

Promotor inducible, vector y célula huésped basados en él

Campo de la invención

La presente invención se refiere a los campos de la biotecnología y la biología molecular, en particular a un promotor inducible universal, un vector y una célula huésped basada en él, así como a un método para producir dicha célula huésped. Las invenciones propuestas permiten analizar la actividad de una proteína objetivo, por ejemplo, un ligando del receptor, por ejemplo, una citoquina.

Antecedentes de la invención

Diversos polipéptidos terapéuticamente activos (por ejemplo, anticuerpos monoclonales, proteínas de fusión, diversas citoquinas, ligandos de receptores, etc.) han demostrado su valor como medicamentos eficaces para el tratamiento de una serie de trastornos y enfermedades.

Para desarrollar un nuevo polipéptido terapéuticamente activo, es necesario realizar pruebas funcionales para determinar la actividad biológica del polipéptido terapéuticamente activo dado.

Las pruebas de actividad biológica de un polipéptido terapéuticamente activo son un conjunto de técnicas que se utilizan para evaluar los medicamentos candidatos y que se basan en el análisis de la actividad biológica de una molécula in vitro, utilizando tanto cultivos celulares primarios como líneas celulares especializadas, o in vivo, utilizando animales de laboratorio. Los datos de las pruebas funcionales proporcionan información sobre la actividad de un polipéptido candidato a ser terapéuticamente activo.

Las pruebas funcionales pueden dividirse en los siguientes grupos:

- 1) probar la actividad específica (estimulación e inhibición de la proliferación celular, citotoxicidad/apoptosis, actividad antiviral, diferenciación, migración, etc.);
- 2) prueba de expresión del gen reportero.

Las pruebas de regulación de la proliferación/citotoxicidad son las más universales para la mayoría de los polipéptidos terapéuticamente activos. Estas

pruebas miden el nivel y la actividad de los polipéptidos terapéuticamente activos a través de su capacidad para aumentar o disminuir la proliferación celular. El método se basa en el seguimiento del crecimiento o la muerte de las células en respuesta a una muestra de ensayo (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).

Tales pruebas han encontrado aplicación en ensayos de actividad antiproliferación, por ejemplo, los investigadores evaluaron la capacidad del IFN- β -1a para reducir el crecimiento de las células 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>).

Otro ejemplo notable es un ensayo de proliferación de linfocitos que se utiliza ampliamente para evaluar la inmunidad celular (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>). Hasta la fecha, existen ensayos de proliferación celular disponibles en el mercado para una pluralidad de citoquinas, a saber, IFN- γ , IL-1 α , IL-1 β , IL-2,3,4,5,6,7,8,10,13,15,19,21,33.

Los genes reporteros se utilizan normalmente en ensayos celulares para seguir los cambios de expresión mediados por el receptor a nivel de transcripción y/o traducción. Estos genes optimizados se expresan bajo el control de un elemento sensible dentro de un promotor, y los factores de transcripción se unen a él.

Phyllis A. Rees, R. Joel Lowy han informado del uso de una línea celular reportera para medir los interferones de tipo 1, como alternativa a los ensayos de proliferación que consumen tiempo y trabajo (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 et al. han desarrollado una línea reportera que incluye un gen de luciferasa bajo el control del promotor dependiente de NF- κ B. Se produjo un análogo mediante pruebas convencionales, como el ensayo de proliferación CTLL-2, ELISA para detectar la IL-12 inducida por INF- γ , medición de la actividad citotóxica del TNF (Mock J. ET ALL, A universal reporter cell line for bioactivity evaluation of engineered cytokine products. Sci Rep. 2020;10(1):3234. Publicado el 24 de febrero de 2020. doi:10.1038/s41598-020-60182-4).

Zeuner MT et al. han informado del uso de una línea celular reportera que incluye un promotor sensible a NF- κ B y un gen de luciferasa para investigar la neuroinflamación. Este ensayo permite evaluar la eficacia de moléculas y péptidos proinflamatorios, así como de productos farmacéuticos antiinflamatorios en células nerviosas (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. han desarrollado un análogo de un ensayo de proliferación basado en una línea celular que expresa luciferasa bajo el control de SIE (elemento de respuesta del suero) (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>).

Las ventajas de las células reporteras en comparación con los ensayos convencionales de actividad específica son las siguientes

- 1) resultados fácilmente reproducibles, automatización y escalado;
- 2) la especificidad para un medicamento objetivo;
- 3) alto nivel de sensibilidad, bajo nivel de activación de fondo;
- 4) facilidad de uso, fácil detección de la señal del reportero.

Las desventajas de las células reporteras en comparación con los ensayos convencionales de actividad específica incluyen el largo proceso de desarrollo de células reporteras individuales para un medicamento objetivo, ya que puede durar hasta varios meses.

Por lo tanto, existe la necesidad de contar con células reporteras que puedan utilizarse para determinar la actividad biológica de una pluralidad de diversos polipéptidos terapéuticamente activos, en lugar de un solo polipéptido terapéuticamente activo.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Los autores de la invención han desarrollado un promotor inducible universal que comprende sitios de unión de los factores de transcripción STAT3, STAT5 y AP-1 y un promotor mínimo, así como un vector y una célula huésped basados en él, que permiten determinar la actividad biológica de una pluralidad de diversos polipéptidos terapéuticamente activos, en lugar de un solo polipéptido terapéuticamente activo.

Breve descripción de la invención

En un aspecto, la presente invención se refiere a un promotor inducible que comprende sitios de unión de los factores de transcripción STAT3, STAT5 y AP-1 y un promotor mínimo.

En algunas realizaciones de la invención, el promotor inducible comprende un sitio de unión del factor de transcripción STAT3, que es una secuencia de nucleótidos seleccionada de un grupo de secuencias de nucleótidos que incluyen SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3.

En algunas realizaciones de la invención, el promotor inducible incluye un sitio de unión del factor de transcripción STAT5, que es una secuencia de nucleótidos seleccionada de un grupo de secuencias de nucleótidos que incluyen SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 6.

En algunas realizaciones de la invención, el promotor inducible comprende un sitio de unión del factor de transcripción de la familia AP-1, que es una secuencia de nucleótidos seleccionada de un grupo de secuencias de nucleótidos que incluyen la SEQ ID NO: 7, la SEQ ID NO: 8 o la SEQ ID NO: 9.

En algunas realizaciones de la invención, el promotor inducible comprende sitios de unión de los factores de transcripción STAT3, STAT5 y AP-1, que están dispuestos del extremo 5' al extremo 3' uno tras otro en el siguiente orden STAT3-STAT5-AP-1.

En algunas realizaciones de la invención, el promotor inducible comprende sitios de unión de los factores de transcripción STAT3, STAT5 y AP-1, que están dispuestos del extremo 5' al extremo 3' uno tras otro en el siguiente orden: STAT3-STAT5-AP-1 y comprenden una secuencia de nucleótidos seleccionada de un grupo de secuencias de nucleótidos que incluyen SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 o SEQ ID NO: 12.

En algunas realizaciones de la invención, el promotor inducible comprende sitios de unión de los factores de transcripción STAT3, STAT5 y AP-1, que incluyen la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 13.

En algunas realizaciones de la invención, el promotor inducible comprende un promotor mínimo que comprende una caja TATA.

En algunas realizaciones de la invención, el promotor inducible comprende un promotor mínimo que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 14.

En un aspecto, la presente invención se refiere a un vector de expresión inducible que comprende, en dirección del extremo 5' al extremo 3', cualquiera de los promotores inducibles anteriores y un gen reportero.

En algunas realizaciones de la invención, el vector de expresión inducible comprende un gen reportero que es un gen de la proteína luciferasa de luciérnaga.

En algunas realizaciones de la invención, el vector de expresión inducible comprende un gen de la proteína luciferasa de luciérnaga, que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 15.

En algunas realizaciones de la invención, el vector de expresión inducible comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 16.

En un aspecto, la presente invención se refiere a un método para producir una célula huésped para analizar la actividad de una proteína diana, dicho método

comprende la transformación de la célula con cualquiera de los vectores de expresión inducibles anteriores.

En un aspecto, la presente invención se refiere a una célula huésped para analizar la actividad de una proteína diana, dicha célula huésped que comprende cualquiera de los promotores inducibles anteriores y un gen reportero.

En algunas realizaciones de la invención, la célula huésped comprende un gen reportero que es un gen de la proteína luciferasa de luciérnaga.

En algunas realizaciones de la invención, la célula huésped comprende un gen de la proteína luciferasa de luciérnaga, que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 15.

En algunas realizaciones de la invención, la célula huésped comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 16.

En algunas realizaciones de la invención, la célula huésped se utiliza para analizar la actividad de una proteína diana, en la que la proteína diana es un ligando del receptor.

En algunas realizaciones de la invención, la célula huésped se utiliza para analizar la actividad de una proteína diana, en la que la proteína diana es una citocina.

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 es un diagrama de la construcción del reportero genético. Esta construcción comprende la secuencia de nucleótidos del gen de la proteína luciferasa reportera bajo el control de STAT3, STAT5, promotor dependiente de AP-1. La región no codificante incluye un promotor mínimo formado por una caja TATA, en cuyo extremo 5' se sitúa un elemento cis-regulador formado por sitios de unión alternados de los factores de transcripción STAT3, STAT5, AP-1 en tres repeticiones, como se indica en el diagrama. Las secuencias de flanqueo son complementarias a las regiones que rodean el casete de expresión dentro del vector objetivo y comprenden sitios de reconocimiento para las endonucleasas de restricción Acc65I y BglII.

La Fig. 2 es un mapa del vector plasmídico reportero E6.90_STAT3_STAT5_AP-1_FLuc que codifica el gen de la luciferasa de luciérnaga bajo el control del promotor dependiente de STAT3, STAT5 y AP-1.

AmpR es un gen de la betalactamasa que transmite la resistencia a la ampicilina y permite la selección en las células de E.coli;

Poly-A es una señal de poliadenilación, terminador de la transcripción;

STAT3-STAT5-AP-1 es un elemento regulador de la expresión del gen FLuc;

MinP es un promotor mínimo que incluye una caja TATA;

FLuc es el gen de la luciferasa de Photinus pyralis (luciérnaga);

HygR es un gen que transmite la resistencia a la higromicina. Permite la selección en el cultivo de células eucariotas;

El promotor/ potenciador del SV40 es un promotor/ potenciador eucariótico del virus SV40.

La Fig. 3 es un mapa del vector plasmídico de expresión E4.244_IL10RA_PR que codifica el gen humano IL10RA.

HS4 es el aislante HS4;

pCMVe/EF1alpha es un promotor híbrido constitutivo de CMV/EF1alpha;

Kozak es una secuencia de Kozak;

IL10RA es el gen humano IL10RA;

Poly-A es una señal de poliadenilación, terminador de la transcripción;

El potenciador SV40 es un potenciador del virus SV40;

La b-globina MAR es un elemento MAR (M5) del gen de la b-globina humana;

El origen de replicación 1 es un sitio de origen de replicación;

AmpR es un gen de la betalactamasa que proporciona resistencia a la ampicilina. Permite la selección en el cultivo de células E.coli;

El origen F1 es el origen de replicación del bacteriófago f1;

El promotor SV40 es un promotor eucariota del virus SV40.

Puro R es la resistencia eucariótica a la puromicina. El gen que transmite la resistencia a la puromicina. Permite la selección en el cultivo de células eucariotas.

La Fig. 4 es un mapa del vector plasmídico de expresión E4.245_IL10RB_BR que codifica el gen humano IL10RB.

HS4 es el aislante HS4;

pCMVe/EF1alpha es un promotor híbrido constitutivo de CMV/EF1alpha;

Kozak es una secuencia de Kozak;

IL10RA es el gen humano IL10RA;

Poly-A es una señal de poliadenilación, terminador de la transcripción;

El potenciador SV40 es un potenciador del virus SV40;

La b-globina MAR es un elemento MAR (M5) del gen de la b-globina humana;

El origen de replicación 1 es un sitio de origen de replicación;

AmpR es un gen de la betalactamasa que proporciona resistencia a la ampicilina. Permite la selección en el cultivo de células E.coli;

El origen F1 es el origen de replicación del bacteriófago f1;

El promotor SV40 es un promotor eucariota del virus SV40;

Blasti R es la resistencia eucariótica a la Blastidina. El gen que transmite la resistencia a la Blastidina. Permite la selección en el cultivo de células eucariotas.

La Fig. 5 es un histograma que muestra la multiplicidad de activación de las células reporteras HEK293 Nf-kB en respuesta a diferentes dosis de PMA.

La Fig. 6 es un histograma que muestra la multiplicidad de activación de las líneas clonales reporteras HEK293_STAT3-STAT5-AP1_FLuc en respuesta a una concentración de PMA de 33nM.

A2, A4, A5, B1, B3, B5, B6, C4, C6, D1, D4, C4#2, B0>, B1>, B2>, B3> son nombres de varias líneas clonales reporteras;

inicial - células madre no transfectadas;

pool - población de células tras la transfección.

Se utilizaron como controles las células pool y las no transfectadas.

La Fig. 7 es un histograma que muestra la multiplicidad de activación de las líneas clonales reporteras HEK293_STAT3-STAT5-AP1_FLuc que expresan IL10R en respuesta a IL10 a 100 ng/ml.

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 son nombres de varias líneas clonales del reportero de IL10.

La figura 8 es un gráfico que muestra la respuesta dependiente de la dosis de las células HEK293-STAT3-STAT5-AP1_FLuc_IL10R a la activación de la IL10.

La Fig. 9 es un gráfico de la activación dependiente de GAS6 de los pools HEK293_STAT3-STAT5-AP1_FLuc_AXL producidos a partir de tres clones diferentes (Cl. D1, cl. B3, cl. C4#2) de la línea celular reportera HEK293_STAT3-STAT5-AP1_FLuc. GAS6 es un activador de la señalización celular dependiente de AXL.

Cl. D1, cl. B3, cl. C4#2) son clones de la línea celular reportera HEK293_STAT3-STAT5-AP1_FLuc.

La Fig. 10 es un gráfico que muestra la activación de la línea celular reportera HEK293_STAT3-STAT5-AP1_FLuc_AXL en función de la concentración de varios productos GAS6.

Los productos GAS6 #1, #2, #3 son tres productos diferentes de Gas6.

La Fig. 11 es un gráfico que muestra la activación de la línea celular reportera HEK293_AXL_STAT3-STAT5-AP1 en función del tiempo de incubación de las células en presencia de GAS6.

La Fig. 12 es un gráfico que muestra la proliferación de células DU145 en función de la concentración de GAS6.

Las Fig. 13-15 son gráficos que muestran la activación dependiente de GAS6 de varios clones (clon C2 en la Figura 13, clon H4 en la Figura 14, clon E8 en la Figura 15) de DU145_STAT3-STAT5-AP1_FLuc.

Los clones C2, H4 y E8 son clones de la línea celular DU145_STAT3-STAT5-AP1 producidos sobre la base de la línea celular DU145, un expresador natural de AXL, utilizando una construcción que codifica la luciferasa de luciérnaga bajo el control del promotor STAT3-STAT5-AP1. Estos clones mostraron los mayores niveles de respuesta al procesamiento de GAS6.

La Figura 16 es un gráfico de la activación dependiente de GAS6 del pool y de clones individuales de HEK293_AXL_STAT3-STAT5-AP1_FLuc.

Los cl. 1, cl. 8, cl. 10, cl. 14 son clones de la línea celular HEK293_AXL_STAT3-STAT5-AP1_FLuc, que se produjeron a partir del pool HEK293_AXL_STAT3-STAT5-AP1_FLuc.

Pool es la línea celular HEK293_AXL_STAT3-STAT5-AP1_FLuc producida a partir de la línea celular HEK293_AXL, una sobreexpresora de AXL, en la que se introdujo un gen que codifica la luciferasa de luciérnaga bajo el control del promotor dependiente de STAT3-STAT5-AP1.

La Fig. 17 es un gráfico que muestra la activación de la línea celular reportera HEK293_AXL_STAT3-STAT5-AP1 en función del número de células.

Definiciones y métodos generales

A menos que se definan de otro modo en el presente documento, todos los términos técnicos y científicos utilizados en relación con la presente invención tendrán el mismo significado que suelen entender los expertos en la técnica.

Además, salvo que el contexto exija lo contrario, los términos en singular incluirán los términos en plural, y los términos en plural incluirán los términos en singular. Normalmente, la presente clasificación y los métodos de cultivo celular, biología molecular, inmunología, microbiología, genética, química analítica, química de síntesis orgánica, química médica y farmacéutica, así como la hibridación y la química de las proteínas y los ácidos nucleicos descritos en el presente documento son bien conocidos por los expertos y ampliamente utilizados en la técnica. Las reacciones enzimáticas y los métodos de purificación se llevan a cabo según las directrices del fabricante, como es habitual en la técnica, o como se describe en el presente documento.

Los términos "ácido nucleico", "secuencia nucleica", "secuencia de ácido nucleico", "polinucleótido", "oligonucleótido", "secuencia de polinucleótidos" y "secuencia de nucleótidos" utilizados indistintamente en la presente descripción, significan una secuencia precisa de nucleótidos, modificada o no, que determina un

fragmento o una región de un ácido nucleico, que contiene o no nucleótidos no naturales, y que es un ADN o ARN de doble cadena, un ADN o ARN de cadena simple, o productos de transcripción de dichos ADN.

Tal como se utiliza en la presente descripción, los polinucleótidos incluyen, como ejemplos no limitantes, todas las secuencias de ácido nucleico que se obtienen por cualquier medio disponible en la técnica, incluyendo, como ejemplos no limitantes, los medios recombinantes, es decir, la clonación de secuencias de ácido nucleico a partir de una biblioteca recombinante o un genoma celular, utilizando la tecnología de clonación ordinaria y la PCR y similares, y por medios sintéticos.

También debe incluirse aquí que la presente invención no se refiere a las secuencias de nucleótidos en su entorno cromosómico natural, es decir, en estado natural. Las secuencias de la presente invención han sido aisladas y/o purificadas, es decir, han sido muestreadas directa o indirectamente, por ejemplo, mediante copia, habiendo sido modificado su entorno al menos parcialmente. Así pues, también cabe mencionar aquí los ácidos nucleicos aislados obtenidos por genética recombinante, mediante, por ejemplo, células huésped, u obtenidos por síntesis química.

A menos que se indique lo contrario, el término secuencia de nucleótidos abarca su complemento. Por lo tanto, un ácido nucleico que tiene una secuencia particular debe entenderse como una que abarca la cadena complementaria del mismo con la secuencia complementaria del mismo.

El término "vector", tal y como se utiliza aquí, significa una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que se ha unido.

Tal y como se utiliza en la presente descripción, el término "expresión" se define como la transcripción y/o traducción de una secuencia de nucleótidos concreta impulsada por su promotor.

Descripción detallada de la invención

Promotor inducible

En un aspecto, la presente invención se refiere a un promotor inducible que comprende sitios de unión de los factores de transcripción STAT3, STAT5 y AP-1 y un promotor mínimo.

El promotor inducible según la invención es universal para su uso en sistemas de células reporteras para determinar la actividad de ligandos de receptores, por ejemplo, citoquinas.

El promotor inducible se refiere a un promotor que proporciona la expresión del gen en respuesta a una señal específica.

Los autores de la invención han encontrado sorprendentemente que la presencia de sitios de unión de los factores de transcripción STAT3, STAT5 y AP-1 en el promotor inducible hace posible determinar el nivel de expresión del gen reportero en respuesta a una señal específica producida a partir de la interacción entre el ligando y el receptor del mismo, en el que el ligando del receptor puede seleccionarse entre una pluralidad de citocinas y otros ligandos del receptor que comprenden: 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, leptin, 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, hormona del crecimiento, prolactina, 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, ligando 4-1BB o GAS6, lo que hace que dicho promotor inducible sea universal para su uso en sistemas de células reportadoras para determinar la actividad de los ligandos al receptor, por ejemplo, las citocinas.

El sitio de unión del factor de transcripción STAT3 comprende una porción central que es TTCnnnGAA.

En algunas realizaciones de la invención, el promotor inducible comprende un sitio de unión del factor de transcripción STAT3, que es una secuencia de nucleótidos seleccionada de un grupo de secuencias de nucleótidos que incluyen SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3.

El sitio de unión del factor de transcripción STAT5 comprende una porción central que es TTCnnnGAA.

En algunas realizaciones de la invención, el promotor inducible incluye un sitio de unión del factor de transcripción STAT5, que es una secuencia de nucleótidos seleccionada de un grupo de secuencias de nucleótidos que incluyen SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 6.

El sitio de unión del factor de transcripción AP-1 incluye una porción central que es T[G/T]A[C/G]TCA.

En algunas realizaciones de la invención, el promotor inducible comprende un sitio de unión del factor de transcripción de la familia AP-1, que es una secuencia de nucleótidos seleccionada de un grupo de secuencias de nucleótidos que incluyen la SEQ ID NO: 7, la SEQ ID NO: 8 o la SEQ ID NO: 9.

En algunas realizaciones de la invención, el promotor inducible comprende sitios de unión de los factores de transcripción STAT3, STAT5 y AP-1, que están dispuestos del extremo 5' al extremo 3' uno tras otro en el siguiente orden STAT3-STAT5-AP-1.

En algunas realizaciones de la invención, el promotor inducible incluye sitios de unión de los factores de transcripción STAT3, STAT5 y AP-1, que están dispuestos del extremo 5' al extremo 3' uno tras otro en el siguiente orden: STAT3-STAT5-AP-1, donde STAT3-STAT5-AP-1 está representado en 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 o más repeticiones. La cantidad máxima de repeticiones STAT3-STAT5-AP-1 está limitada por la capacidad del vector de expresión. La cantidad de repeticiones STAT3-STAT5-AP-1 no afecta al rendimiento del promotor inducible según la invención.

En algunas realizaciones de la invención, el promotor inducible comprende sitios de unión de los factores de transcripción STAT3, STAT5 y AP-1, que están dispuestos del extremo 5' al extremo 3' uno tras otro en el siguiente orden: STAT3-STAT5-AP-1 y comprenden una secuencia de nucleótidos seleccionada de un grupo

de secuencias de nucleótidos que incluyen SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 o SEQ ID NO: 12.

En algunas realizaciones de la invención, el promotor inducible comprende sitios de unión de los factores de transcripción STAT3, STAT5 y AP-1, que incluyen la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 13.

En algunas realizaciones de la invención, el promotor inducible comprende un promotor mínimo que comprende una caja TATA.

El promotor mínimo se refiere a un promotor con el menor contenido de elementos reguladores, que comprende una caja TATA (caja Hogness) y un sitio de iniciación de la transcripción; el promotor no funcionará a menos que se añadan elementos reguladores especiales delante del mismo.

En algunas realizaciones de la invención, el promotor inducible comprende un promotor mínimo que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 14.

Vector de expresión inducible

En un aspecto, la presente invención se refiere a un vector de expresión inducible que comprende, en dirección del extremo 5' al extremo 3', cualquiera de los promotores inducibles anteriores y un gen reportero.

El vector de expresión inducible según la invención es universal para producir sistemas de células reporteras para determinar la actividad del ligando al receptor del mismo, por ejemplo, una citoquina.

El vector de expresión inducible es un vector recombinante.

En algunas realizaciones de la invención, el vector de expresión inducible comprende un gen reportero que es un gen de la proteína luciferasa.

En algunas realizaciones de la invención, el vector de expresión inducible comprende un gen reportero que es un gen de la proteína luciferasa de luciérnaga.

En algunas realizaciones de la invención, el vector de expresión inducible comprende un gen de la proteína luciferasa de luciérnaga, que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 15.

En algunas realizaciones de la invención, el vector de expresión inducible comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 16.

En algunas realizaciones de la invención, el vector de expresión inducible comprende un gen reportero que es un gen que codifica la proteína verde fluorescente (GFP), o un gen de la proteína roja fluorescente (DsRed), o un gen LacZ que codifica la enzima beta-galactosidasa, o cualquier otro gen que codifica proteínas fluorescentes o luminiscentes que pueden utilizarse como gen reportero.

En algunas realizaciones de la invención, el vector de expresión inducible comprende una secuencia de ácido nucleico heteróloga que comprende secuencias reguladoras que proporcionan la expresión del gen del polipéptido reportero.

"Secuencias reguladoras que proporcionan la expresión del producto codificado por la secuencia de ácido nucleico heteróloga en las células diana", tal como se utiliza en la presente invención, significa secuencias polinucleotídicas que son necesarias para influir en la expresión y el procesamiento de las secuencias codificantes a las que se clonan. Las secuencias de control de expresión incluyen secuencias apropiadas de iniciación y terminación de la transcripción, promotores inducibles y potenciadores; señales eficientes de procesamiento del ARN, como señales de empalme y poliadenilación; secuencias que estabilizan el ARNm citoplásmico; secuencias que mejoran la eficiencia de la traducción (es decir, la secuencia consenso de Kozak); secuencias que mejoran la estabilidad de la proteína; y, cuando se desea, secuencias que mejoran la secreción de la proteína. La naturaleza de dichas secuencias de control difiere según el organismo anfitrión; en procariotas, dichas secuencias de control generalmente incluyen el promotor del sitio de unión al ribosoma, y secuencias de terminación de la transcripción; en eucariotas, típicamente, dichas secuencias de control incluyen promotores y secuencias de terminación de la transcripción. El término "secuencias reguladoras" abarca al menos todos los componentes cuya presencia es importante para la expresión y el procesamiento.

Los términos "reforzadores" o "potenciadores", tal y como se utilizan aquí, pueden referirse a una secuencia de ADN que se encuentra adyacente a la secuencia

de ADN que codifica un producto recombinante. Los elementos potenciadores suelen estar situados en dirección 5' desde un elemento promotor o pueden estar situados secuencia abajo o dentro de una secuencia de ADN codificante (por ejemplo, una secuencia de ADN transcrita o traducida en un producto o productos recombinantes). Por lo tanto, un elemento potenciador podría estar situado 100 pares de bases, 200 pares de bases o 300 o más pares de bases secuencia arriba de una secuencia de ADN que codifica un producto recombinante, o secuencia abajo de dicha secuencia. Los elementos potenciadores pueden aumentar la cantidad de un producto recombinante que se expresa a partir de una secuencia de ADN por encima del nivel de expresión asociado a un único elemento promotor. Los elementos potenciadores múltiples están fácilmente disponibles para aquellos con conocimientos ordinarios en la técnica.

En algunas realizaciones de la invención, el vector de expresión inducible universal puede utilizarse para generar una célula huésped que se utiliza como línea celular reportera universal para analizar la actividad de una pluralidad de diversos ligandos de receptor, que, por ejemplo, son 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, leptin, 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, IL-37, IL-18, M-CSF, CSF1, G-CSF, CSF 3, IL-31, IL-35, hormona del crecimiento, prolactina, 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, ligando 4-1BB o GAS6.

Célula huésped y método para producirla

En un aspecto, la presente invención se refiere a un método para producir una célula huésped para analizar la actividad de una proteína diana, dicho método comprende la transformación de la célula con cualquiera de los vectores de expresión inducibles anteriores.

En un aspecto, la presente invención se refiere a una célula huésped para analizar la actividad de una proteína diana, dicha célula huésped que comprende cualquiera de los promotores inducibles anteriores y un gen reportero.

Debido a las características de los promotores inducibles anteriores según la invención, la célula huésped según la invención puede utilizarse para analizar la actividad de una pluralidad de diversos ligandos de receptor, que, por ejemplo, son 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, leptina, 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, IL-37, IL-18, M-CSF, CSF1, G-CSF, CSF 3, IL-31, IL-35, hormona del crecimiento, prolactina, 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, ligando 4-1BB o GAS6.

La célula huésped según la invención es una célula huésped recombinante.

En algunas realizaciones de la invención, la célula huésped comprende un gen reportero que es un gen de la proteína luciferasa.

En algunas realizaciones de la invención, la célula huésped comprende un gen reportero que es un gen de la proteína luciferasa de luciérnaga.

En algunas realizaciones de la invención, la célula huésped comprende un gen de la proteína luciferasa de luciérnaga, que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 15.

En algunas realizaciones de la invención, la célula huésped comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 16.

En algunas realizaciones de la invención, la célula huésped comprende un gen reportero que es un gen que codifica la proteína verde fluorescente (GFP), o un gen de la proteína roja fluorescente (DsRed), o un gen LacZ que codifica la enzima beta-galactosidasa, o cualquier otro gen que codifique proteínas fluorescentes o luminiscentes que puedan utilizarse como gen reportero.

En algunas realizaciones de la invención, la célula huésped se utiliza para analizar la actividad de una proteína diana, en la que la proteína diana es un ligando del receptor.

En algunas realizaciones de la invención, la célula huésped se utiliza para analizar la actividad de una proteína diana, en la que la proteína diana es una citocina.

En algunas realizaciones de la invención, la célula huésped es una célula eucariota.

En algunas realizaciones de la invención, la célula huésped es una célula de mamífero.

Las líneas celulares de mamíferos utilizadas como huéspedes para la transformación son bien conocidas en la técnica e incluyen una pluralidad de líneas celulares inmortalizadas disponibles. Entre ellas se encuentran, por ejemplo, las células de ovario de hámster chino (CHO), las células NS0, las células SP2, las células HEK-293T, las células FreeStyle 293 (Invitrogen), las células NIH-3T3, las células HeLa, las células de riñón de hámster bebé (BHK), las células de riñón de mono verde africano (COS), las células de carcinoma hepatocelular humano (por ejemplo, Hep G2), las células A549 y otras líneas celulares. Las líneas celulares se seleccionan determinando qué líneas celulares tienen altos niveles de expresión y proporcionan las características necesarias de la proteína producida. Otras líneas celulares que pueden utilizarse son las de insectos, como las células Sf9 o Sf21. Las células huésped vegetales incluyen, por ejemplo, *Nicotiana*, *Arabidopsis*, lenteja de agua, maíz, trigo, patata, etc. Las células huésped bacterianas incluyen las especies *Escherichia* y *Streptomyces*. Las células huésped de levadura incluyen *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia pastoris*.

La anterior célula huésped de la invención no se refiere a una célula huésped producida utilizando embriones humanos.

La anterior célula huésped de la invención no se refiere a una célula huésped producida mediante la modificación de la integridad genética de las células de la línea germinal humana.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se proporcionan para una mejor comprensión de la invención. Estos ejemplos son sólo para fines ilustrativos y no deben interpretarse de ninguna manera como una restricción del alcance de la invención.

Todas las publicaciones, patentes y solicitudes de patentes citadas en esta especificación se incorporan aquí por remisión. Aunque la invención anterior se ha descrito en detalle a modo de ilustración y ejemplo para fines de claridad de la comprensión, será fácilmente aparente para aquellos de habilidad ordinaria en la técnica a la luz de las enseñanzas de esta invención que ciertos cambios y modificaciones pueden hacerse a la misma sin apartarse del espíritu o el alcance de las realizaciones anexas.

Materiales y métodos generales

Técnicas de ADN recombinante

Se utilizaron métodos estándar para manipular el ADN como se describe en Sambrook, J. et al, Molecular cloning: A laboratory manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989. Los reactivos de biología molecular se utilizaron según los protocolos del fabricante.

Síntesis genética

Los segmentos genéticos deseados se prepararon a partir de oligonucleótidos fabricados por síntesis química. Los segmentos génicos de 300 a 1400 pb de longitud, que estaban flanqueados por sitios de restricción singulares, se ensamblaron mediante el recocido y la ligación de oligonucleótidos, incluyendo la amplificación por PCR, y posteriormente se clonaron a través de los sitios de restricción. Las secuencias de ADN de los fragmentos genéticos subclonados se confirmaron mediante la secuenciación del ADN.

Determinación de la secuencia de ADN

Las secuencias de ADN se determinaron mediante secuenciación de Sanger.

Análisis de secuencias de ADN y gestión de datos de secuencias

Para la creación de la secuencia, el mapeo, el análisis, la anotación y la ilustración se utilizó el paquete UGENE versión 1.29 de Unipro y SnapGene Viewer.

Vectores de expresión

Los vectores que comprenden el gen reportero, tal como se describe en los materiales de la solicitud, comprendían, además de la construcción reportera: un sitio de iniciación de la replicación que proporciona la replicación de dicho plásmido en E.coli, un gen que transmite la resistencia de E.coli a un antibiótico selectivo (ampicilina).

Las construcciones genéticas del vector que se describen a continuación se ensamblaron mediante PCR y/o síntesis de genes y ensamblaje utilizando métodos y técnicas recombinantes conocidos mediante la conexión de los segmentos de ácido nucleico correspondientes, por ejemplo, utilizando sitios de restricción únicos en los vectores correspondientes. Las secuencias de ácidos nucleicos subclonados se verificaron mediante la secuenciación del ADN. Para las transfecciones transitorias, se prepararon mayores cantidades de plásmidos mediante la preparación de plásmidos a partir de cultivos de E. coli transformados.

Ejemplo 1. Producción de un vector plasmídico reportero que codifica el gen de la luciferasa de luciérnaga bajo el control del promotor sensible a STAT3-STAT5-AP-1.

Para generar un constructo reportero universal, seleccionamos los factores de transcripción STAT3, STAT5, AP-1 que median la actividad de muchas y diversas moléculas de señalización.

Creamos un elemento regulador que incluía un promotor mínimo consistente en una caja TATA, y en el extremo 5' del promotor se posicionaron sitios de unión para los factores de transcripción STAT3, STAT5, AP-1 (doi:10.1128/JVI.01713-10; doi:10.1074/jbc.M001748200) en tres repeticiones (Fig. 1). Esta combinación

de sitios de unión de factores de transcripción permite producir un promotor inducible que tiene un amplio campo de aplicaciones.

Para ensamblar la matriz, sintetizamos seis oligonucleótidos parcialmente complementarios de 60 pb de longitud, con un solapamiento de 20 pb. El ensamblaje se realizó por síntesis a partir de oligonucleótidos, dando lugar a un fragmento de 249 pb de longitud, flanqueado por regiones complementarias al vector plasmídico. La secuencia resultante se clonó en el vector E6.90 mediante clonación independiente de la ligadura (Fig. 2). Las secuencias de ácidos nucleicos clonados se verificaron mediante la secuenciación del ADN.

Ejemplo 2. Producción de vectores plasmídicos que codifican las subunidades del receptor de la IL-10 para crear una línea celular expresadora estable.

Para evaluar la línea reportera en un ensayo celular específico, expresamos el receptor de IL-10 en la superficie de las células reporteras.

Para generar las secuencias nativas del gen de la IL-10Ra humana (<https://www.uniprot.org/uniprot/Q13651>) y del gen de la IL-10Rb humana (<https://www.uniprot.org/uniprot/Q08334>), aislamos el ARN total de las células mononucleares de la sangre periférica del donante y sintetizamos el ADNc a partir del mismo. La biblioteca de ADNc resultante se utilizó como plantilla para la amplificación por PCR de las secuencias objetivo flanqueadas por sitios de restricción. Los genes diana dentro de los vectores de expresión se clonaron mediante el método de ligadura por restricción (Fig. 3, Fig. 4). Las secuencias de ácidos nucleicos clonados se verificaron mediante la secuenciación del ADN.

Ejemplo 3. Activación de la Nf-kB de HEK293.

Utilizamos un activador de PMA para examinar las líneas clonales reporteras. Este agente afecta directamente a la proteína quinasa C, desencadenando así cascadas de señalización que activan la expresión del gen reportero (<https://doi.org/10.1007/s11373-005-1210-5>; doi: 10.1093/carcin/bgm261). Para determinar la dosis óptima de PMA, realizamos experimentos de activación de la

línea reportera Nf-kB de HEK293. Las células se sembraron en una placa de cultivo blanca de 96 pocillos para cultivos de adhesión a 3×10^5 células por pocillo, y se añadió el activador PMA a las concentraciones indicadas en el gráfico hasta 150 μ l en un pocillo. Todas las soluciones se prepararon en medio de crecimiento DMEM suplementado con 10% de suero bovino fetal, 2 mM de L-glutamina y 10 μ g/ml de gentamicina. La placa se incubó durante 24 horas a 37 °C en una atmósfera húmeda en presencia de un 5% de CO_2 . Tras la incubación, se vaciaron los pocillos y se añadieron 100 μ l de sustrato de luciferina con un componente de lisado; la placa se dejó en la oscuridad durante 10 minutos, tras lo cual se detectó el nivel de luminiscencia con un lector de placas utilizando el paquete de software SparkControl V2.1 (Tecan, Austria).

Así, se seleccionó la concentración óptima del activador PMA de 33nM (Fig. 5).

Ejemplo 4. Producción de una línea celular reportera estable.

Los indicadores importantes para una línea celular reportera son la multiplicidad de activación en respuesta a una molécula de prueba, así como el nivel de activación de fondo.

Se produjo una línea celular reportera estable utilizando la línea celular HEK293 (ATCC CRL-1573, EE.UU.) que se transfectó con un vector plasmídico que comprendía la construcción reportera del Ejemplo 1. El pool estable resultante se clonó mediante clonación por dilución limitante. Para cribar las líneas clonales HEK293_STAT3-STAT5-AP1_FLuc, realizamos un ensayo de activación de la expresión de luciferasa. Las células se sembraron a 1×10^5 células por pocillo en placas de 96 pocillos, y se añadió un activador PMA de 33 nM hasta el volumen final de 150 μ l en un pocillo. Todas las soluciones se prepararon en medio de crecimiento DMEM suplementado con 10% de suero bovino fetal, 2 mM de L-glutamina y 10 μ g/ml de gentamicina. La placa se incubó durante 24 horas a 37 °C en una atmósfera húmeda en presencia de un 5% de CO_2 . Tras la incubación, se vaciaron los pocillos y se añadieron 100 μ l de sustrato de luciferina con un

componente de lisado; la placa se dejó en la oscuridad durante 10 minutos, tras lo cual se detectó el nivel de luminiscencia con un lector de placas utilizando el paquete de software SparkControl V2.1 (Tecan, Austria).

De este modo se produjo una línea celular reportera que muestra una alta multiplicidad de activación y un bajo nivel de activación de fondo (Fig. 6).

Ejemplo 5. Producción de línea reportera específica para IL10.

Para evaluar la línea reportera en un ensayo celular específico, expresamos el receptor de IL-10 en la superficie de las células reporteras. Para ello, la línea celular reportera HEK293_STAT3-STAT5-AP1_FLuc producida en el Ejemplo 4 se transfectó con vectores plasmídicos que codifican subunidades receptoras de IL-10 producidas en el Ejemplo 2. Para cribar las líneas clonales reporteras que expresan el receptor de IL10, realizamos un ensayo de activación de la expresión de luciferasa descrito en el Ejemplo 3. Como activador se utilizó la IL10 humana recombinante a una concentración de 100 ng/ml.

El cribado y la selección de clones en función de la multiplicidad de activación dieron como resultado una línea reportera específica de IL10 basada en una línea universal (Fig. 7).

Ejemplo 6. Prueba de determinación de la actividad de la IL10

Las líneas reporteras se utilizan para evaluar la actividad de los medicamentos candidatos. Realizamos un ensayo de activación de la expresión de luciferasa en respuesta a varias concentraciones del activador de IL10 que se muestran en el gráfico. El diseño de la prueba se ha descrito en el ejemplo 3.

Finalmente, observamos una respuesta dependiente de la dosis de la línea celular reportera a un activador específico (Fig. 8).

Ejemplo 7. Creación de la línea celular reportera HEK293_STAT3-STAT5-AP1_FLuc_AXL para evaluar la activación de la señalización intracelular mediada por AXL con el producto Gas6 STAT3-STAT5-AP1,

sobre la base de la línea celular reportera universal HEK293_STAT3-STAT5-AP1_FLuc.

Para generar la línea celular reportera HEK293_STAT3-STAT5-AP1_FLuc_AXL, utilizamos tres clones de la línea celular reportera universal HEK293_STAT3-STAT5-AP1_FLuc: cl. D1, cl. B3 y cl. C4#2; sobre la base de ellos, produjimos, respectivamente, 3 grupos de células con un gen receptor de AXL constitucionalmente expresado. Se probó la activación de estos grupos mediada por AXL. La prueba se realizó en una placa de cultivo de 96 pocillos diseñada para ensayos de luminiscencia. La suspensión contenía en cada pocillo 30.000 células HEK293_STAT3-STAT5-AP1_FLuc_AXL y el ligando AXL GAS6 a las concentraciones indicadas en la Fig. 9. El volumen final de la suspensión celular en un pozo fue de 100 µl, todos los componentes de la suspensión se prepararon en medio DMEM libre de suero bovino fetal. Después de añadir todos los componentes, la placa se incubó durante 16 horas a 37°C, 5% CO₂, y luego, utilizando un kit de ensayo de luminiscencia, medimos la intensidad de la luminiscencia en los pozos. La medición se realizó con un lector de placas. El nivel de activación se calculó como la relación entre el nivel de luminiscencia de un determinado pool en presencia de GAS6 y el nivel de luminiscencia en ausencia de GAS6.

Ejemplo 8. Prueba de varios productos GAS6 para la activación mediada por AXL de STAT3-STAT5-AP1 en la línea celular reportera HEK293_STAT3-STAT5-AP1_FLuc_AXL.

El ensayo se realizó de forma similar al procedimiento descrito en el Ejemplo 7 (en presencia de GAS6 a una concentración de 2 µg/ml); para la activación, se utilizó HEK293_STAT3-STAT5-AP1_FLuc_AXL (el pool producido sobre la base de la línea celular HEK293_STAT3-STAT5-AP1_FLuc: cl. D1, véase el ejemplo 7) y diversas preparaciones de GAS6 en la concentración indicada en el gráfico (Fig. 10).

Ejemplo 9. Análisis de la activación mediada por AXL de clones HEK293_STAT3-STAT5-AP1_FLuc_AXL.

A partir de pools producidos en base a las líneas celulares HEK293_STAT3-STAT5-AP1_FLuc: cl. D1, cl. B3 y cl. C4#2 (véase el Ejemplo 7), seleccionamos clones individuales que mostraron una activación dependiente de GAS6 en el ensayo (realizado de forma similar al del Ejemplo 7 en presencia de GAS6 a una concentración de 2 µg/ml). Los clones que mostraron el mayor nivel de activación se seleccionaron a partir de un conjunto de células producidas sobre la base de cl. D1. Los niveles de activación en una de las placas de 96 pocillos que contienen varios clones del pool dado y el propio pool inicial se muestran en la Tabla 1; muestra las activaciones en relación con las células no activadas, el pocillo H11 corresponde al pool. El color gris indica un pozo correspondiente al clon HEK293_STAT3-STAT5-AP1_FLuc_AXL (cl.13) utilizado para el estudio posterior.

Tabla 1. Niveles de activación dependiente de GAS6 del pool y de clones individuales 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

Ejemplo 10. Estudio de la activación de la línea celular reportera HEK293_STAT3-STAT5-AP1_FLuc_AXL en función del tiempo de incubación en presencia de GAS6.

El ensayo se realizó de forma similar al procedimiento descrito en el Ejemplo 7, se utilizaron las células de la línea reportera HEK293_STAT3-STAT5-AP1_FLuc_AXL (cl.13) y GAS6 a una concentración de 2 µg/ml (Fig. 11) para su

activación; tras añadir todos los componentes, se incubó la placa durante el tiempo indicado en el gráfico, determinándose entonces la intensidad de luminiscencia en los pocillos. El nivel de activación se calculó como la relación entre el valor de luminiscencia en presencia de dicha concentración de GAS6 y el de la ausencia de la variante de GAS6 con el mismo tiempo de incubación. El mayor nivel de activación se observó durante la incubación de 24 horas.

Ejemplo 11. Generación de una línea celular reportera basada en la línea celular natural Du145 para evaluar la activación de la señalización intracelular STAT3-STAT5-AP1 mediada por AXL.

Para comprobar la activación de la proliferación de las células Du145 con el ligando AXL GAS6 (Fig. 12), utilizamos la línea celular Du145, un expresador natural de AXL. El ensayo se realizó en una placa de cultivo de 96 pocillos para cultivos de adhesión. La suspensión contenía en cada pocillo 5.000 células Du145 y el ligando AXL GAS6 a una concentración indicada en el gráfico. El volumen final de la suspensión celular en un pozo fue de 100 μ l, todos los componentes de la suspensión se prepararon en medio DMEM con 0,3% de suero bovino fetal. Después de añadir todos los componentes, la placa se incubó durante 72 horas a 37 °C, 5% deCO₂, y a continuación se añadieron 10 ml de reactivo Alamar Blue a cada pocillo, se agitó la pastilla en un agitador orbital y se incubó a 37 °C, 5% deCO₂ durante 6 horas. La fluorescencia se midió a una longitud de onda de excitación de 544 nm y a una longitud de onda de emisión de 590 nm utilizando un lector de placas.

Produjimos clones estables de células Du145 que comprenden el gen STAT3-STAT5-AP1_FLuc que codifica la luciferasa de luciérnaga bajo el control del promotor STAT3-STAT5-AP1 para generar una línea celular reportera sensible a la activación dependiente de GAS6 de la señalización de AXL basada en la línea celular natural que expresa AXL.

Se seleccionaron los clones que mostraron activación en la prueba (Fig. 13-15). La prueba se realizó en una placa ELISA de 96 pocillos. Un día antes del experimento, se inmovilizó el ligando AXL GAS6 en plástico: preparamos una

solución de GAS6 a una concentración de 5 µg/ml en DPBS, y se añadieron 100 µl en cada pocillo de la placa. La placa se incubó durante 16 horas a 37 °C con un 5% de CO₂. A continuación, añadimos una suspensión de 50.000 células Du145_STAT3-STAT5-AP1_FLuc. El volumen final de la suspensión celular fue de 100 µl por pocillo. Tras la adición de la suspensión celular, la placa se incubó durante 16 horas a 37°C, 5% de CO₂, y luego, utilizando un kit de ensayo de luminiscencia, medimos la intensidad de la luminiscencia en los pocillos. La medición se realizó con un lector de placas.

Ejemplo 12. Creación de la línea celular reportera HEK293_AXL_STAT3-STAT5-AP1_FLuc basada en la línea celular HEK-293-AXL que sobreexpresa AXL para evaluar la activación de la señalización intracelular STAT3-STAT5-AP1 mediada por AXL.

Para crear la línea celular reportera HEK293_AXL_STAT3-STAT5-AP1_FLuc, utilizamos la línea celular HEK293_AXL, una sobreexpresora de AXL, a partir de la cual produjimos un conjunto de células que incluían un gen que codificaba luciferasa de luciérnaga bajo el control del promotor STAT3-STAT5-AP1. A continuación, se seleccionaron clones individuales de este pool, que mostraron activación en la prueba (Fig. 16). El ensayo se realizó de forma similar al procedimiento descrito en el Ejemplo 7, con una concentración de GAS6 de 2 µg/ml. El nivel de activación se calculó como la relación entre el valor de luminiscencia para el clon dado en presencia de GAS6 y el de la ausencia de GAS6.

Ejemplo 13. Estudio de la activación de la línea celular reportera HEK293_AXL_STAT3-STAT5-AP1 en función del número de células.

El ensayo se realizó de forma similar al procedimiento descrito en el Ejemplo, 7 a una concentración de GAS6 de 2 µg/ml, se utilizaron células de la línea reportera HEK293_AXL_STAT3-STAT5-AP1 para la activación, con el recuento de células por pocillo de una placa de 96 pocillos como se muestra en el gráfico (Fig. 17). El

mayor nivel de activación se observó cuando el pozo contenía entre 25.000 y 50.000 células de la línea reportera.

Reivindicaciones

1. Un promotor inducible que comprende sitios de unión de los factores de transcripción STAT3, STAT5 y AP-1 y un promotor mínimo.

2. El promotor inducible según la reivindicación 1, en el que el sitio de unión del factor de transcripción STAT3 es una secuencia de nucleótidos seleccionada de un grupo de secuencias de nucleótidos que incluyen SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3.

3. El promotor inducible según la reivindicación 1, en el que el sitio de unión del factor de transcripción STAT5 es una secuencia de nucleótidos seleccionada de un grupo de secuencias de nucleótidos que incluyen SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 6.

4. El promotor inducible según la reivindicación 1, en el que el sitio de unión del factor de transcripción de la familia AP-1 es una secuencia de nucleótidos seleccionada de entre un grupo de secuencias de nucleótidos que incluyen SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 o SEQ ID NO: 9.

5. El promotor inducible según la reivindicación 1, en el que los sitios de unión de los factores de transcripción STAT3, STAT5 y AP-1 están dispuestos del extremo 5' al extremo 3' uno tras otro en el siguiente orden STAT3-STAT5-AP-1.

6. El promotor inducible según la reivindicación 5, en el que los sitios de unión de los factores de transcripción STAT3, STAT5 y AP-1 están dispuestos del extremo 5' al extremo 3' uno tras otro en el siguiente orden STAT3-STAT5-AP-1, y comprenden una secuencia de nucleótidos seleccionada de un grupo de secuencias de nucleótidos que incluyen SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 o SEQ ID NO: 12.

7. El promotor inducible según la reivindicación 1, en el que los sitios de unión de los factores de transcripción STAT3, STAT5 y AP-1 comprenden la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 13.

8. El promotor inducible según la reivindicación 1, en el que el promotor mínimo comprende una caja TATA.

9. El promotor inducible según la reivindicación 1, en el que el promotor mínimo comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 14.

10. Un vector de expresión inducible que comprende, en dirección del extremo 5' al extremo 3', el promotor inducible según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 y un gen reportero.

11. El vector de expresión inducible según la reivindicación 10, en el que el gen reportero es un gen de la proteína luciferasa de luciérnaga.

12. El vector de expresión inducible según la reivindicación 11, en el que el gen de la proteína luciferasa de luciérnaga comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 15.

13. El vector de expresión inducible según la reivindicación 10, que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 16.

14. Un método para producir una célula huésped para analizar la actividad de la proteína diana, que comprende transformar la célula con el vector de expresión inducible según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13.

15. Una célula huésped para analizar la actividad de la proteína diana que comprende el promotor inducible según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 y un gen reportero.

16. La célula huésped según la reivindicación 15, en la que el gen reportero es un gen de la proteína luciferasa de luciérnaga.

17. La célula huésped según la reivindicación 16, en la que el gen de la proteína luciferasa de luciérnaga comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 15.

18. La célula huésped según la reivindicación 15, que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 16.

19. La célula huésped según la reivindicación 15, en la que la proteína diana es un ligando del receptor.

20. La célula huésped según la reivindicación 19, en la que el ligando del receptor es una citocina.

RESUMEN

La presente invención se refiere a los campos de la biotecnología y la biología molecular, en particular a un promotor inducible universal, un vector y una célula huésped basada en él, así como a un método para producir dicha célula huésped. Las invenciones propuestas permiten analizar la actividad de una proteína objetivo, por ejemplo, un ligando del receptor, por ejemplo, una citoquina.