Advances (2018), <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.107466>).

К преимуществам репортерных клеток по сравнению с классическими анализами на специфическую активность можно отнести следующее:

- 1) хорошая воспроизводимость результатов, возможность автоматизации и масштабирования;

- 2) специфичность к целевому препарату;
- 3) высокая чувствительность, низкий уровень фоновой активации;
- 4) удобство использования, простота детекции репортерного сигнала.

К недостаткам репортерных клеток по сравнению с классическими анализами на специфическую активность можно отнести длительный процесс разработки индивидуальных репортерных клеток для целевого препарата, так как он может длиться до нескольких месяцев.

Таким образом, существует потребность в репортерных клетках, которые могли бы быть использованы для определения биологической активности множества различных терапевтически активных полипептидов, а не только одного индивидуального терапевтически активного полипептида.

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Авторами изобретения был разработан универсальный индуцибельный промотор, включающий сайты связывания транскрипционных факторов STAT3, STAT5 и AP-1 и минимальный промотор, а также вектор и клетка-хозяин на его основе, которые позволяют определять биологическую активность множества различных терапевтически активных полипептидов, а не только одного индивидуального терапевтически активного полипептида.

Краткое описание изобретения

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к индуцибельному промотору, включающему сайты связывания транскрипционных факторов STAT3, STAT5 и AP-1 и минимальный промотор.

В некоторых вариантах осуществления изобретения индуцибельный промотор включает сайт связывания транскрипционного фактора STAT3, который представляет собой нуклеотидную последовательность, которую

выбирают из группы нуклеотидных последовательностей, которая включает SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3.

В некоторых вариантах осуществления изобретения индуцибельный промотор включает сайт связывания транскрипционного фактора STAT5, который представляет собой нуклеотидную последовательность, которую выбирают из группы нуклеотидных последовательностей, которая включает SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6.

В некоторых вариантах осуществления изобретения индуцибельный промотор включает сайт связывания транскрипционного фактора семейства AP-1, который представляет собой нуклеотидную последовательность, которую выбирают из группы нуклеотидных последовательностей, которая включает SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 9.

В некоторых вариантах осуществления изобретения индуцибельный промотор включает сайты связывания транскрипционных факторов STAT3, STAT5 и AP-1, которые располагаются от 5' конца к 3' концу один за другим в следующей последовательности STAT3-STAT5-AP-1.

В некоторых вариантах осуществления изобретения индуцибельный промотор включает сайты связывания транскрипционных факторов STAT3, STAT5 и AP-1, которые располагаются от 5' конца к 3' концу один за другим в следующей последовательности STAT3-STAT5-AP-1 и включают нуклеотидную последовательность, которую выбирают из группы нуклеотидных последовательностей, которая включает SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 или SEQ ID NO: 12.

В некоторых вариантах осуществления изобретения индуцибельный промотор включает сайты связывания транскрипционных факторов STAT3, STAT5 и AP-1, которые включают нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 13.

В некоторых вариантах осуществления изобретения индуцибельный промотор включает минимальный промотор, который включает ТАТА-последовательность.

В некоторых вариантах осуществления изобретения индуцибельный промотор включает минимальный промотор, который включает нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 14.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к индуцибельному экспрессионному вектору, включающему в направлении от 5'-конца к 3'-концу любой из вышеуказанных индуцибельных промоторов и репортерный ген.

В некоторых вариантах осуществления изобретения индуцибельный экспрессионный вектор включает репортерный ген, который представляет собой ген белка люциферазы светляка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения индуцибельный экспрессионный вектор включает ген белка люциферазы светляка, который включает нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 15.

В некоторых вариантах осуществления изобретения индуцибельный экспрессионный вектор включает нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 16.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к способу получения клетки-хозяина для анализа активности целевого белка, который включает трансформирование клетки любым из вышеуказанных индуцибельных экспрессионных векторов.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к клетке-хозяину для анализа активности целевого белка, которая содержит любой из вышеуказанных индуцибельных промоторов и репортерный ген.

В некоторых вариантах осуществления изобретения клетка-хозяин включает репортерный ген, который представляет собой ген белка люциферазы светляка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения клетка-хозяин включает ген белка люциферазы светляка, который включает нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 15.

В некоторых вариантах осуществления изобретения клетка-хозяин включает нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 16.

В некоторых вариантах осуществления изобретения клетка-хозяин используется для анализа активности целевого белка, где целевой белок представляет собой лиганд рецептора.

В некоторых вариантах осуществления изобретения клетка-хозяин используется для анализа активности целевого белка, где целевой белок представляет собой цитокин.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1 представляет собой схему генетической репортерной конструкции. Данная конструкция содержит нуклеотидную последовательность гена репортерного белка люциферазы светляка под контролем STAT3, STAT5, AP-1 зависимого промотора. Некодирующий регион включает минимальный промотор, состоящий из последовательности TATA-box (TATA-последовательность), на 5' конце которого размещён цис-регуляторный элемент, состоящий из чередующихся друг за другом сайтов связывания транскрипционных факторов STAT3, STAT5, AP-1 в трёх повторах как указано на схеме. Фланкирующие последовательности комплементарны участкам, окружающим экспрессионную кассету в составе целевого вектора, и содержат сайты узнавания для эндонуклеаз рестрикции Acc65I и BglII.

Фиг. 2 представляет собой карту репортерного плазмидного вектора E6.90_STAT3_STAT5_AP-1_FLuc, кодирующего ген люциферазы светляка под контролем STAT3, STAT5, AP-1 зависимого промотора.

AmpR – ген бета-лактамазы, обуславливает устойчивость к ампициллину, позволяет вести селекцию в клетках E.coli;

Поли-А – сигнал полиаденилирования, терминатор транскрипции;

STAT3-STAT5-AP-1 – регуляторный элемент, контролирующей экспрессию гена FLuc;

MinP – минимальный промотор, содержащий TATA-box;

FLuc – ген люциферазы светляка *Photinus pyralis* (firefly);

HygR – ген, обуславливающий устойчивость к гигромицину. Позволяет вести селекцию культуры клеток эукариот;

Промотор/энхансер SV40 – эукариотический промотор/энхансер вируса SV40.

Фиг. 3 представляет собой карту экспрессионного плазмидного вектора E4.244_IL10RA_PR, кодирующего ген IL10RA человека.

HS4 – инсулятор HS4;

pCMVe/EF1alpha – конститутивный гибридный промотор CMV/EF1alpha;

Kozak – последовательность Козак;

IL10RA – ген IL10RA человека;

Поли-А – сигнал полиаденилирования, терминатор транскрипции;

Энхансер SV40 – энхансер вируса SV40;

b-globin MAR – MAR-элемент (M5) гена b-globin человека;

Rep origin 1 – сайт начала репликации;

AmpR – ген бета-лактамазы, обуславливающий устойчивость к ампициллину. Позволяет вести селекцию культуры клеток *E.coli*;

F1 origin – ориджин репликации бактериофага f1;

Промотор SV40 – эукариотический промотор вируса SV40;

Puro R – эукариотическая устойчивость к пурамицину. Ген, обуславливающий устойчивость к пурамицину. Позволяет вести селекцию культуры клеток эукариот.

Фиг. 4 представляет собой карту экспрессионного плазмидного вектора E4.245_IL10RB_BR, кодирующего ген IL10RB человека.

HS4 – инсулятор HS4;

pCMVe/EF1alpha – конститутивный гибридный промотор CMV/EF1alpha;

Kozak – последовательность Козак;

IL10RA – ген IL10RA человека;

Поли-А – сигнал полиаденилирования, терминатор транскрипции;

Энхансер SV40 – энхансер вируса SV40;

b-globin MAR – MAR-элемент (M5) гена b-globin человека;

Rep origin 1 – сайт начала репликации;

AmpR – ген бета-лактамазы, обуславливающий устойчивость к ампициллину. Позволяет вести селекцию культуры клеток E.coli;

F1 origin – ориджин репликации бактериофага f1;

Промотор SV40 – эукариотический промотор вируса SV40;

Blasti R – эукариотическая устойчивость к Бластицидину. Ген, обуславливающий устойчивость к бластицидину. Позволяет вести селекцию культуры клеток эукариот.

Фиг. 5 представляет собой гистограмму, на которой показана кратность активации репортерных клеток HEK293 Nf-kB в ответ на разные дозы PMA.

Фиг. 6 представляет собой гистограмму, на которой показана кратность активации клональных линий репортера HEK293_STAT3-STAT5-AP1_FLuc в ответ на PMA в концентрации 33нМ.

A2, A4, A5, B1, B3, B5, B6, C4, C6, D1, D4, C4#2, B0>, B1>, B2>, B3> – названия различных клональных репортерных линий;

исходные – нетрансфицированные родительские клетки;

пул – популяция клеток после трансфекции.

В качестве контролей – пул и нетрансфицированные клетки.

Фиг. 7 представляет собой гистограмму, на которой показана кратность активации клональных линий репортера HEK293_STAT3-STAT5-AP1_FLuc, экспрессирующих IL10R, в ответ на IL10 100 нг/мл.

A1.2, A1.4, A1.5, A1.7, C1.1, C1.2, C1.6, C1.15, C1.11, C1.14, C1.16, A4_1, A4_3, A4_9, A4_10, C4_3, C4_12, C4_13, A5, A8, A9, A12, A15, A23, A31, C44, C4.4, C12, C16, C20, C27, C28, C29, C31, C33, C40, C41 – названия различных клональных линий репортера к IL10.

Фиг. 8 представляет собой график, иллюстрирующий дозозависимый ответ клеток HEK293-STAT3-STAT5-AP1_FLuc_IL10R на активацию IL10.

Фиг. 9 представляет собой график GAS6-зависимой активации пулов HEK293_STAT3-STAT5-AP1_FLuc_AXL, полученных на основе трех разных клонов (Cl. D1, cl. B3, cl. C4#2) репортерной клеточной линии HEK293_STAT3-STAT5-AP1_FLuc. GAS6 – активатор AXL-зависимого сигналинга в клетке.

Cl. D1, cl. B3, cl. C4#2 – клоны репортерной клеточной линии HEK293_STAT3-STAT5-AP1_FLuc.

Фиг. 10 представляет собой график зависимости активации репортерной клеточной линии HEK293_STAT3-STAT5-AP1_FLuc_AXL от концентрации различных препаратов GAS6.

Препарат GAS6#1, #2, #3 – три разных препарата Gas6.

Фиг. 11 представляет собой график зависимости активации репортерной клеточной линии HEK293_AXL_STAT3-STAT5-AP1 от времени инкубации клеток в присутствии GAS6.

Фиг. 12 представляет собой график зависимости пролиферации клеток DU145 от концентрации GAS6.

Фиг. 13–15 представляет собой графики GAS6-зависимой активации различных клонов (клон C2 на фигуре 13, клон H4 на фигуре 14, клон E8 на фигуре 15) DU145_STAT3-STAT5-AP1_FLuc.

Клоны C2, H4 и E8 – это клоны клеточной линии DU145_STAT3-STAT5-AP1, которая получена на основе клеточной линии DU145, природного экспрессора AXL с помощью конструкции, кодирующей люциферазу светляка под контролем STAT3-STAT5-AP1-промотора. Данные клоны показали наибольший ответ на обработку GAS6.

Фигура 16 представляет собой график GAS6-зависимой активации пула и отдельных клонов HEK293_AXL_STAT3-STAT5-AP1_FLuc.

Cl. 1, cl. 8, cl. 10, cl. 14 – клоны клеточной линии HEK293_AXL_STAT3-STAT5-API_FLuc, которые получены из пула HEK293_AXL_STAT3-STAT5-API_FLuc.

Пул – клеточная линия HEK293_AXL_STAT3-STAT5-API_FLuc, полученная на основе клеточной линии HEK293_AXL – оверэкспрессора AXL, в которую был встроен ген, кодирующий люциферазу светляка, под контролем STAT3-STAT5-API- зависимого промотора.

Фиг. 17 представляет собой график зависимости активации репортерной клеточной линии HEK293_AXL_STAT3-STAT5-API от числа клеток.

Определения и общие методы

Если иное не определено в настоящем документе, научные и технические термины, используемые в связи с настоящим изобретением, будут иметь значения, которые обычно понятны специалистам в данной области.

Кроме того, если по контексту не требуется иное, термины в единственном числе включают в себя термины во множественном числе, и термины во множественном числе включают в себя термины в единственном числе. Как правило, используемая классификация и методы культивирования клеток, молекулярной биологии, иммунологии, микробиологии, генетики, аналитической химии, химии органического синтеза, медицинской и фармацевтической химии, а также гибридизации и химии белка и нуклеиновых кислот, описанные в настоящем документе, хорошо известны специалистам и широко применяются в данной области. Ферментативные реакции и способы очистки осуществляют в соответствии с инструкциями производителя, как это обычно осуществляется в данной области, или как описано в настоящем документе.

Термины «нуклеиновая кислота», «нуклеиновая последовательность» или «нуклеиновокислотная последовательность», «полинуклеотид», «олигонуклеотид», «полинуклеотидная последовательность» и «нуклеотидная

последовательность», которые используются равнозначно в данном описании, обозначают четкую последовательность нуклеотидов, модифицированных или не модифицированных, определяющую фрагмент или участок нуклеиновой кислоты, содержащую или не содержащую неприродные нуклеотиды и являющуюся либо двухцепочечной ДНК или РНК, либо одноцепочечной ДНК или РНК, либо продуктами транскрипции указанных ДНК.

Как применяют в настоящем описании, полинуклеотиды включают, в качестве неограничивающих примеров, все последовательности нуклеиновой кислоты, получаемые любыми способами, доступными в этой области, включая, в качестве неограничивающих примеров, рекомбинантные способы, т. е. клонирование последовательностей нуклеиновой кислоты из рекомбинантной библиотеки или генома клетки, использование обычной технологии клонирования и ПЦР и т. п., и способами синтеза.

Здесь также следует упомянуть, что данное изобретение не относится к нуклеотидным последовательностям в их природной хромосомной среде, т. е. в природном состоянии. Последовательности данного изобретения были выделены и/или очищены, т. е. были взяты прямо или косвенно, например, путем копирования, при этом их среда была по меньшей мере частично модифицирована. Таким образом, также здесь следует подразумевать изолированные нуклеиновые кислоты, полученные путем генетической рекомбинации, например, с помощью принимающих клеток (клеток-хозяев), или полученные путем химического синтеза.

Термин нуклеотидная последовательность охватывает его комплемент, если не указано иное. Таким образом, нуклеиновую кислоту, имеющую определенную последовательность следует понимать как охватывающие ее комплементарную цепь с ее комплементарной последовательностью.

Термин «вектор» при использовании в настоящем документе означает молекулу нуклеиновой кислоты, способную транспортировать другую нуклеиновую кислоту, с которой она соединена.

Как применяют в настоящем описании, термин «экспрессия» определяют как транскрипцию и/или трансляцию конкретной нуклеотидной последовательности, запускаемую ее промотором.

Подробное описание изобретения

Индукцибельный промотор

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к индукцибельному промотору, включающему сайты связывания транскрипционных факторов STAT3, STAT5 и AP-1 и минимальный промотор.

Индукцибельный промотор по изобретению является универсальным для использования в репортерных клеточных системах для определения активновости лигандов рецепторов, например, цитокинов.

Под индукцибельным промотором понимается промотор, который обеспечивает экспрессию генов в ответ на специфический сигнал.

Авторы изобретения неожиданно установили, что наличие в индукцибельном промоторе сайтов связывания транскрипционных факторов STAT3, STAT5 и AP-1 позволяет определять уровень экспрессии репортерного гена в ответ на специфический сигнал, который получается от взаимодействия лиганда с его рецептором, при этом лиганд рецептора может быть выбран из множества цитокинов и других лигандов рецептора, которое включает: IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-13, IL-15, IL-21, GM-CSF, IL-3, IL-5, IL-6, IL-11, IL-12, IL-27, LIF, OSM, CNTF, CT-1, CLC, NP, лептин, NNT-1/BSF-3, IFN- α , IFN- β , IFN- γ , IL-23, IL-10, IL-20, IL-22, IL-28, IL-29, IL-19, IL-24, IL-26, IL37, IL18, M-CSF, CSF1, G-CSF, CSF 3, IL-31, IL-35, гормон роста, пролактин, THPO, MGDF, EPO, TSLP, TNFSF18, IL-1, IL-17, TNF, TNF- α , RANKL (OPGL/TRANCE), TRAIL, VEGI, CD153 (CD30L), CD154 (CD40L), CD70 (CD27L), TNF-C, CD70, 4-1BB лиганд или GAS6, что делает данный индукцибельный промотор универсальным для использования в репортерных

клеточных системах для определения активновности лигандов к рецептору, например, цитокинов.

Сайт связывания транскрипционного фактора STAT3 включает коровую часть, которая представляет собой TTCnnnGAA.

В некоторых вариантах осуществления изобретения индуцибельный промотор включает сайт связывания транскрипционного фактора STAT3, который представляет собой нуклеотидную последовательность, которую выбирают из группы нуклеотидных последовательностей, которая включает SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3.

Сайт связывания транскрипционного фактора STAT5 включает коровую часть, которая представляет собой TTCnnnGAA.

В некоторых вариантах осуществления изобретения индуцибельный промотор включает сайт связывания транскрипционного фактора STAT5, который представляет собой нуклеотидную последовательность, которую выбирают из группы нуклеотидных последовательностей, которая включает SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6.

Сайт связывания транскрипционного фактора AP-1 включает коровую часть, которая представляет собой T[G/T]A[C/G]TCA.

В некоторых вариантах осуществления изобретения индуцибельный промотор включает сайт связывания транскрипционного фактора семейства AP-1, который представляет собой нуклеотидную последовательность, которую выбирают из группы нуклеотидных последовательностей, которая включает SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 9.

В некоторых вариантах осуществления изобретения индуцибельный промотор включает сайты связывания транскрипционных факторов STAT3, STAT5 и AP-1, которые располагаются от 5' конца к 3' концу один за другим в следующей последовательности STAT3-STAT5-AP-1.

В некоторых вариантах осуществления изобретения индуцибельный промотор включает сайты связывания транскрипционных факторов STAT3, STAT5 и AP-1, которые располагаются от 5' конца к 3' концу один за другим

в следующей последовательности STAT3-STAT5-AP-1, где STAT3-STAT5-AP-1 представлен в 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40 или более повторах. Максимальное количество повторов STAT3-STAT5-AP-1 ограничивается емкостью экспрессионного вектора. Количество повторов STAT3-STAT5-AP-1 не влияет на работоспособность индуцибельного промотора по изобретению.

В некоторых вариантах осуществления изобретения индуцибельный промотор включает сайты связывания транскрипционных факторов STAT3, STAT5 и AP-1, которые располагаются от 5' конца к 3' концу один за другим в следующей последовательности STAT3-STAT5-AP-1 и включают нуклеотидную последовательность, которую выбирают из группы нуклеотидных последовательностей, которая включает SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 или SEQ ID NO: 12.

В некоторых вариантах осуществления изобретения индуцибельный промотор включает сайты связывания транскрипционных факторов STAT3, STAT5 и AP-1, которые включают нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 13.

В некоторых вариантах осуществления изобретения индуцибельный промотор включает минимальный промотор, который включает ТАТА-последовательность (ТАТА-box).

Под минимальным промотором подразумевается наименьший по составу регуляторных элементов промотор, содержащий ТАТА-последовательность (ТАТА-box, Хогнесса бокс, ТАТА-бокс) и место начала транскрипции, который не функционирует без добавления перед ним специальных регуляторных элементов.

В некоторых вариантах осуществления изобретения индуцибельный промотор включает минимальный промотор, который включает нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 14.

Индукцибельный экспрессионный вектор

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к индуцибельному экспрессионному вектору, включающему в направлении от 5'-конца к 3'-концу любой из вышеуказанных индуцибельных промоторов и репортерный ген.

Индукцибельный экспрессионный вектор по изобретению является универсальным для получения репортерных клеточных систем для определения активновости лиганда к его рецептору, например, цитокина.

Индукцибельный экспрессионный вектор представляет собой рекомбинантный вектор.

В некоторых вариантах осуществления изобретения индуцибельный экспрессионный вектор включает репортерный ген, который представляет собой ген белка люциферазы.

В некоторых вариантах осуществления изобретения индуцибельный экспрессионный вектор включает репортерный ген, который представляет собой ген белка люциферазы светляка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения индуцибельный экспрессионный вектор включает ген белка люциферазы светляка, который включает нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 15.

В некоторых вариантах осуществления изобретения индуцибельный экспрессионный вектор включает нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 16.

В некоторых вариантах осуществления изобретения индуцибельный экспрессионный вектор включает репортерный ген, который представляет собой ген, кодирующий зеленый флуоресцентный белок (GFP), или ген красного флуоресцентного белка (DsRed) или ген LacZ, кодирующий фермент бета-галактозидазу, или любой другой ген, кодирующий флуоресцентные или люминесцентные белки, которые могут быть использованы в качестве репортерного гена.

В некоторых вариантах осуществления изобретения индуцибельный экспрессионный вектор включает гетерологичную последовательность нуклеиновой кислоты, содержащую регуляторные последовательности, которые обеспечивают экспрессию гена репортерного полипептида.

Под «регуляторными последовательностями, которые обеспечивают экспрессию продукта, кодируемого гетерологичной последовательностью нуклеиновой кислоты, в целевых клетках» подразумевается в рамках данного изобретения полинуклеотидные последовательности, которые необходимы для воздействия на экспрессию и процессинг кодирующих последовательностей, к которым они клонированы. Регулирующие экспрессию последовательности включают соответствующие последовательности инициации транскрипции, терминации, индуцибельного промотора и энхансера; эффективные сигналы процессинга РНК, такие как сплайсинг и сигналы полиаденилирования; последовательности, которые стабилизируют цитоплазматическую мРНК; последовательности, которые повышают эффективность трансляции (т.е. консенсусная последовательность Козака); последовательности, которые повышают стабильность белка; и, при желании, последовательности, которые усиливают секрецию белка. Характер таких регулирующих последовательностей различается в зависимости от организма-хозяина; в прокариотах такие контролирующие последовательности, как правило, включают промотор, сайт связывания рибосомы, а также последовательности терминации транскрипции; в эукариотах, как правило, такие контролирующие последовательности включают промоторы и последовательности терминации транскрипции. Термин «регуляторные последовательности» включает, как минимум, все компоненты, наличие которых имеет важное значение для экспрессии и процессинга.

Термины «энхансеры» или «энхансер», используемые в изобретении, могут относиться к последовательности ДНК, которая расположена как смежная с последовательностью ДНК, кодирующей рекомбинантный продукт.

Энхансерные элементы обычно расположены в 5'-направлении от промоторного элемента или могут быть расположены ниже или в пределах кодирующей последовательности ДНК (например, последовательности ДНК, транскрибированной или транслированной в рекомбинантный продукт или продукты). Таким образом, энхансерный элемент может быть расположен на расстоянии 100 пар оснований, 200 пар оснований или 300 или больше пар оснований перед последовательностью ДНК, которая кодирует рекомбинантный продукт, или после этой последовательности. Энхансерные элементы могут увеличивать количество экспрессируемого рекомбинантного продукта от последовательности ДНК, превышая экспрессию, обусловленную одиночным промоторным элементом. Специалистам в данной области техники доступно множество энхансерных элементов.

В некоторых вариантах осуществления изобретения универсальный индуцибельный экспрессионный вектор может быть использован для создания клетки-хозяина, которая используется как универсальная репортерная клеточная линия для анализа активности множества различных лигандов рецептора, которые, например, представляют собой IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-13, IL-15, IL-21, GM-CSF, IL-3, IL-5, IL-6, IL-11, IL-12, IL-27, LIF, OSM, CNTF, CT-1, CLC, NP, лептин, NNT-1/BSF-3, IFN- α , IFN- β , IFN- γ , IL-23, IL-10, IL-20, IL-22, IL-28, IL-29, IL-19, IL-24, IL-26, IL37, IL18, M-CSF, CSF1, G-CSF, CSF 3, IL-31, IL-35, гормон роста, пролактин, THPO, MGDF, EPO, TSLP, TNFSF18, IL-1, IL-17, TNF, TNF- α , RANKL (OPGL/TRANCE), TRAIL, VEGI, CD153 (CD30L), CD154 (CD40L), CD70 (CD27L), TNF-C, CD70, 4-1BB лиганд или GAS6.

Клетка-хозяин и способ ее получения

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к способу получения клетки-хозяина для анализа активности целевого белка, который включает трансформирование клетки любым из вышеуказанных индуцибельных экспрессионных векторов.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к клетке-хозяину для анализа активности целевого белка, которая содержит любой из вышеуказанных индуцибельных промоторов и репортерный ген.

Из-за особенностей вышеуказанных индуцибельных промоторов по изобретению клетка-хозяин по изобретению может быть использована для анализа активности множества различных лигандов рецептора, которые, например, представляют собой IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-13, IL-15, IL-21, GM-CSF, IL-3, IL-5, IL-6, IL-11, IL-12, IL-27, LIF, OSM, CNTF, CT-1, CLC, NP, лептина, NNT-1/BSF-3, IFN- α , IFN- β , IFN- γ , IL-23, IL-10, IL-20, IL-22, IL-28, IL-29, IL-19, IL-24, IL-26, IL37, IL18, M-CSF, CSF1, G-CSF, CSF 3, IL-31, IL-35, гормон роста, пролактин, THPO, MGDF, EPO, TSLP, TNFSF18, IL-1, IL-17, TNF, TNF- α , RANKL (OPGL/TRANSE), TRAIL, VEGI, CD153 (CD30L), CD154 (CD40L), CD70 (CD27L), TNF-C, CD70, 4-1BB лиганд или GAS6.

Клетка-хозяин по изобретению является рекомбинантной клеткой-хозяином.

В некоторых вариантах осуществления изобретения клетка-хозяин включает репортерный ген, который представляет собой ген белка люциферазы.

В некоторых вариантах осуществления изобретения клетка-хозяин включает репортерный ген, который представляет собой ген белка люциферазы светляка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения клетка-хозяин включает ген белка люциферазы светляка, который включает нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 15.

В некоторых вариантах осуществления изобретения клетка-хозяин включает нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 16.

В некоторых вариантах осуществления изобретения клетка-хозяин включает репортерный ген, который представляет собой ген, кодирующий зеленый флуоресцентный белок (GFP), или ген красного флуоресцентного белка (DsRed) или ген LacZ, кодирующий фермент бета-галактозидазу, или

любой другой ген, кодирующий флуоресцентные или люминесцентные белки, которые могут быть использованы в качестве репортерного гена.

В некоторых вариантах осуществления изобретения клетка-хозяин используется для анализа активности целевого белка, где целевой белок представляет собой лиганд рецептора.

В некоторых вариантах осуществления изобретения клетка-хозяин используется для анализа активности целевого белка, где целевой белок представляет собой цитокин.

В некоторых вариантах осуществления изобретения клетка-хозяин представляет собой эукариотическую клетку.

В некоторых вариантах осуществления изобретения клетка-хозяин представляет собой клетку млекопитающего.

Клеточные линии млекопитающих, используемые в качестве хозяев для трансформации, хорошо известны в данной области и включают множество иммортализованных доступных клеточных линий. К ним относятся, например, клетки яичников китайского хомячка (CHO), NS0 клетки, клетки SP2, HEK-293T клетки, 293 Фристайл клетки (Invitrogen), NIH-3T3 клетки, клетки HeLa, клетки почек хомячка (BHK), клетки почек африканских зеленых мартышек (COS), клетки гепатоцеллюлярной карциномы человека (например, Hep G2), A549 клетки и ряд других клеточных линий. Клеточные линии выбираются путем определения, какие клеточные линии имеют высокие уровни экспрессии и обеспечивают необходимые характеристики продуцируемого белка. Другими клеточными линиями, которые могут быть использованы, являются клеточные линии насекомых, такие как Sf9 или Sf21 клетки. Клетки-хозяева растений, например, включают *Nicotiana*, *Arabidopsis*, яска, кукурузу, пшеницу, картофель и т. д. Клетки бактерий хозяина включают виды *Escherichia* и *Streptomyces*. Дрожжевые клетки-хозяева включают *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces cerevisiae* и *Pichia pastoris*.

Вышеуказанная клетка-хозяин по изобретению не относится к клетке-хозяину, полученной с использованием человеческих эмбрионов.

Вышеуказанная клетка-хозяин по изобретению не относится к клетке-хозяину, полученной с модификации генетической целостности клеток зародышевой линии человека.

Примеры

Для наилучшего понимания изобретения приводятся следующие примеры. Эти примеры приведены только в иллюстративных целях и не должны толковаться как ограничивающие сферу применения изобретения в любой форме.

Все публикации, патенты и патентные заявки, указанные в этой спецификации включены в данный документ путем отсылки. Хотя вышеупомянутое изобретение было подробно описано путем иллюстрации и примера в целях исключения двусмысленного толкования, специалистам в данной области на основе идей, раскрытых в данном изобретении, будет вполне понятно, что могут быть внесены определенные изменения и модификации без отклонения от сущности и объема прилагаемых вариантов осуществления изобретения.

Материалы и общие методы

Методы рекомбинантной ДНК

Для манипуляций с ДНК использовали стандартные методы, описанные у Sambrook J. и др., *Molecular cloning: A laboratory manual*; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989. Реагенты для молекулярной биологии использовали согласно инструкциям производителей.

Синтез генов

Требуемые сегменты генов получали из олигонуклеотидов, созданных путем химического синтеза. Генные сегменты длиной от 300 до 1400 п.н., которые фланкированы уникальными сайтами рестрикции, собирали путем

отжига и лигирования олигонуклеотидов, включая ПЦР-амплификацию и последующее клонирование через сайты рестрикции. Последовательности ДНК субклонированных генных фрагментов подтверждали путем секвенирования ДНК.

Определение последовательностей ДНК

Последовательности ДНК определяли путем секвенирования по Сенгеру.

Анализ последовательностей ДНК и обработка данных о последовательностях

Применяли пакет программ фирмы Unipro UGENE версия 1.29 и SnapGene Viewer для создания, картирования, анализа, аннотирования и иллюстрации последовательностей.

Экспрессионные векторы

Векторы содержащие репортерный ген, описанные в материалах заявки помимо репортерной конструкции содержали: сайт инициации репликации, обеспечивающий репликацию указанной плазмиды в *E.coli*, ген, придающий устойчивость *E.coli* к селективному антибиотику (ампициллину).

Сборку генетических конструкций вектора, как указано ниже, осуществляли с помощью ПЦР и/или синтеза и сборки генов с использованием известных методов и процедур рекомбинации путем соединения соответствующих сегментов нуклеиновых кислот, например, с использованием уникальных сайтов рестрикции в соответствующих векторах. Субклонированные нуклеотидные последовательности подтверждали секвенированием ДНК. Для кратковременных трансфекций создавали большие количества плазмид посредством получения плазмид из трансформированных культур *E.coli*.

Пример 1. Получение репортерного плазмидного вектора, кодирующего ген люциферазы светляка под контролем STAT3-STAT5-AP-1 чувствительного промотора.

Для создания универсальной репортерной конструкции были выбраны транскрипционные факторы STAT3, STAT5, AP-1, опосредующие действие большого числа разнообразных сигнальных молекул.

Был создан регуляторный элемент, включающий минимальный промотор, состоящий из последовательности TATA-box, на 5' которого разместили сайты связывания для транскрипционных факторов STAT3, STAT5, AP-1 (doi:10.1128/JVI.01713-10; doi:10.1074/jbc.M001748200) в трёх повторах (Фиг. 1). Такая комбинация сайтов связывания факторов транскрипции позволяет получить индуцибельный промотор широкого спектра применения.

Для сборки массива были синтезированы шесть частично комплементарных олигонуклеотидов длиной 60 п.о., с перекрытием в 20 п.о. Сборку проводили методом синтеза из олигонуклеотидов, в результате получили фрагмент длиной 249 п.о., фланкированный участками, комплементарными плазмидному вектору. Полученная последовательность клонирована в составе вектора E6.90 методом безлигазного клонирования (Фиг. 2). Клонированные нуклеотидные последовательности подтверждали секвенированием ДНК.

Пример 2. Получение плазмидных векторов, кодирующих субъединицы рецептора IL-10 для создания стабильной клеточной линии-экспрессора.

Для оценки репортерной линии в специфичном клеточном тесте мы экспрессировали на поверхности репортерных клеток рецептор IL-10.

Для наработки нативных последовательностей гена человеческого IL-10Ra (<https://www.uniprot.org/uniprot/Q13651>) и человеческого IL-10Rb (<https://www.uniprot.org/uniprot/Q08334>) из мононуклеарных клеток периферической крови донора была выделена тотальная РНК, на основе

которой синтезирована кДНК. Полученная библиотека кДНК была использована в качестве матрицы для амплификации методом ПЦР целевых последовательностей, фланкированных сайтами рестрикции. Клонирование целевых генов в составе экспрессионных векторов осуществлено методом рестрикции-лигирования (Фиг. 3, Фиг. 4). Клонированные нуклеотидные последовательности подтверждали секвенированием ДНК.

Пример 3. Активация HEK293 Nf-kB.

Для скрининга клональных репортерных линий мы использовали активатор РМА. Данный агент напрямую воздействует на протеинкиназу С, таким образом запуская сигнальные каскады, активирующие экспрессию репортерного гена (<https://doi.org/10.1007/s11373-005-1210-5>; doi: 10.1093/carcin/bgm261). Для определения оптимальной дозы РМА мы провели эксперименты с активацией репортерной линии HEK293 Nf-kB. Клетки засевали в белом культуральном 96-луночном планшете для работы с адгезионными культурами в количестве 3×10^5 клеток на лунку и добавляли активатор РМА в концентрациях, указанных на графике до объёма 150 мкл в лунке. Все растворы готовили в ростовой среде DMEM с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки, 2 mM L-глутамина и 10 мкг/мл гентамицина. Планшет инкубировали в течение 24 ч при 37°C во влажной атмосфере в присутствии 5% CO₂. По окончании инкубации лунки осушали и добавляли 100 мкл субстрата люциферина с лизирующим компонентом, оставляли планшет в темноте на 10 минут, после чего детектировали уровень люминесценции на планшетном ридере с использованием программного пакета SparkControl V2.1 (Tecan, Австрия).

Таким образом была подобрана оптимальная концентрация активатора РМА 33нМ (Фиг. 5).

Пример 4. Получение стабильной клеточной линии репортера.

Важными показателями для репортерной клеточной линии является кратность активации в ответ на исследуемую молекулу, а также уровень фоновой активации.

Для получения стабильной клеточной линии репортера использовали клеточную линию HEK293 (ATCC CRL-1573, США), которую трансфецировали плазмидным вектором, содержащим репортерную конструкцию из примера 1. Полученный стабильный пул клонировали методом лимитирующих разведений. Для скрининга клональных линий HEK293_STAT3-STAT5-AP1_FLuc проводили тест на активацию экспрессии люциферазы. Клетки засевали в 96-луночные планшеты в количестве 1×10^5 клеток на лунку и добавляли активатор РМА 33 нМ до конечного объема 150 мкл в лунке. Все растворы готовили в ростовой среде DMEM с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки, 2 mM L-глутамин и 10 мкг/мл гентамицина. Планшет инкубировали в течение 24 ч при 37°C во влажной атмосфере в присутствии 5% CO₂. По окончании инкубации лунки осушали и добавляли 100 мкл субстрата люциферина с лизирующим компонентом, оставляли планшет в темноте на 10 минут, после чего детектировали уровень люминесценции на планшетном ридере с использованием программного пакета SparkControl V2.1 (Tecan, Австрия).

Таким образом была получена репортерная клеточная линия, показывающая высокую кратность активации и низкий уровень фоновой активации (Фиг. 6).

Пример 5. Получение репортерной линии, специфичной к IL10.

Для оценки репортерной линии в специфичном клеточном тесте мы экспрессировали на поверхности репортерных клеток рецептор IL-10. Для этого клеточную линию репортера HEK293_STAT3-STAT5-AP1_FLuc, полученную в примере 4 трансфецировали плазмидными векторами, кодирующими субъединицы рецептора IL-10, полученными в примере 2. Для скрининга клональных линий репортера, экспрессирующих рецептор IL10 проводили тест на активацию экспрессии люциферазы, описанный в примере

3. В качестве активатора использовали IL10 рекомбинантный человеческий в концентрации 100 нг/мл.

В результате скрининга и отбора клонов по кратности активации была получена репортерная линия на основе универсальной линии, специфичная к IL10 (Фиг. 7).

Пример 6. Тест на определение активности IL10

Репортерные линии применяют для оценки активности кандидатов лекарственного препарата. Мы провели тест на активацию экспрессии люциферазы в ответ на различные концентрации активатора IL10, указанные на графике. Постановка теста описана в примере 3.

В итоге мы наблюдали дозозависимый ответ репортерной клеточной линии на специфичный активатор (Фиг. 8).

Пример 7. Создание репортерной клеточной линии HEK293_STAT3-STAT5-AP1_FLuc_AXL для оценки AXL-опосредованной активации препаратом Gas6 STAT3-STAT5-AP1 внутриклеточного сигналинга на основе универсальной репортерной клеточной линии HEK293_STAT3-STAT5-AP1_FLuc.

Для создания репортерной клеточной линии HEK293_STAT3-STAT5-AP1_FLuc_AXL использовали три клон универсальной репортерной клеточной линии HEK293_STAT3-STAT5-AP1_FLuc: cl. D1, cl. B3 и cl. C4#2, на основе которых получили, соответственно, 3 пула клеток с внедренным конституционно-экспрессируемым геном рецептора AXL. AXL-опосредованную активацию этих пулов проверили в тесте. Тест проводили в культуральном 96-луночном планшете для работы с люминесценцией. Суспензия в каждой лунке содержала 30000 клеток HEK293_STAT3-STAT5-AP1_FLuc_AXL и AXL-лиганд GAS6 в концентрациях, указанных на Фиг. 9. Конечный объем клеточной суспензии в лунке составлял 100 мкл, все компоненты суспензии готовили в среде DMEM, не содержащей

эмбриональную бычью сыворотку. После добавления всех компонентов планшет инкубировали в течение 16 ч при 37°C, 5% CO₂ и далее, с помощью набора для оценки люминесценции, определяли интенсивность люминесценции в лунках. Измерение проводили при помощи планшетного ридера. Величину активации рассчитывали, как отношение величины люминесценции для данного пула в присутствии GAS6 к величине люминесценции в отсутствии GAS6.

Пример 8. Тестирование различных препаратов GAS6 на AXL-опосредованную активацию STAT3-STAT5-AP1 на репортерной клеточной линии HEK293_STAT3-STAT5-AP1_FLuc_AXL.

Тест ставили аналогично процедуре, описанной в Примере 7 (в присутствии GAS6 в концентрации 2 мкг/мл), для активации использовали HEK293_STAT3-STAT5-AP1_FLuc_AXL (пул, полученный на основе клеточной линии HEK293_STAT3-STAT5-AP1_FLuc : cl. D1, см. Пример 7) и различные препараты GAS6 в указанной на графике концентрации (Фиг.10).

Пример 9. Анализ AXL-опосредованной активации клонов HEK293_STAT3-STAT5-AP1_FLuc_AXL.

Из пулов, полученных на основе клеточных линий HEK293_STAT3-STAT5-AP1_FLuc: cl. D1, cl. B3 и cl. C4#2 (см. Пример 7) отобрали отдельные клоны, показавшие GAS6-зависимую активацию в тесте (проводился аналогично тесту в Примере 7 в присутствии GAS6 в концентрации 2 мкг/мл). Клоны, показавшие наибольшую активацию, были отобраны из клеточного пула, полученного на основе cl. D1. Величины активации в одном из 96-луночных планшетов с различными клонами данного пула и самим исходным пулом представлен в таблице 1, активации указаны относительно не активированных клеток, лунка H11- соответствует пулу. Серым цветом отмечена лунка, соответствующая клону HEK293_STAT3-STAT5-AP1_FLuc_AXL (cl.13), который был использован для дальнейшей работы.

Таблица 1. Величины GAS6-зависимой активации пула и отдельных клонов HEK293_STAT3-STAT5-AP1_FLuc_AXL

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1,35	1,59	8,66	1,09	1,60	1,49	2,16	0,85	0,96	6,93	1,54	1,00
B	1,09	2,12	1,33	1,28	1,50	0,99	1,12	2,10	1,26	1,58	2,56	1,40
C	0,92	1,32	0,95	1,20	1,20	4,37	1,00	1,04	1,77	3,15	5,55	1,47
D	1,25	1,29	2,38	2,41	2,63	1,32	1,16	2,12	1,55	1,68	3,74	1,23
E	1,83	0,93	3,03	1,18	1,73	1,51	2,14	1,13	1,74	1,55	0,86	1,03
F	1,55	1,34	7,48	1,79	1,69	1,60	2,89	1,58	1,53	1,35	1,29	5,65
G	2,05	3,08	2,51	1,05	1,55	2,00	2,12	2,51	1,78	2,50	2,26	3,43
H											3,61	1,94

Пример 10. Исследование зависимости активации репортерной клеточной линии HEK293_STAT3-STAT5-AP1_FLuc_AXL от времени инкубации в присутствии препарата GAS6.

Тест ставили аналогично процедуре, описанной в Пример 7, для активации использовали клетки репортерной линии HEK293_STAT3-STAT5-AP1_FLuc_AXL (cl.13) и GAS6 в концентрации 2 мкг/мл (Фиг. 11); после добавления всех компонентов планшет инкубировали в течение указанного на графике времени, далее определяли интенсивность люминесценции в лунках. Величину активации рассчитывали, как отношение величины люминесценции в присутствии указанной концентрации GAS6 к величине люминесценции в отсутствии GAS6 варианта с таким же временем инкубации. Наибольшая активация наблюдалась при 24 часовой инкубации.

Пример 11. Создание репортерной клеточной линии на основе природной клеточной линии Du145 для оценки AXL-опосредованной активации STAT3-STAT5-AP1 внутриклеточного сигналинга.

Для теста на проверку активации пролиферации клеток линию Du145 лигандом AXL GAS6 (Фиг. 12) использовали клеточную линию Du145, являющуюся природным экспрессором AXL. Тест проводили в культуральном 96-луночном планшете для работы с адгезионными культурами. Суспензия в

каждой лунке содержала 5 000 клеток Du145 и AXL-лиганд GAS6 в указанной на графике концентрации. Конечный объем клеточной суспензии в лунке составлял 100 мкл, все компоненты суспензии готовили в среде DMEM, содержащей 0,3% эмбриональной бычьей сыворотки. После добавления всех компонентов планшет инкубировали в течение 72 ч при 37°C, 5% CO₂ и далее в каждую лунку вносили по 10 мкл реактива аламар синий, после чего планшет встряхивали на орбитальном шейкере и далее инкубировали при 37°C, 5% CO₂ в течение 6 ч. Величину флуоресценции оценивали при длине волны возбуждения 544 нм, длине волны испускания – 590 нм, используя планшетный ридер.

Для создания на основе клеточной линии - природного экспрессора AXL, репортерной клеточной линии, чувствительной к GAS6-зависимой активации AXL сигналинга, получили стабильные клоны клеток линии Du145, содержащие ген STAT3-STAT5-AP1_FLuc, кодирующий люциферазу светляка под контролем STAT3-STAT5-AP1-промотора.

Отобрали клоны, показавшие активацию в тесте (Фиг. 13-15). Тест проводили в 96-луночном планшете для ИФА. За сутки до эксперимента иммобилизовали AXL-лиганд GAS6 на пластик: готовили раствор GAS6 в концентрации 5 мкг/мл в DPBS и вносили в лунки планшета по 100 мкл. Планшет инкубировали в течение 16 ч при 37°C, 5% CO₂. Далее вносили суспензию, которая содержала 50 000 клеток Du145_STAT3-STAT5-AP1_FLuc. Конечный объем клеточной суспензии в лунке составлял 100 мкл. После добавления клеточной суспензии планшет инкубировали в течение 16 ч при 37°C, 5% CO₂ и далее, с помощью набора для оценки люминесценции, определяли интенсивность люминесценции в лунках. Измерение проводили при помощи планшетного ридера.

Пример 12. Создание репортерной клеточной линии HEK293_AXL_STAT3-STAT5-AP1_FLuc на основе оверэксперссирующей

AXL клеточной линии HEK-293-AXL для оценки AXL-опосредованной активации STAT3-STAT5-AP1 внутриклеточного сигналинга.

Для создания репортерной клеточной линии HEK293_AXL_STAT3-STAT5-AP1_FLuc использовали клеточную линию HEK293_AXL – оверэкспрессор AXL, на основе которой получили пул клеток, содержащих ген, кодирующий люцифразу светляка под контролем STAT3-STAT5-AP1-промотора. Далее из этого пула отобрали отдельные клоны, показавшие активацию в тесте (Фиг. 16). Тест проводили аналогично процедуре, описанной в Пример 7 при концентрации GAS6 2 мкг/мл. Величину активации рассчитывали, как отношение величины люминесценции для данного клона в присутствии GAS6 к величине люминесценции в отсутствии GAS6.

Пример 13. Исследование зависимости активации репортерной клеточной линии HEK293_AXL_STAT3-STAT5-AP1 от числа клеток.

Тест ставили аналогично процедуре, описанной в Пример 7 при концентрации GAS6 2 мкг/мл, для активации использовали клетки репортерной линии HEK293_AXL_STAT3-STAT5-AP1 в указанном на графике (Фиг. 17) числе клеток на лунку 96-луночного планшета. Наибольшая активация наблюдалась, когда в лунке содержалось 25–50 тысяч клеток репортерной линии.

Формула изобретения

1. Индуцибельный промотор, включающий сайты связывания транскрипционных факторов STAT3, STAT5 и AP-1 и минимальный промотор.

2. Индуцибельный промотор по п.1, где сайт связывания транскрипционного фактора STAT3 представляет собой нуклеотидную последовательность, которую выбирают из группы нуклеотидных последовательностей, которая включает SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3.

3. Индуцибельный промотор по п.1, где сайт связывания транскрипционного фактора STAT5 представляет собой нуклеотидную последовательность, которую выбирают из группы нуклеотидных последовательностей, которая включает SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6.

4. Индуцибельный промотор по п.1, где сайт связывания транскрипционного фактора семейства AP-1 представляет собой нуклеотидную последовательность, которую выбирают из группы нуклеотидных последовательностей, которая включает SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 9.

5. Индуцибельный промотор по п.1, где сайты связывания транскрипционных факторов STAT3, STAT5 и AP-1 располагаются от 5' конца к 3' концу один за другим в следующей последовательности STAT3-STAT5-AP-1.

6. Индуцибельный промотор по п.5, где сайты связывания транскрипционных факторов STAT3, STAT5 и AP-1 располагаются от 5' конца к 3' концу один за другим в следующей последовательности STAT3-STAT5-AP-1 и включают нуклеотидную последовательность, которую выбирают из группы нуклеотидных последовательностей, которая включает SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 или SEQ ID NO: 12.

7. Индуцибельный промотор по п.1, где сайты связывания транскрипционных факторов STAT3, STAT5 и AP-1 включают нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 13.

8. Индуцибельный промотор по п.1, где минимальный промотор включает ТАТА-последовательность.

9. Индуцибельный промотор по п.1, где минимальный промотор включает нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 14.

10. Индуцибельный экспрессионный вектор, включающий в направлении от 5'-конца к 3'-концу индуцибельный промотор по любому из пп. 1–9 и репортерный ген.

11. Индуцибельный экспрессионный вектор по п. 10, где репортерный ген представляет собой ген белка люциферазы светляка.

12. Индуцибельный экспрессионный вектор по п. 11, где ген белка люциферазы светляка включает нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 15.

13. Индуцибельный экспрессионный вектор по п. 10, который включает нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 16.

14. Способ получения клетки-хозяина для анализа активности целевого белка, включающий трансформирование клетки индуцибельным экспрессионным вектором по любому из пп. 10–13.

15. Клетка-хозяин для анализа активности целевого белка, содержащая индуцибельный промотор по любому из пп. 1–9 и репортерный ген.

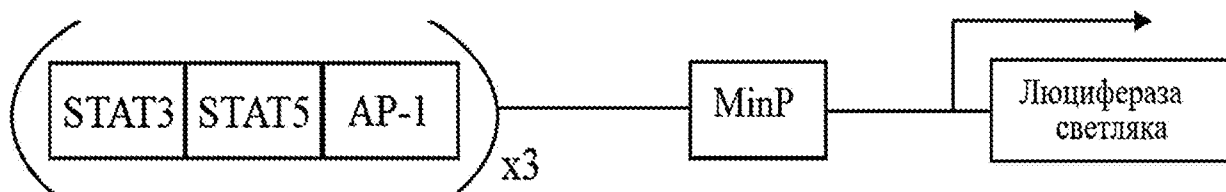
16. Клетка-хозяин по п. 15, где репортерный ген представляет собой ген белка люциферазы светляка.

17. Клетка-хозяин по п. 16, где ген белка люциферазы светляка включает нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 15.

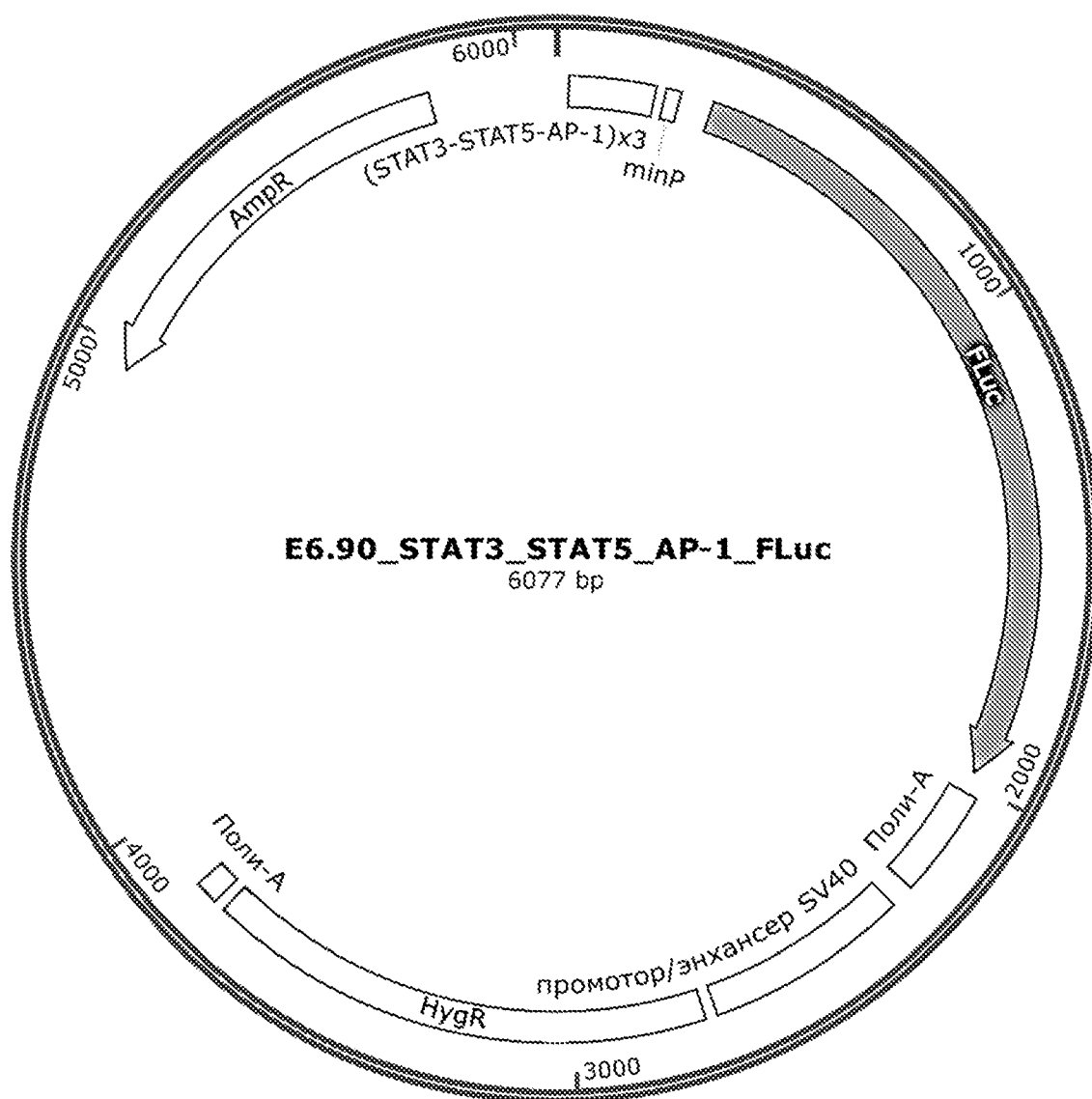
18. Клетка-хозяин по п. 15, которая включает нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 16.

19. Клетка-хозяин по п. 15, где целевой белок представляет собой лиганд рецептора.

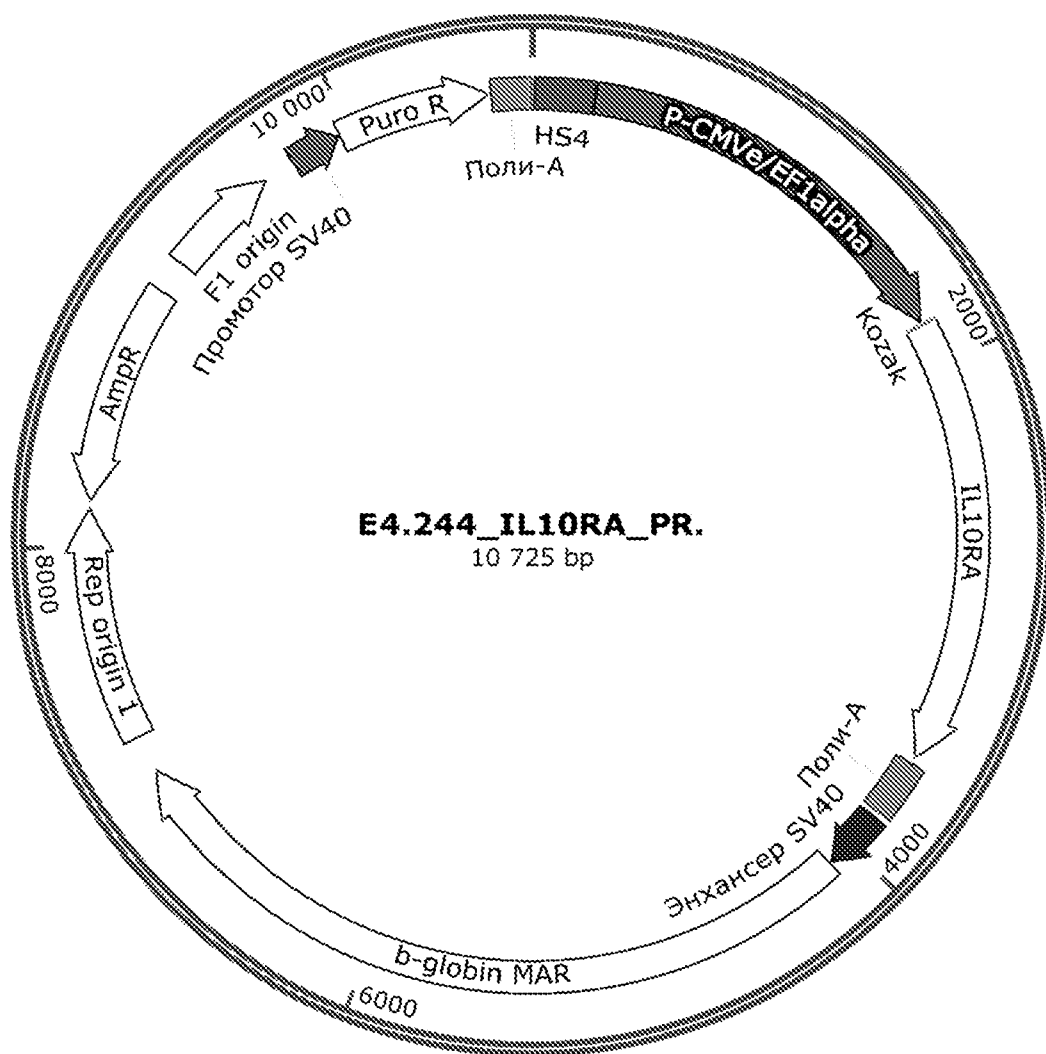
20. Клетка-хозяин по п. 19, где лиганд рецептора представляет собой цитокин.



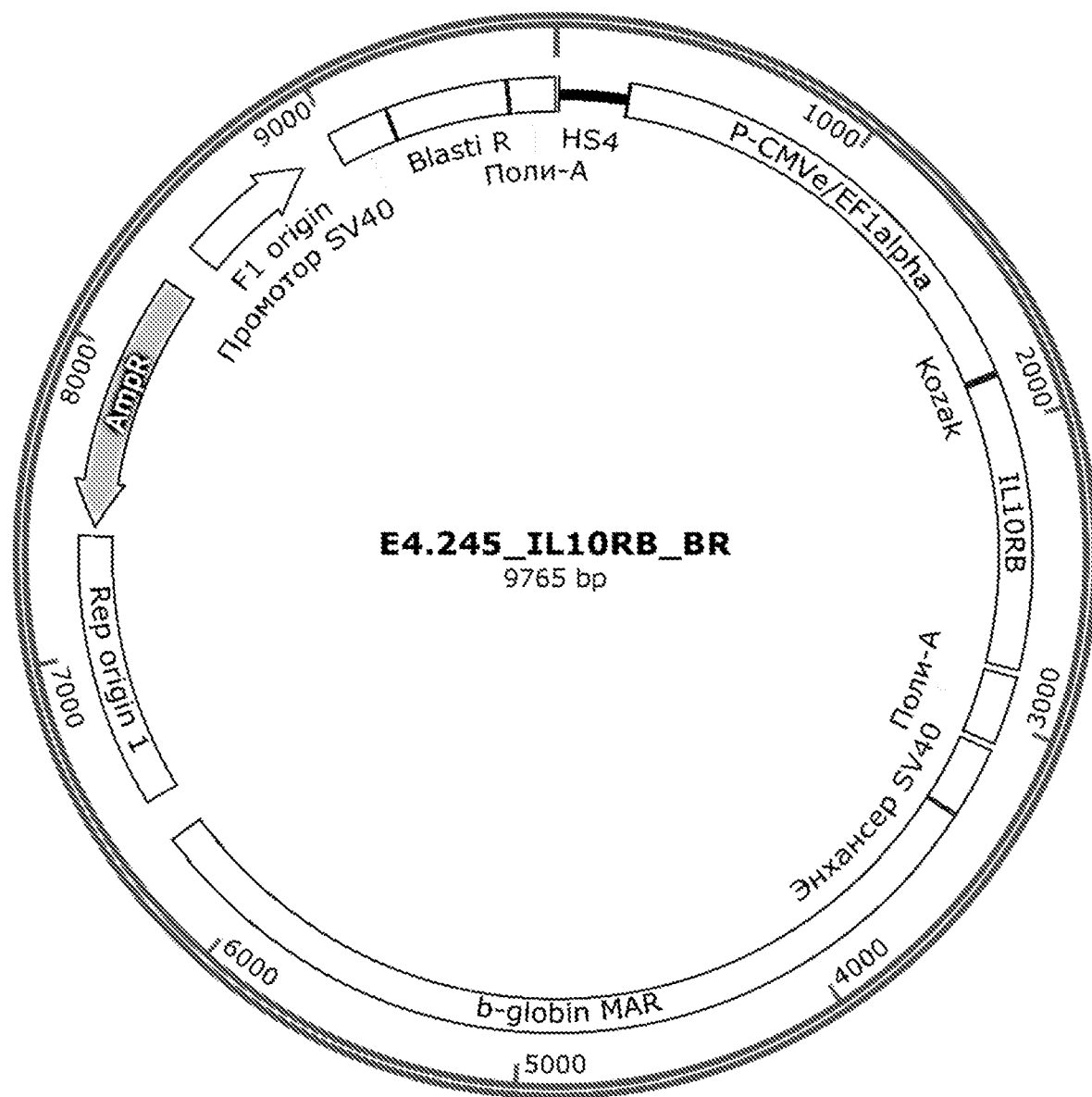
Фиг. 1



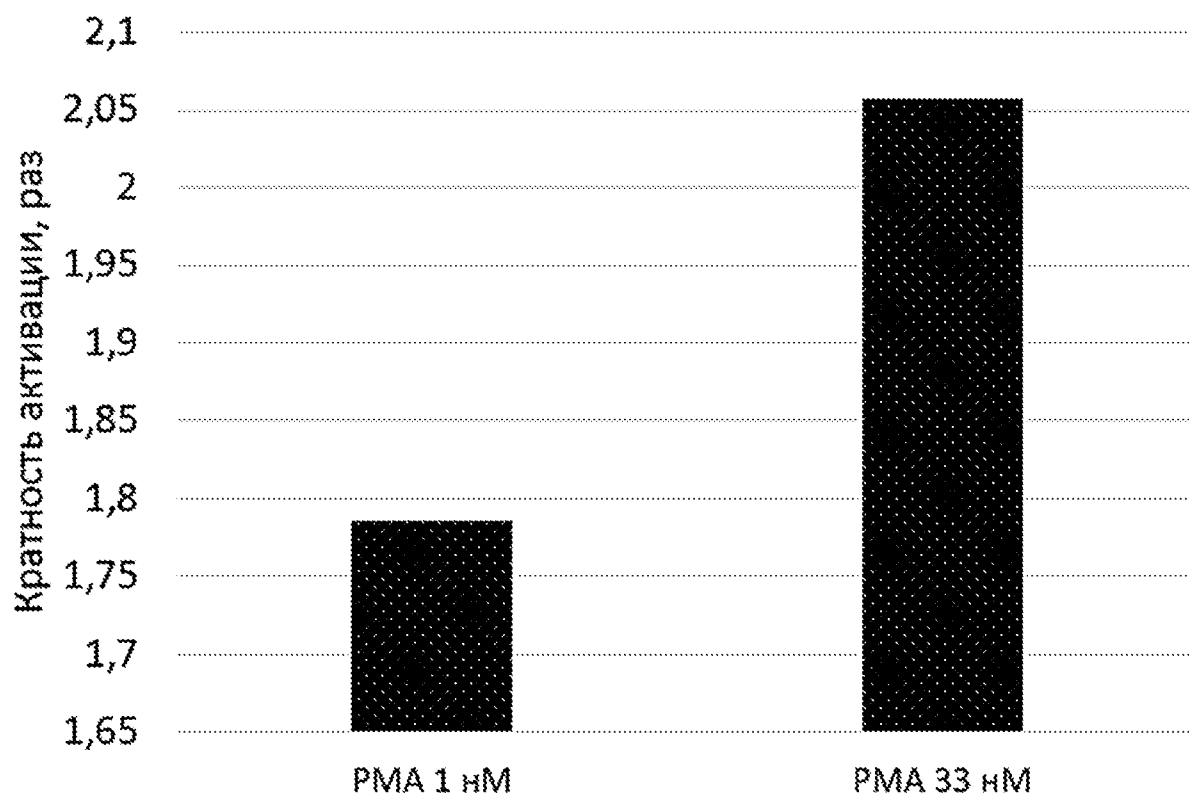
Фиг. 2



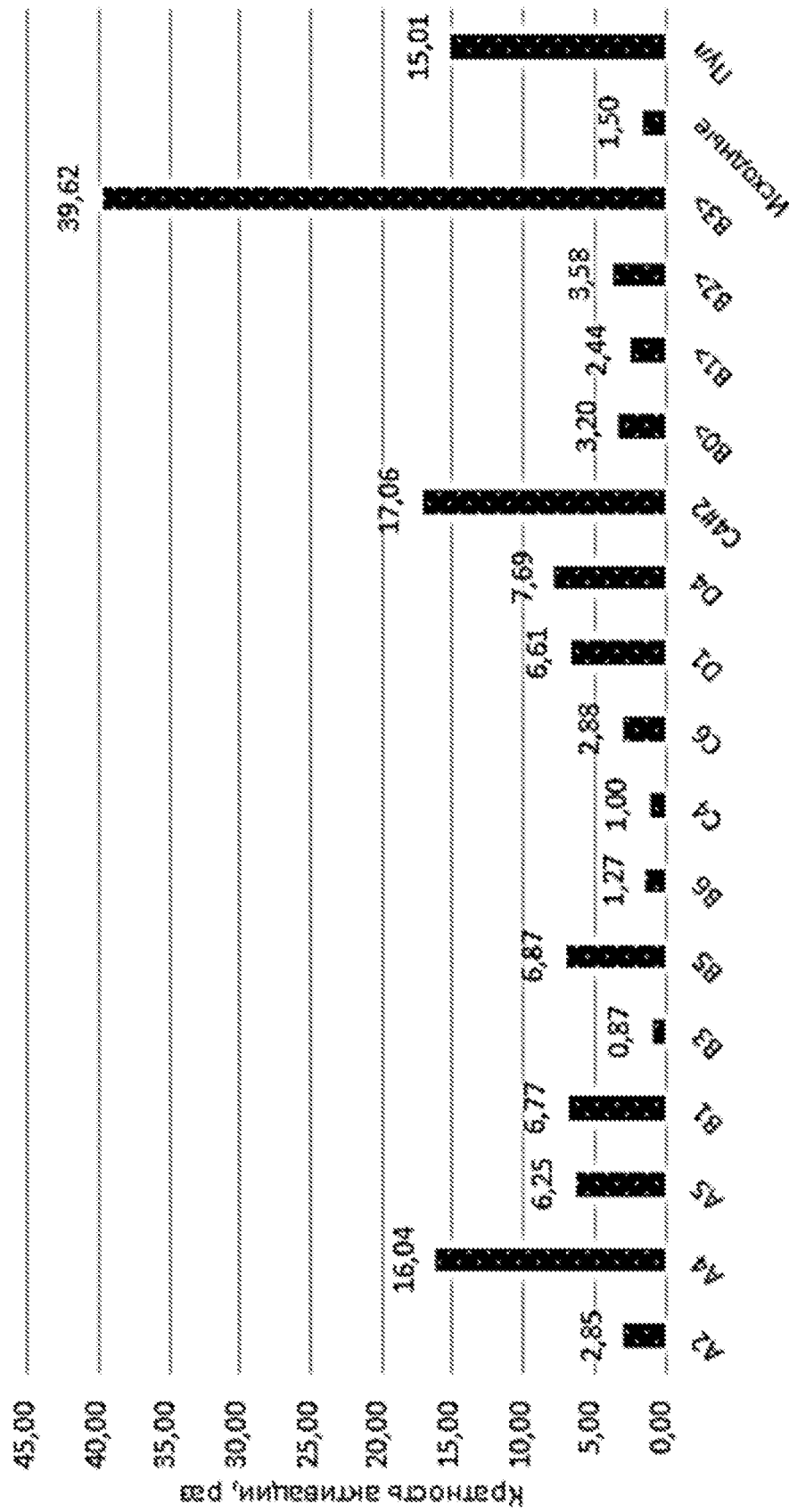
Фиг. 3



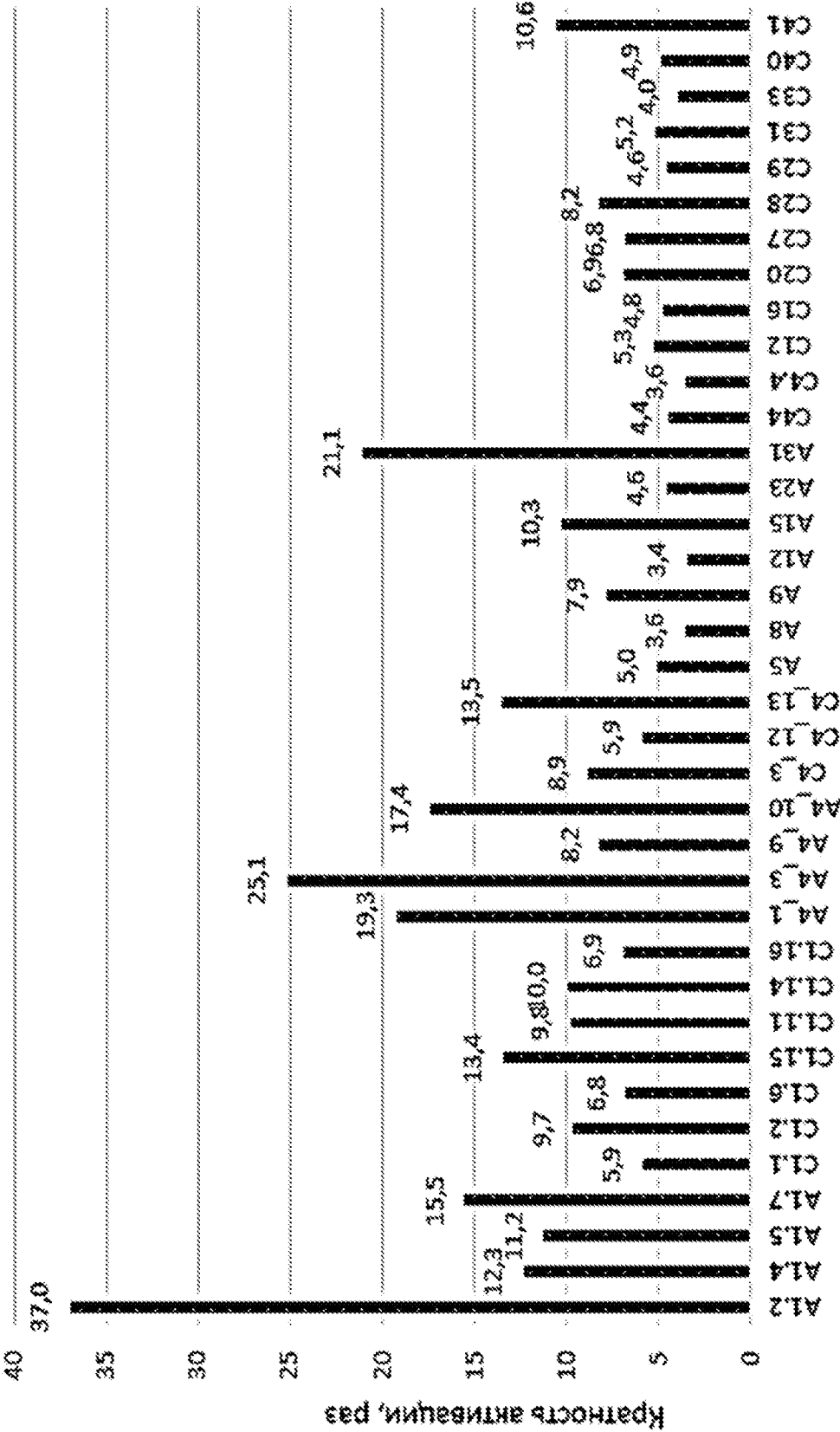
Фиг. 4

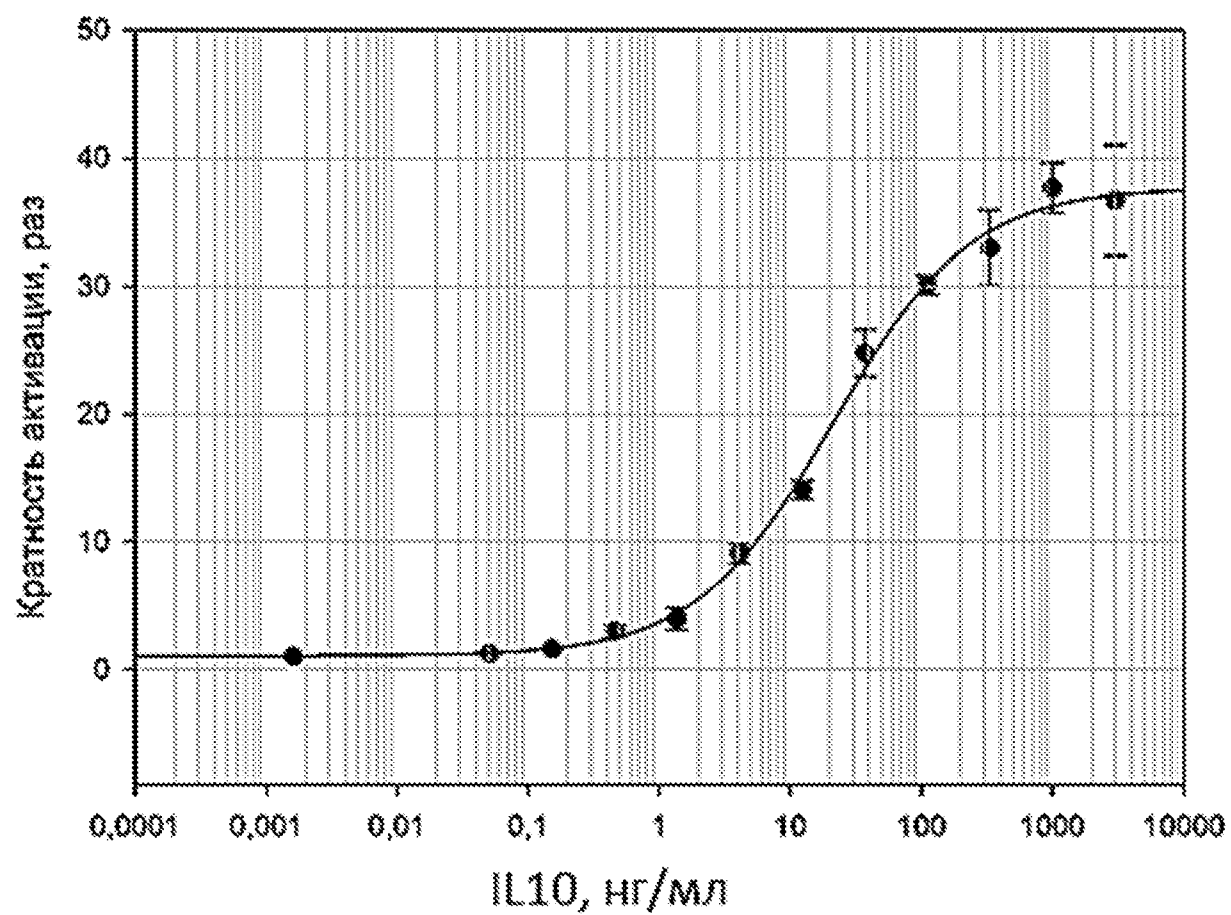


Фиг. 5

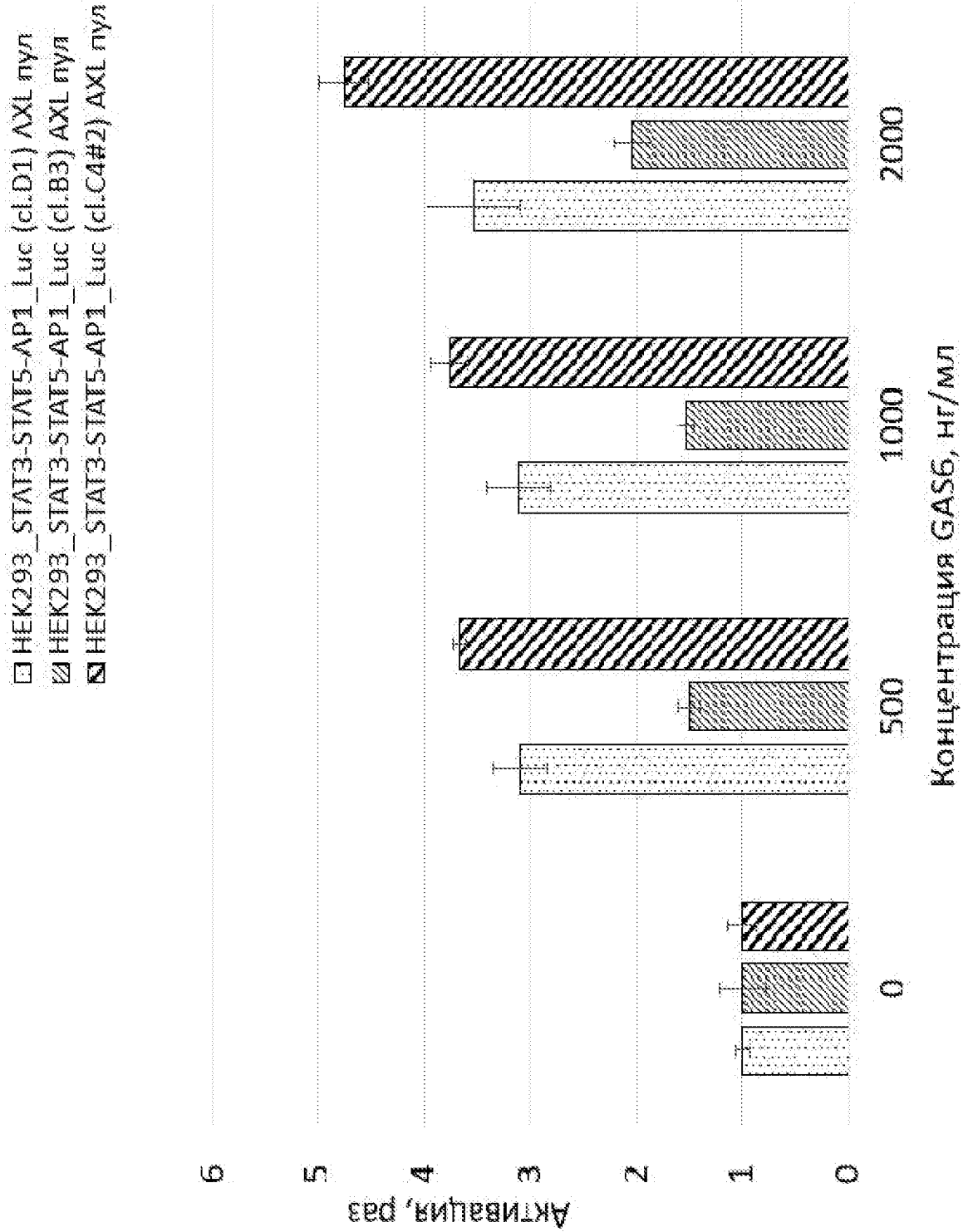


Фиг. 6

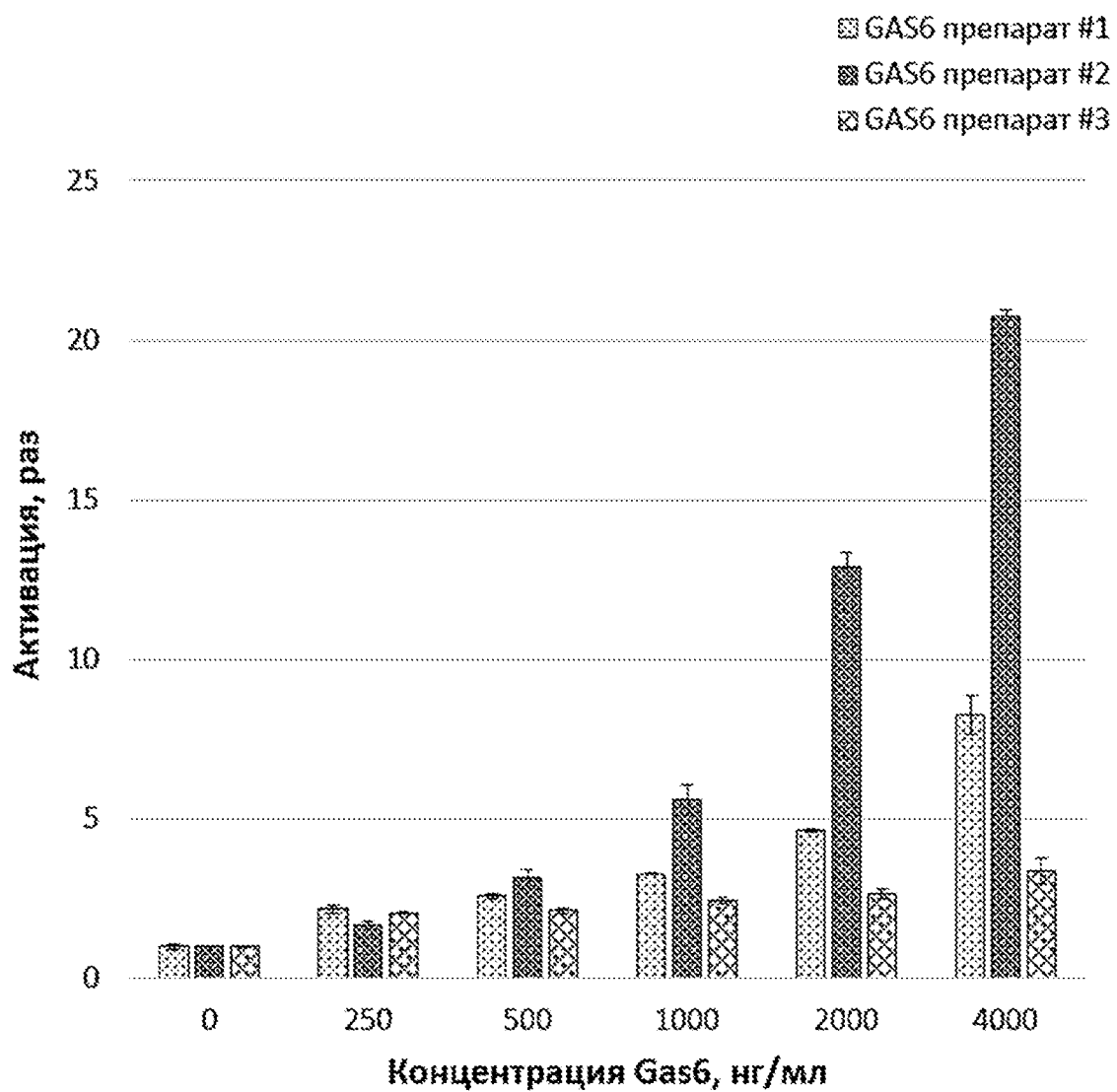




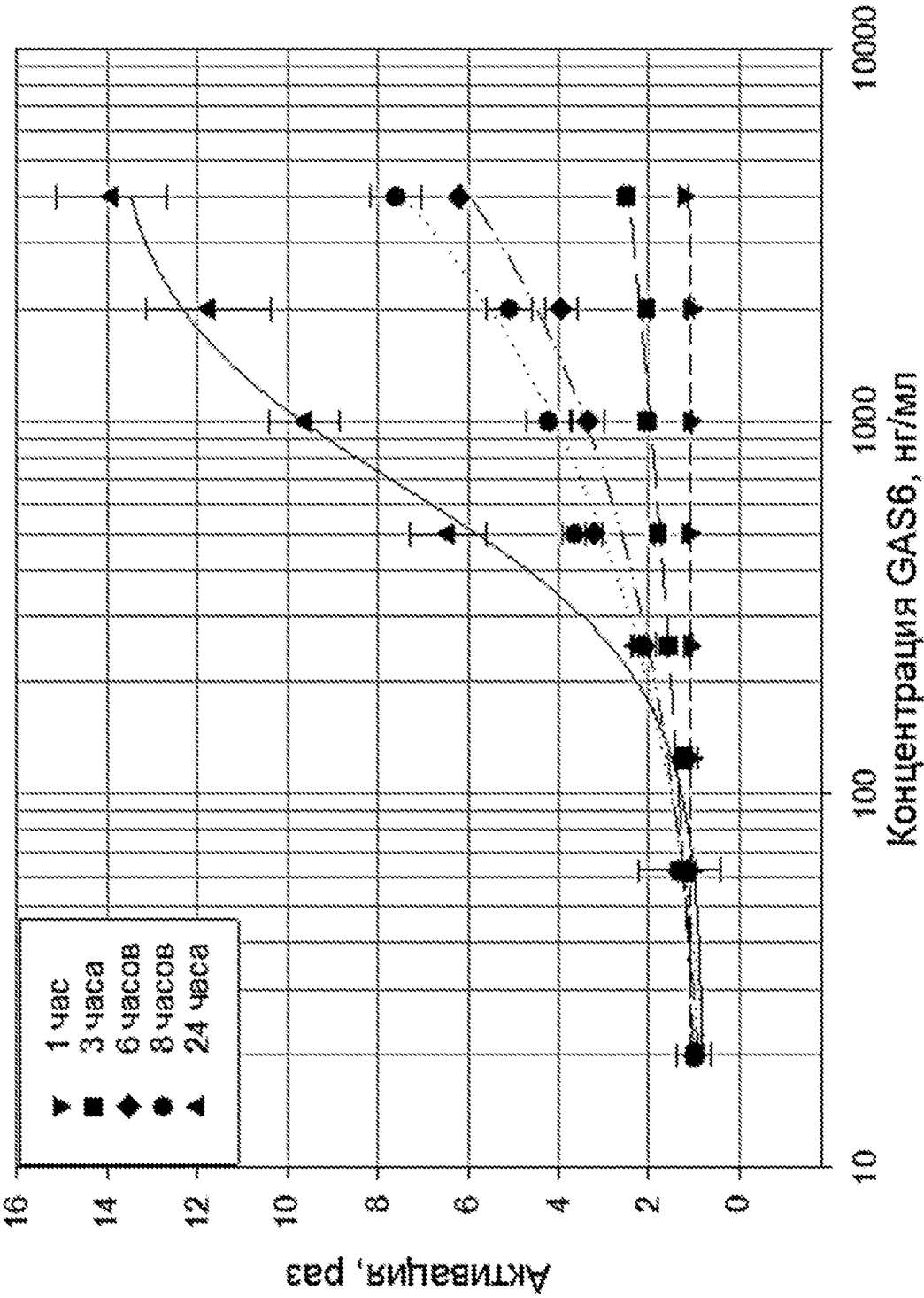
Фиг. 8



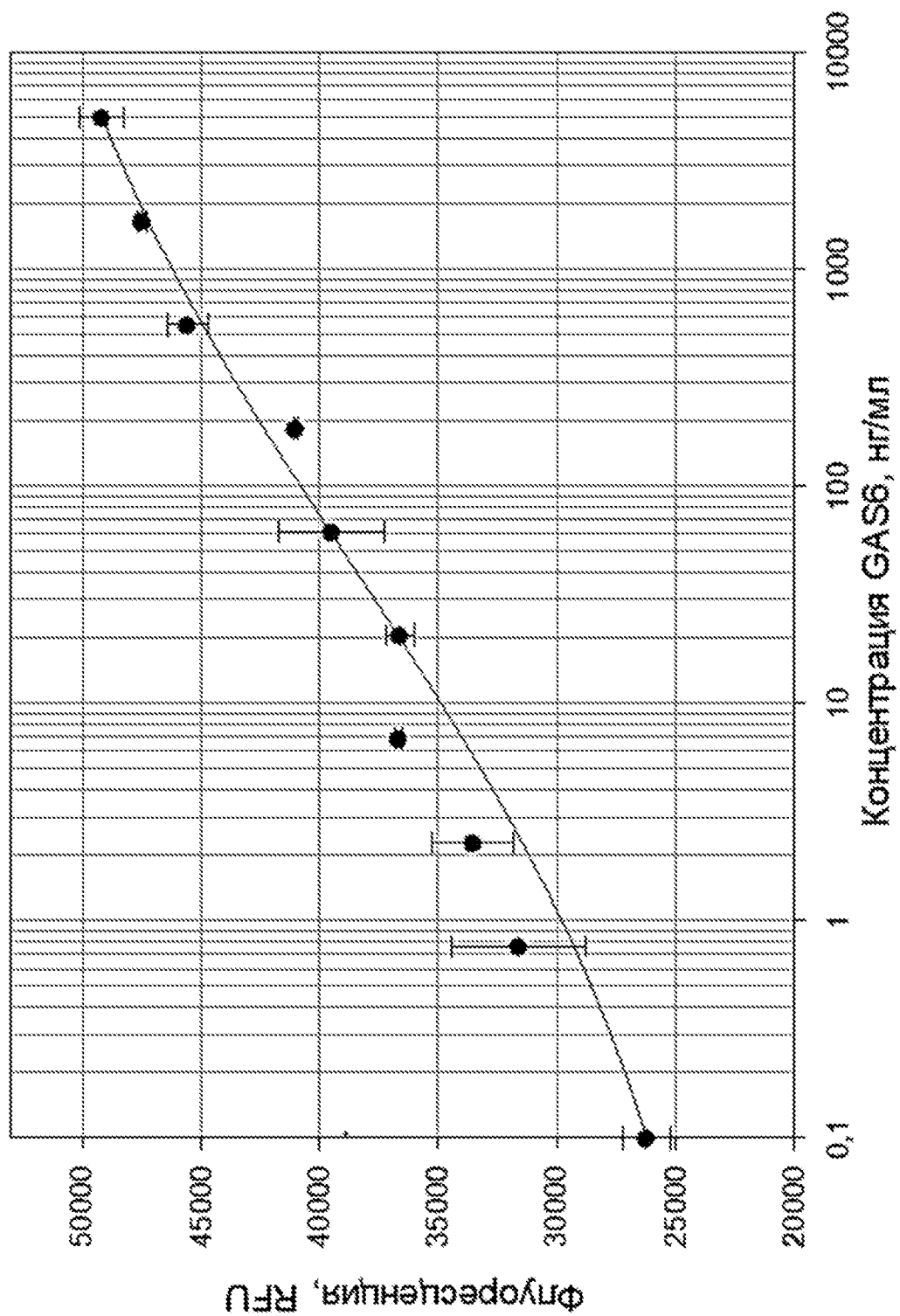
Фиг. 9



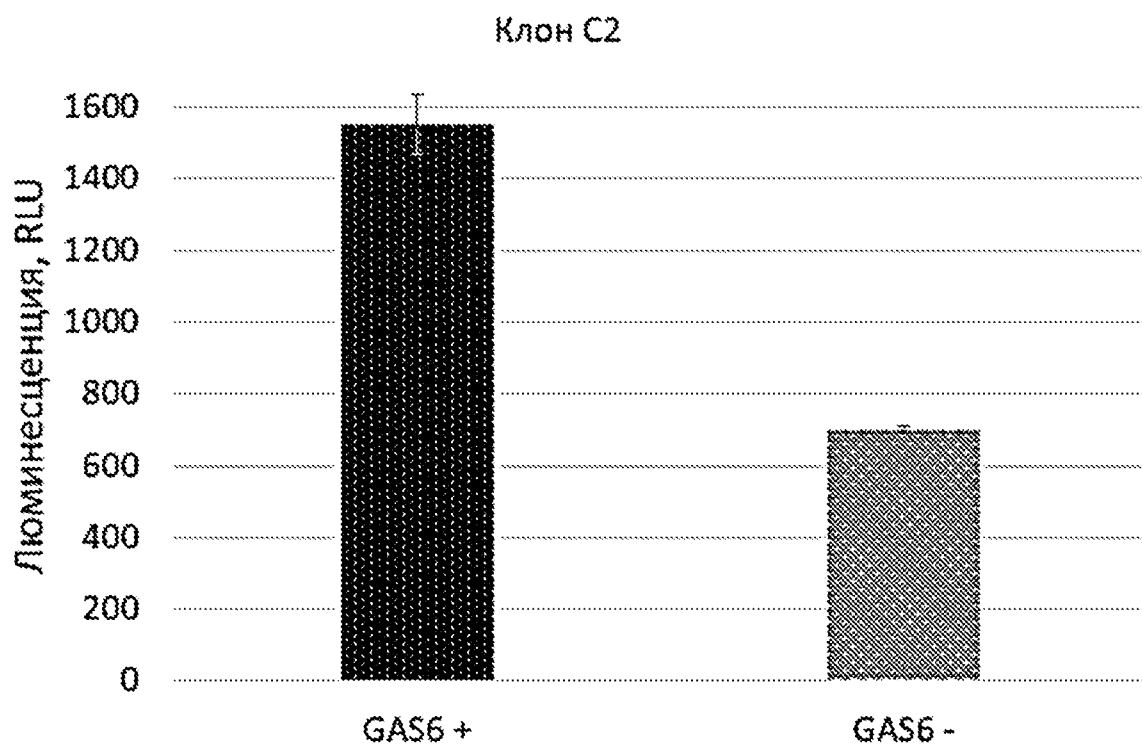
Фиг. 10



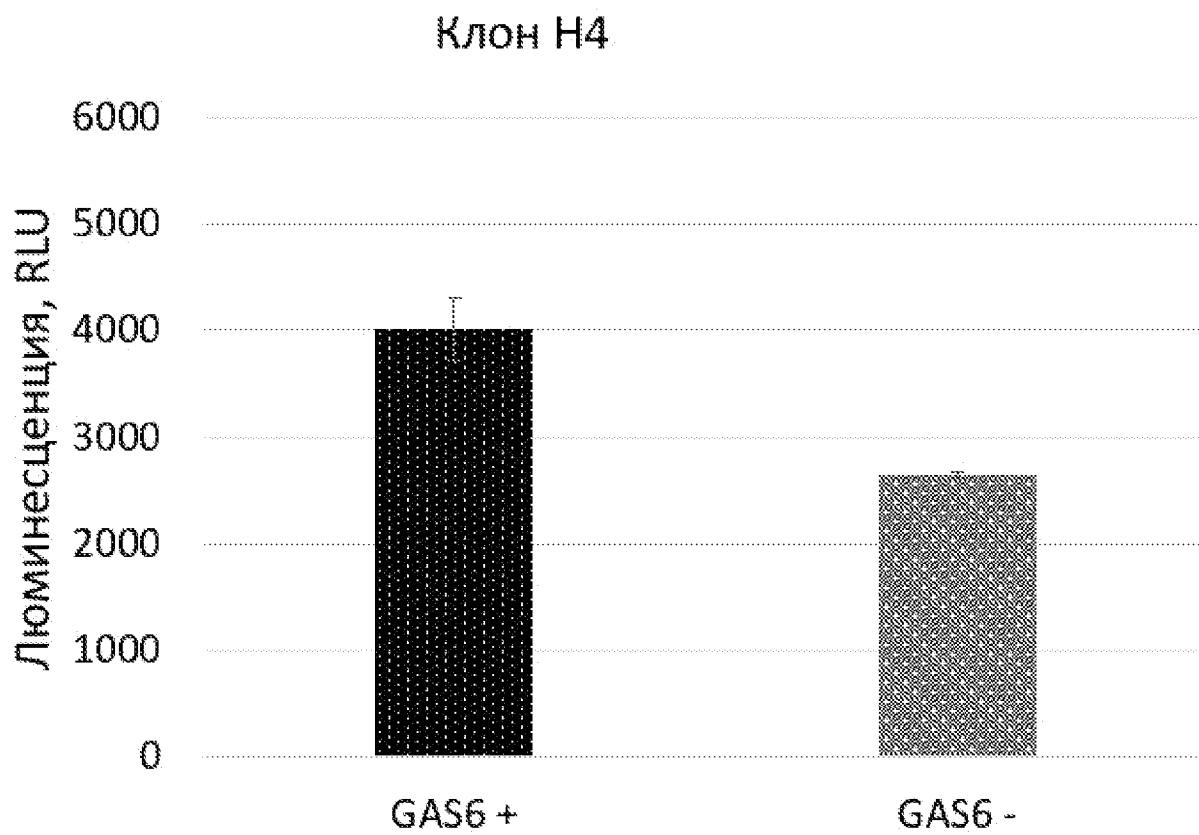
Фиг. 11



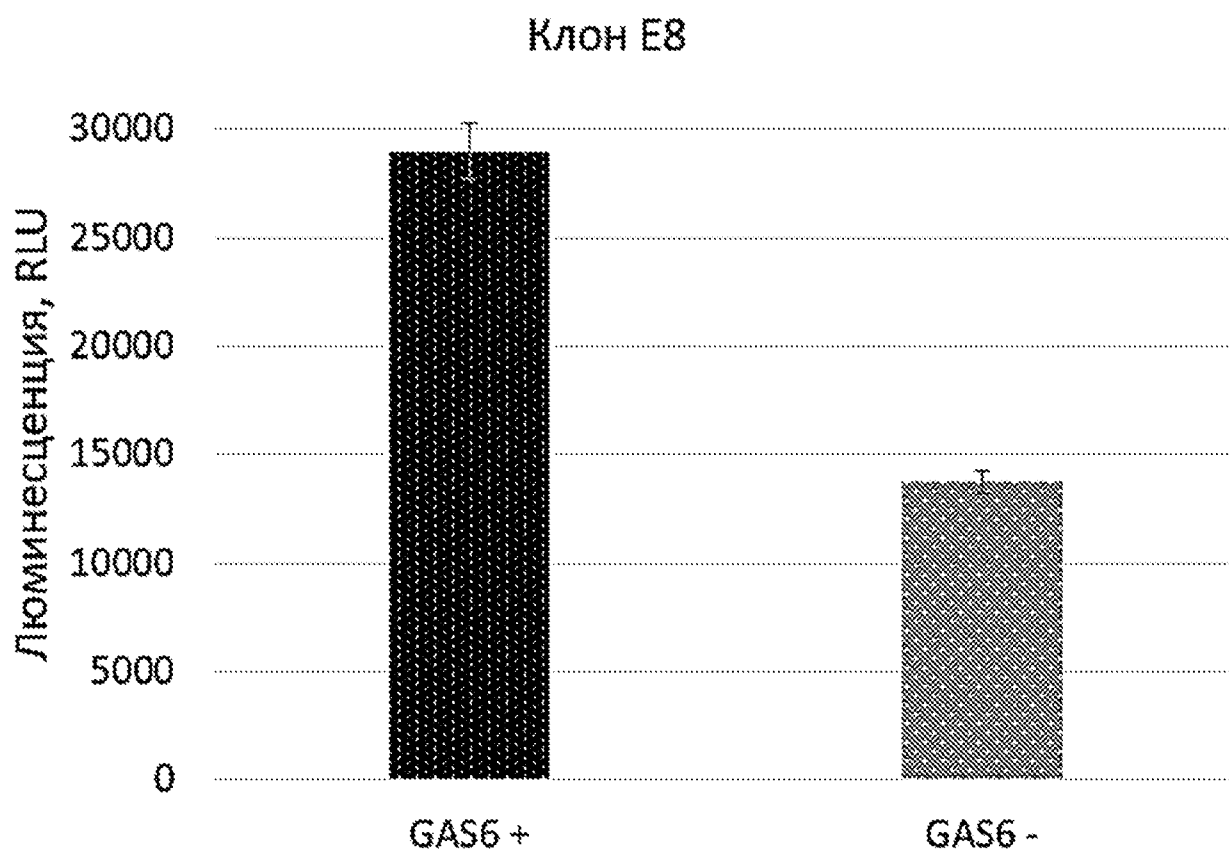
Фиг. 12

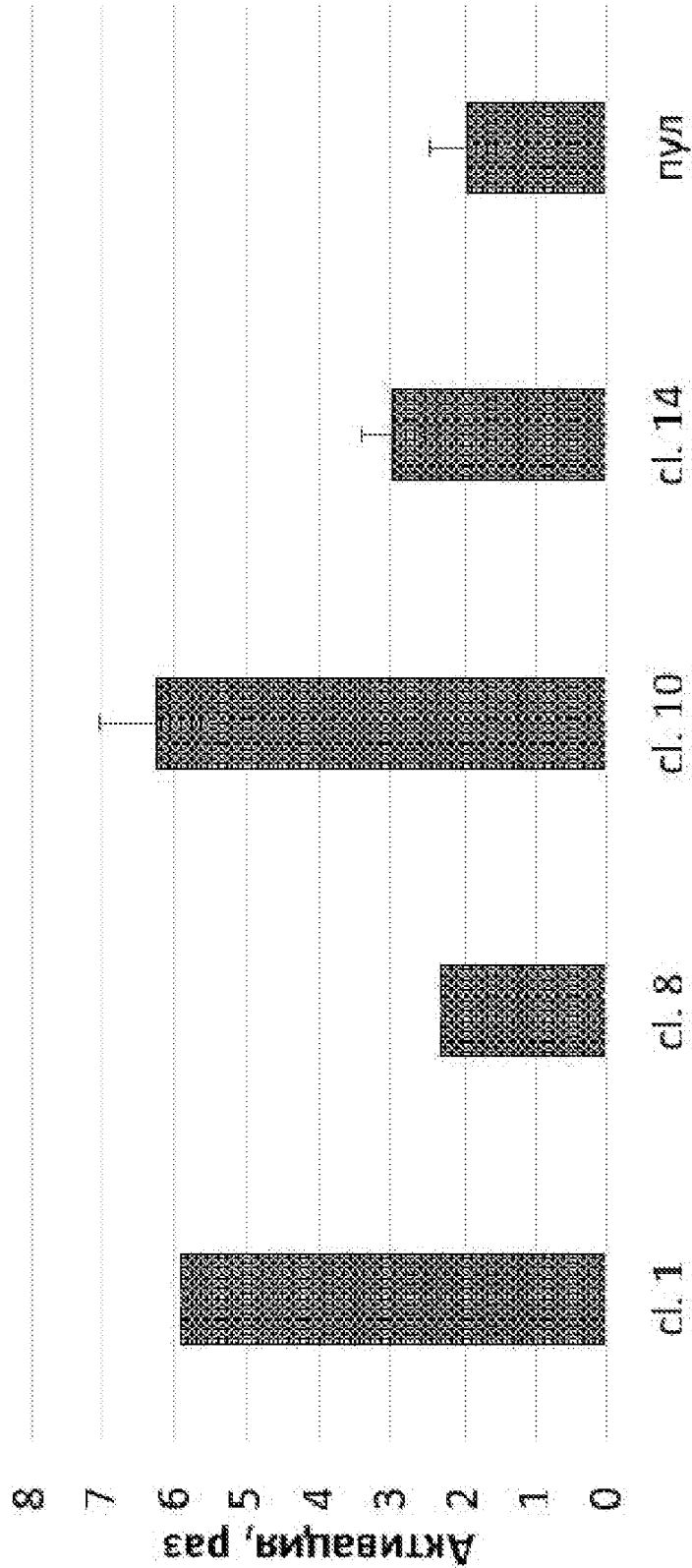


Фиг. 13

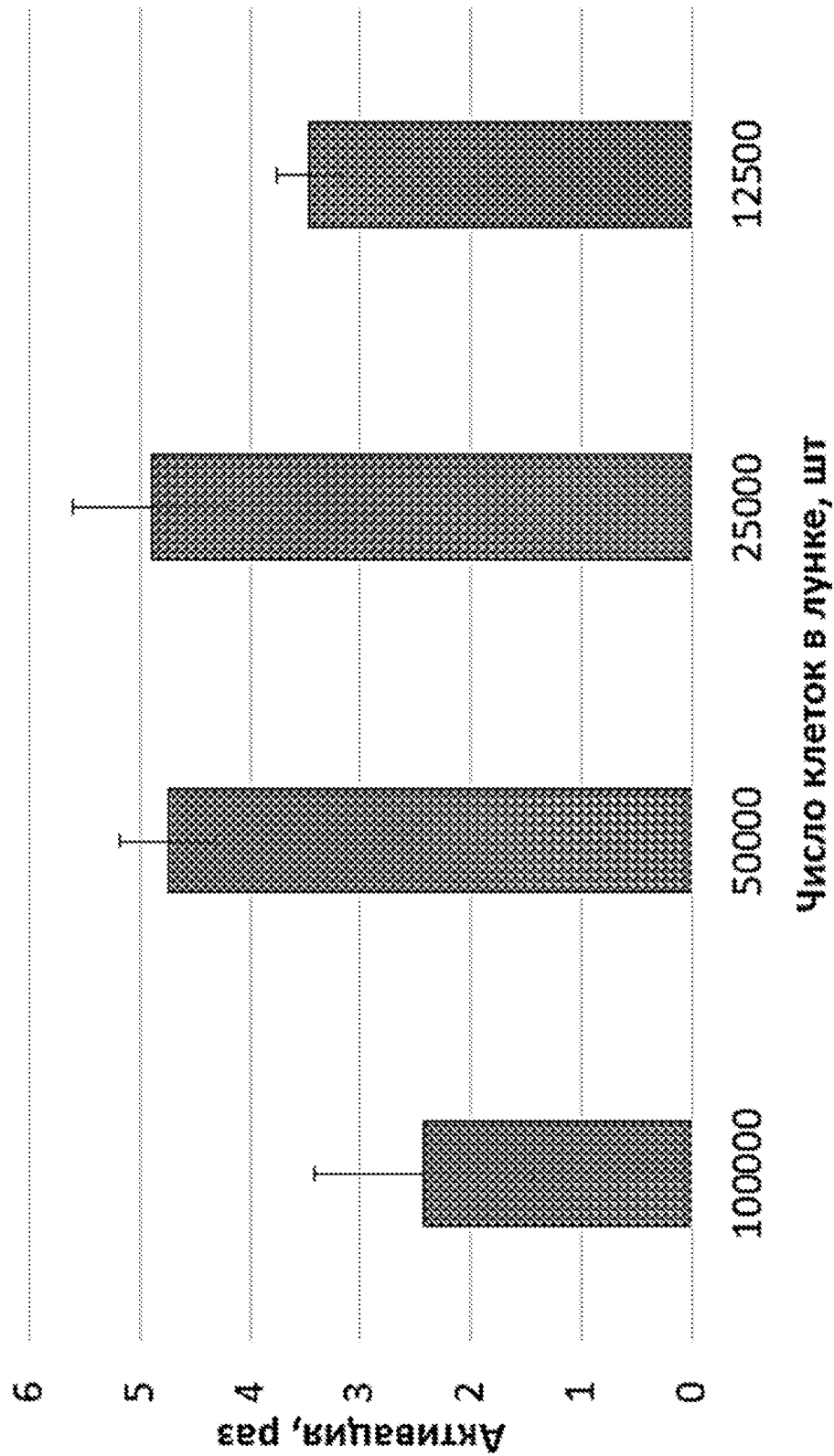


Фиг. 14

**Фиг. 15**



Фиг. 16



Фиг. 17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/RU 2022/050279

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 15/63 (2006.01)*C12N 5/10* (2006.01)*C12Q 1/6897* (2018.01)*G01N 33/533* (2006.01)*C12N 9/02* (2006.01)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N 15/63, 5/10, C12Q 1/6897, G01N 33/53, 33/533, C12N 9/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

PatSearch (RUPTO Internal), USPTO, PAJ, Espacenet

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	LERNER Lorena et al. STAT3-dependent enhanceosome assembly and disassembly: synergy with GR for full transcriptional increase of the $\alpha 2$ -macroglobulin gene. GENES & DEVELOPMENT, v.17, p.2564-, figure 3, page 2568, right col., par 1	1-5, 8-12, 14-17, 19, 20
A		6, 7, 13, 18
Y	BEDNORZ Nadja Lydia et al. Tracking the Activation of Stat5 through the Expression of an Inducible Reporter Gene in a Transgenic Mouse Line. Endocrinology, 2011, v.152, no.5, p.1935-, figure 1, section «Derivation and characterization of Stat5-specific reporter gene constructs», section «PRE induction of Stat5 and the p (Stat5RE)4-CMVmin-LacZ-INSU reporter construct», page 1936, right col., par. 1	1-5, 8-12, 14-17, 19, 20



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

20 December 2022 (20.12.2022)

Date of mailing of the international search report

19 January 2023 (19.01.2023)

Name and mailing address of the ISA/
RU

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/RU 2022/050279

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2020/0308591 A1 (EUROFINS DISCO VERX CORPORATION) 01.10.2020, table 1, SEQ ID NO: 2	9
Y	US 2018/0258446 A1 (JEJU NATIONAL UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) 13.09.2018, par. [0079], page 10-12, SEQ ID NO: 9	12, 17
A	WO 2019/199689 A1 (THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA) 17.10.2019, example 18	1-20
A	RINCON Mercedes et al. AP-1 transcriptional activity requires both T-cell receptor-mediated and co-stimulatory signals in primary T lymphocytes. The EMBO Journal, 1994, v.13, no.18, p.4370-doi:10.1002/j.1460-2075.1994.tb06757.x, page 4371, section «Production and characterization of API-luciferase transgenic mice»	1-20

ОТЧЕТ О МЕЖДУНАРОДНОМ ПОИСКЕ

Номер международной заявки

PCT/RU 2022/050279

A. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ

C12N 15/63 (2006.01)
 C12N 5/10 (2006.01)
 C12Q 1/6897 (2018.01)
 G01N 33/533 (2006.01)
 C12N 9/02 (2006.01)

Согласно Международной патентной классификации МПК

B. ОБЛАСТЬ ПОИСКА

Проверенный минимум документации (система классификации с индексами классификации)

C12N 15/63, 5/10, C12Q 1/6897, G01N 33/53, 33/533, C12N 9/02

Другая проверенная документация в той мере, в какой она включена в поисковые подборки

Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если, возможно, используемые поисковые термины)

PatSearch (RUPTO Internal), USPTO, PAJ, Espacenet

C. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ:

Категория*	Цитируемые документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
Y	LERNER Lorena et al. STAT3-dependent enhanceosome assembly and disassembly: synergy with GR for full transcriptional increase of the α 2-macroglobulin gene. GENES & DEVELOPMENT, v.17, p.2564–, фигура 3, страница 2568, правая колонка, абзац 1	1-5, 8-12, 14-17, 19, 20
A		6, 7, 13, 18
Y	BEDNORZ Nadja Lydia et al. Tracking the Activation of Stat5 through the Expression of an Inducible Reporter Gene in a Transgenic Mouse Line. Endocrinology, 2011, v.152, no.5, p.1935–, фигура 1, раздел «Derivation and characterization of Stat5-specific reporter gene constructs», раздел «PRL induction of Stat5 and the p(Stat5RE)4-CMVmin-LacZ-INSU reporter construct», страница 1936, правая колонка, абзац 1	1-5, 8-12, 14-17, 19, 20



последующие документы указаны в продолжении графы C.



данные о патентах-аналогах указаны в приложении

* Особые категории ссылочных документов:	“Т” более поздний документ, опубликованный после даты международной подачи или приоритета, но приведенный для понимания принципа или теории, на которых основывается изобретение
“А” документ, определяющий общий уровень техники и не считающийся особо релевантным	
“D” документ, цитируемый заявителем в международной заявке	“Х” документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска; заявленное изобретение не обладает новизной или изобретательским уровнем, в сравнении с документом, взятым в отдельности
“Е” более ранняя заявка или патент, но опубликованная на дату международной подачи или после нее	“У” документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска; заявленное изобретение не обладает изобретательским уровнем, когда документ взят в сочетании с одним или несколькими документами той же категории, такая комбинация документов очевидна для специалиста
“L” документ, подвергающий сомнению притязание(я) на приоритет, или который приводится с целью установления даты публикации другого ссылочного документа, а также в других целях (как указано)	“&” документ, являющийся патентом-аналогом
“O” документ, относящийся к устному раскрытию, использованию, экспонированию и т.д.	
“P” документ, опубликованный до даты международной подачи, но после даты испрашиваемого приоритета	

Дата действительного завершения международного поиска

20 декабря 2022 (20.12.2022)

Дата отправки настоящего отчета о международном поиске

19 января 2023 (19.01.2023)

Наименование и адрес ISA/RU:

Федеральный институт промышленной собственности,
 Бережковская наб., д. 30, корп. 1, Москва, Г-59, ГСП-3, 125993,
 Российская Федерация
 тел. +7(499)240-60-15, факс +7(495)531-63-18

Уполномоченное лицо:

Ильченко С.

Телефон № 8(495)531-64-81

ОТЧЕТ О МЕЖДУНАРОДНОМ ПОИСКЕ

Номер международной заявки

PCT/RU 2022/050279

С. (Продолжение). ДОКУМЕНТЫ СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕВАЛЕНТНЫМИ

Категория*	Цитируемые документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
Y	US 2020/0308591 A1 (EUROFINS DISCOVERX CORPORATION) 01.10.2020, таблица 1 , SEQ ID NO: 2	9
Y	US 2018/0258446 A1 (JEJU NATIONAL UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) 13.09.2018, параграф [0079] , страницы 10-12 , SEQ ID NO: 9	12, 17
A	WO 2019/199689 A1 (THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA) 17.10.2019, пример 18	1-20
A	RINCÓN Mercedes et al. AP-1 transcriptional activity requires both T-cell receptor-mediated and co-stimulatory signals in primary T lymphocytes. The EMBO Journal, 1994, v.13, no.18, p.4370–doi:10.1002/j.1460-2075.1994.tb06757.x, страница 4371 , раздел «Production and characterization of API-luciferase transgenic mice»	1-20

Графа I Последовательность(и) нуклеотидов и/или аминокислот (Продолжение пункта 1.с первого листа)

1. Относительно любой последовательности нуклеотидов и/или аминокислот, раскрытой в международной заявке, международный поиск подготовлен на основе перечня последовательностей:
- a. ☒ в виде неотъемлемой части международной заявки в том виде, как она подана.
- b. ☐ представленного впоследствии после даты международной подачи для целей проведения международного поиска (Правило 13^{ter}.1(a)),
- ☐ сопровождающийся заявлением о том, что перечень последовательностей не выходит за рамки первоначально поданной международной заявки.
2. ☐ Относительно любой нуклеотидной и/или аминокислотной последовательности, раскрытой в международной заявке, этот отчет подготовлен в той степени, в которой полноценный поиск может быть осуществлен без перечня последовательностей в соответствии со Стандартом ВОИС ST.26.
3. Дополнительные комментарии: