

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **034306**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.01.27

(51) Int. Cl. **C04B 40/02** (2006.01)

(21) Номер заявки
201790725

(22) Дата подачи заявки
2015.10.16

**(54) ОСНОВАННЫЕ НА БЛИЗОСТИ РАСПОЛОЖЕНИЯ СПОСОБЫ ВЫБОРА ПАРТНЕРОВ
ДЛЯ СВЯЗЫВАНИЯ**

(31) **62/066,105**

(32) **2014.10.20**

(33) **US**

(43) **2018.01.31**

(86) **PCT/US2015/055941**

(87) **WO 2016/064673 2016.04.28**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ЗЕ СКРИППС РИСЕРЧ
ИНСТИТЮТ (US)**

(72) Изобретатель:
**Лернер Ричард А., Чжан Хункай, Се
Цзя (US)**

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(56) ZHANG et al. "Selecting agonists from single cells infected with combinatorial antibody libraries", Chem. Biol., 23 May 2013 (23.05.2013), Vol. 20, Pgs. 734-41, entire document

XIE et al. "Autocrine signaling based selection of combinatorial antibodies that transdifferentiate human stem cells", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 14 May 2013 (14.05.2013), Vol. 110, Pgs. 8099-104, entire document

BARNEA et al. The genetic design of signaling cascades to record receptor activation", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 28 December 2007 (28.12.2007), Vol. 105, Pgs. 64-9, entire document

US-A1-20130045871

WO-A2-2009009045

ZHANG et al. "A proximity based general method for identification of ligand and receptor interactions in living cells", Biochem. Biophys. Res. Commun., 24 October 2014 (24.10.2014), Vol. 454, Pgs. 251-5, entire document

(57) В изобретении предложены способы идентификации партнеров для связывания (например, пептидных лигандов), которые связываются с целевым белком (например, клеточным рецептором). Указанные способы предусматривают совместно локализованную экспрессию целевого белка и потенциальных партнеров для связывания и выбор партнеров для связывания на основании близости расположения в плазматической мембране.

034306

B1

034306

B1

Перекрестные ссылки на родственные заявки

Заявка на патент испрашивает приоритет на основании предварительной заявки на патент США № 62/066105 (поданной 20 октября 2014 г.). Указанная предварительная заявка включена в настоящий документ посредством ссылки полностью и для любых целей.

Уровень техники

Внутриклеточные комбинаторные библиотеки являются очень перспективными с точки зрения получения новых агонистов и других молекул, изменяющих физиологию клетки. При этом имеется потребность в универсальном механизме считывания, обеспечивающем количественную оценку в широком динамическом диапазоне. Так, существующие способы отбора для идентификации агонистов в растворе обычно зависят от их взаимодействия с рецепторами, которое изменяет их физическое состояние таким образом, что они активируют домен внутриклеточной передачи сигнала, который соединен с негативной репортерной системой. Соответственно, для каждой репортерной системы требуется отдельная конструкция, природа которой зависит от специфической информации о клеточной и молекулярной биологии рассматриваемой системы. Такая схема выбора не может обеспечить получения систем, способных регистрировать происходящее связывание, в частности, в тех случаях, когда неизвестен механизм передачи сигнала.

В данной области техники имеется потребность в более динамичных и универсальных основанных на происходящем связывании способах отбора лигандов. Настоящее изобретение направлено на удовлетворение указанной и других имеющихся в данной области техники потребностей.

Краткое описание изобретения

Изобретение обеспечивает способы идентификации партнера для связывания, который связывается с целевым полипептидом в естественной клеточной среде. Согласно некоторым способам указанный целевой полипептид коэкспрессируют в клетке вместе с комбинаторной библиотекой потенциальных партнеров для связывания с применением лентивирусного вектора. Согласно некоторым способам указанные потенциальные партнеры для связывания содержат фермент, который расщепляет сигнальную молекулу, соединенную с целевым полипептидом, обеспечивая передачу сигнала в синтетическую репортерную систему в клетке.

Согласно некоторым вариантам реализации предложенные в настоящем изобретении способы предусматривают: (a) получение первой конструкции, экспрессирующей первую гибридную молекулу, содержащую целевой полипептид, содержащий первый трансмембранный домен (ТМ), и второй конструкции, экспрессирующей комбинаторную библиотеку вторых гибридных молекул, в каждой из которых содержится потенциальный партнер для связывания, присоединенный ко второму трансмембранному домену (ТМ), при этом одна из указанных гибридных молекул дополнительно содержит фермент, а другая гибридная молекула дополнительно содержит последовательность субстрата указанного фермента и активатор искусственного сигнального пути, (b) экспрессию указанной первой конструкции и указанной второй конструкции в клетке-хозяине для получения популяции клеток, при этом каждая клетка содержит первую гибридную молекулу и вторую гибридную молекулу, которые совместно локализованы (ко-локализованы) на плазматической мембране, (c) выбор клетки, в которой активирован искусственный сигнальный путь, из популяции клеток, и (d) идентификацию второй гибридной молекулы в выбранной клетке. Идентифицированная вторая гибридная молекула из выбранной клетки обеспечивает обнаружение партнера для связывания целевого полипептида.

Согласно некоторым из указанных способов указанный первый трансмембранный домен (ТМ) представляет собой природный домен целевого полипептида. Согласно некоторым способам указанный первый трансмембранный домен (ТМ) рекомбинантным способом присоединен к указанному целевому полипептиду. Согласно некоторым способам указанный фермент соединен через свой N-конец с вторым трансмембранным доменом, а указанная последовательность субстрата соединена с первым трансмембранным доменом через свой N-конец и с указанным активатором через свой C-конец. Согласно некоторым способам расщепление указанной последовательности субстрата ферментом приводит к отсоединению активатора от второй гибридной молекулы. Согласно некоторым способам указанный целевой полипептид представляет собой клеточный рецептор, а указанный партнер для связывания представляет собой лиганд указанного рецептора. Согласно некоторым из указанных способов указанный клеточный рецептор представляет собой рецептор клеточной поверхности, а указанный второй трансмембранный домен представляет собой трансмембранный домен рецептора тромбоцитарного фактора роста (pTФР, PDGFR, platelet-derived growth factor receptor). Некоторые из указанных способов направлены на сопряженные с G-белками рецепторы (GPCR). Некоторые из указанных способов направлены, в частности, на рецептор тромбопоэтина (pТПО, TpoR) или рецептор глюкагоноподобного пептида-1 (pГПП-1).

Некоторые предложенные в изобретении способы предусматривают использование фермента, представляющего собой протеазу. Согласно некоторым из указанных способов последовательность субстрата содержит сайт расщепления протеазы. Согласно некоторым из указанных способов указанная используемая протеаза представляет собой TEV-протеазу. Согласно некоторым из указанных способов указанная используемая последовательность субстрата включает

ENLYFQS (SEQ ID NO:4) (TEV1), ENFYFQS (SEQ ID NO:5) (TEV2), ENLYYQS (SEQ ID NO:6) (TEV3) или ENLFFQS (SEQ ID NO:7) (TEV 4).

Некоторые предложенные в настоящем изобретении способы предусматривают использование клетки-хозяина, которая представляет собой клетку HEK293 или HEK293T. Согласно некоторым способам указанная клетка-хозяин стабильно экспрессирует указанную первую гибридную молекулу. Согласно некоторым из указанных способов указанную вторую гибридную молекулу экспрессируют в клетке-хозяине с помощью лентивирусного вектора.

Согласно некоторым способам согласно настоящему изобретению используемый потенциальный партнер для связывания представляет собой пептид или антитело. Согласно некоторым способам указанный потенциальный партнер для связывания соединен с вторым трансмембранным доменом с помощью линкерной последовательности. Согласно некоторым из указанных способов указанная линкерная последовательность может содержать 3, 5, 6, 8, 10 или более tandemных повторов GGGGS (SEQ ID NO: 1).

Согласно некоторым способам согласно настоящему изобретению указанный активатор представляет собой транскрипционный фактор, а указанный искусственный сигнальный путь представляет собой экспрессию репортерного гена под контролем последовательности регуляции транскрипции, распознаваемой указанным транскрипционным фактором. Согласно некоторым из указанных способов указанный репортерный ген вводят в клетку-хозяина с помощью лентивирусного вектора. Согласно некоторым способам указанный репортерный ген вводят в клетку-хозяина до экспрессии гибридных молекул. Согласно некоторым способам указанный транскрипционный фактор представляет собой GLA4-V16, а указанная последовательность регуляции транскрипции содержит GAL4 UAS и поздний аденовирусный промотор. Согласно некоторым способам указанный используемый репортерный ген представляет собой ген люциферазы luc2P или репортерный ген tdTomato.

Лучшее понимание природы настоящего изобретения и обеспечиваемых им преимуществ может быть достигнуто путем ознакомления с остальными разделами настоящего описания и прилагаемой формулой изобретения.

Описание чертежей

Фиг. 1 - схематическое представление способа мониторинга взаимодействия, основанного на близости расположения (proximity based) рецептора с лигандом. (А) Мембранный белок сопряжен со специфическим путем передачи сигнала таким образом, что после стимуляции указанного мембранного белка растворимым или мембраносвязанным агонистом активируется экспрессия репортерного гена. (В) Основанная на близости расположения система выбора состоит из двух мембраносвязанных белков. Первый из указанных белков представлен большой библиотекой мембраносвязанных потенциальных лигандов, присоединенных к протеазе TEV с внутриклеточной стороны. Далее, мембраносвязанный рецепторный белок содержит сайт расщепления TEV и искусственный транскрипционный фактор, присоединенный к нему с внутриклеточной стороны. В результате взаимодействия совместно локализованных рецепторного белка и лиганда, TEV и сайт распознавания TEV сближаются, что в значительной степени облегчает каталитическое высвобождение указанного транскрипционного фактора. Высвобождаемый транскрипционный фактор проникает в клеточное ядро, и активируется экспрессия репортерного гена;

фиг. 2 - основанная на близости расположения идентификация активации рецептора тромбопоэтина (рТПО). Получали стабильные линии клеток, несущих репортерный ген люциферазы под контролем UAS и сайт расщепления TEV рТПО/транскрипционный фактор. Клетки трансдуцировали лентивирусом, кодирующим связывающие тромбопоэтин (ТПО) или рТПО антитела 3D9 или 14F12. Гены, кодирующие разные линкеры, включающие 3, 5, 6, 8 или 10 копий (GGGGS) (SEQ ID NO: 1) или Fc IgG1 человека встраивали между лигандом и трансмембранным доменом рТФР. Активность люциферазы измеряли через 2 дня после инфицирования. Линию клеток, несущих сайт расщепления TEV рГПП-1/транскрипционный фактор, использовали в качестве клеток для отрицательного контроля. Реакцию контролировали на основании изменения люминесцентных сигналов относительно контрольного лентивируса, несущего нерелевантные антитела с линкером того же типа и длины;

фиг. 3А - основанная на близости расположения реакция на рецептор глюкагоноподобного пептида-1 (рГПП-1). Полноразмерный рГПП-1 (1-463) и усеченный рГПП-1 (1-426) соединяли с сайтом расщепления TEV и транскрипционным фактором на С-конце. Получали стабильные линии клеток, несущих репортерный ген люциферазы под контролем UAS, и разные конструкции рГПП-1. Клетки трансдуцировали лентивирусом, кодирующим естественный лиганд рГПП-1, эксендин-4, в качестве положительного контроля, или нерелевантные антитела в качестве отрицательного контроля. Активность люциферазы измеряли через 1-3 дня после инфицирования. Люминесцентные сигналы от инфицированных клеток разделяли на сигналы от соответствующих неинфицированных клеток с получением отношения сигнал/шум (С/Ш);

фиг. 3В - увеличение значения отношения сигнал/шум за счет изменения сайта расщепления TEV. Для конструкций с рГПП-1 (1-426) использовали четыре сайта расщепления TEV, расщепляемые с варьирующей эффективностью. Стабильные линии клеток, содержащие конструкции рГПП-1 с разными последовательностями субстрата TEV, трансдуцировали лентивирусом, кодирующим естественный лиганд рГПП-1, эксендин-4, в качестве потенциально обеспечивающей положительный результат конструкции, или Vc1.1 или нерелевантные антитела в качестве отрицательного контроля. Активность люциферазы измеряли через 1-3 дня после инфицирования. Люминесцентные сигналы от инфицированных клеток разделяли на сигналы от соответствующих неинфицированных клеток;

фиг. 4 - флуоресцентные белки в качестве репортерных генов для основанного на близости расположения способа. Исследовали стабильные линии клеток, содержащих репортерный ген tdTomato под контролем UAS и конструкции рГПП-1 с разными сайтами расщепления TEV. Указанные клетки трансдуцировали лентивирусом, содержащим эксендин-4 в качестве обеспечивающей положительный результат конструкции или нерелевантные антитела в качестве отрицательного контроля. Селективную экспрессию флуоресцентного белка наблюдали через 2 дня после инфицирования.

Подробное описание изобретения

I. Общая информация.

В изобретении предложены способы идентификации партнеров для связывания целевых белков или полипептидов. Целевой белок может представлять собой любой белок или полипептид, способный связываться с другой полипептидной или пептидной молекулой, например рецепторами клеточной поверхности, ядерными рецепторами и другими лигандсвязывающими белками. Указанные способы основаны на совместно локализованной (колокализованной) экспрессии целевого белка (например, клеточного рецептора) с потенциальными партнерами для связывания (например, потенциальными полипептидными лигандами), и осуществлении выбора в основанном на близости расположения формате. Настоящее изобретение частично основано на полученной авторами настоящего изобретения универсальной системе идентификации лигандов клеточных рецепторов. В указанной системе используется увеличение скорости химических процессов, вызванное эффектами близости - пространственным сближением лиганда и его рецептора. В указанной системе используется искусственный путь передачи сигнала; соответственно, она не зависит от конкретной химической природы системы рецептор/лиганд или соответствующего механизма передачи сигнала. Указанный способ обеспечивает возможность аутокринного выбора молекул из больших библиотек, взаимодействующих с рецепторами при нахождении в естественной среде. Согласно подробному описанию в настоящем документе, в настоящем изобретении предложен новый универсальный способ детекции активности связывания лигандов с рецепторами. В частности, это имеет большое значение в ситуациях, когда механизм дальнейшей передачи сигнала неизвестен.

Эффекты близости (proximity effects), выражающиеся в форме эффективной молярности, регулируют многие биологические процессы в клетке. Такие эффекты близости могут достигаться за счет компартиментализации, прикрепления к поддерживающим молекулам или секвестрации в активных сайтах фермента. Эффективная молярность может составлять до $100\text{-}10^{10}$ М. В настоящем изобретении выбор подходящей системы фермент/субстрат, оптимальной затрудненности реакции и оптимизированной длины линкеров обеспечивает получение надежной универсальной системы, которая может применяться для конструирования репортерной системы для большинства мембранных рецепторов и других связывающих белков. В отличие от уже известных в данной области техники способов выбора, основанные на близости расположения репортерные системы согласно настоящему изобретению используют исключительно наличие или отсутствие взаимодействия между двумя молекулами, и не зависят от дальнейших условий конкретных естественных путей. Вместо этого указанная система соединена с универсальной репортерной системой, на химические характеристики которой эффекты близости влияют положительным образом, по сравнению с конкурентными реакциями. Соответственно, в контексте сложной системы, такой как клетка, индуцированная эффективная молярность становится показателем специфичности, способствующей определенному взаимодействию.

Согласно подробно описанному в настоящем документе, способы согласно настоящему изобретению предусматривают использование внутриклеточных комбинаторных библиотек потенциальных партнеров для связывания, а также экспрессионной системы, в которой указанный потенциальный партнер для связывания и представляющий интерес белок (например, целевой рецептор) совместно локализованы в клеточных компартментах (например, плазматической мембране). Указанные внутриклеточные комбинаторные библиотеки могут экспрессировать до $1,0 \times 10^8$ разных антител или пептидов в клетках, также экспрессирующих представляющий интерес белок. Указанная экспрессионная система позволяет добиться секвестрации и более высоких показателей эффективной молярности взаимодействующих молекул относительно возможных при их взаимодействии в основном растворе. Кроме того, используют репортерную фермент-субстратную систему, которая может использовать преимущества указанного молекулярного взаимодействия в плазматической мембране и регистрировать его возникновение. Фермент-субстратную систему конструируют таким образом, что она применима к любым молекулярным взаимодействиям в клеточных компартментах.

Лучшее понимание природы настоящего изобретения и обеспечиваемых им преимуществ может быть достигнуто путем ознакомления с остальными разделами настоящего описания и прилагаемой формулой изобретения.

II. Определения.

Если не указано иное, все используемые в настоящем документе технические и научные термины имеют значения, общеизвестные для специалистов в области техники, к которой относится настоящее изобретение. Специалист может ознакомиться с общими определениями многих терминов, используемых в настоящем описании, в следующих источниках: Academic Press Dictionary of Science and Technology, Morris (Ed.), Academic Press (1st ed., 1992); Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology, Smith et al. (Eds.), Oxford University Press (перевод, 2000); Encyclopaedic Dictionary of Chemistry, Kumar (Ed.), Anmol Publications Pvt. Ltd. (2002); Dictionary of Microbiology and Molecular Biology, Singleton et al. (Eds.), John Wiley & Sons (3rd ed., 2002); Dictionary of Chemistry, Hunt (Ed.), Routledge (1st ed., 1999); Dictionary of Pharmaceutical Medicine, Nahler (Ed.), Springer-Verlag Telos (1994); Dictionary of Organic Chemistry, Kumar and Anandand (Eds.), Anmol Publications Pvt. Ltd. (2002); и A Dictionary of Biology (Oxford Paperback Reference), Martin and Hine (Eds.), Oxford University Press (4th ed., 2000).

Кроме того, чтобы помочь читателю при практическом осуществлении настоящего изобретения, предложены приведенные ниже определения.

Если не указано иное, все используемые в настоящем документе технические и научные термины имеют значения, общеизвестные для специалистов в области техники, к которой относится настоящее изобретение. Специалист может ознакомиться с общими определениями многих терминов, используемых в настоящем описании, в следующих источниках: Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology, Smith et al. (eds.), Oxford University Press (перевод, 2000); Dictionary of Microbiology and Molecular Biology, Singleton et al. (Eds.), John Wiley & Sons (3rd ed., 2002); и A Dictionary of Biology (Oxford Paperback Reference), Martin and Hine (Eds.), Oxford University Press (4th ed., 2000). Кроме того, чтобы помочь читателю при практическом осуществлении настоящего изобретения, предложены приведенные ниже определения.

Приведенные в единственном числе термины, в том числе с дополнением "указанный (ая, ое)" включают соответствующие термины во множественном числе, если из контекста явным образом не следует иное. Аналогичным образом, предполагается, что термин "или" включает "и", если из контекста явным образом не следует иное.

В настоящем документе термин "аминокислота" пептида относится к встречающимся в природе и синтетическим аминокислотам, а также аналогам аминокислот и миметикам аминокислот, которые функционируют аналогичным встречающимся в природе аминокислотам образом. Встречающиеся в природе аминокислоты представлены аминокислотами, закодированными в генетическом коде, а также аминокислотами, которые были впоследствии модифицированы, например, гидроксипролином, γ -карбоксиглутаматом и О-фосфосерином. Аналоги аминокислот относятся к соединениям, имеющим ту же основную химическую структуру, что и встречающаяся в природе аминокислота, т.е. содержащим атомы углерода, связанные с атомами водорода, карбоксильную группу, аминогруппу и R-группу, например, гомосерин, норлейцин, метионинсульфоксид, метионинметилсульфоний. Такие аналоги содержат модифицированные R-группы (например, норлейцин) или модифицированные пептидные остовы, однако сохраняют ту же основную химическую структуру, что и встречающаяся в природе аминокислота.

В настоящем документе термин "содержащие" или "содержит" применяют в отношении композиций, способов и соответствующего(их) им компонента(ов), существенных для настоящего изобретения, но, тем не менее, он не подразумевает исключения не указанных элементов, независимо от того, являются ли они существенными или нет.

В настоящем документе термин "состоящий, по существу, из" относится к элементам, необходимым для осуществления определенного варианта реализации. Указанный термин предусматривает возможность присутствия элементов, которые не оказывают существенного влияния на основную новую или функциональную характеристику (характеристики) указанного варианта реализации изобретения.

Термин "состоящий из" относится к композициям, способам и соответствующим им компонентам, описанным в настоящем документе, и исключает любые элементы, не представленные в указанном описании варианта реализации.

Термин "приведение в контакт" имеет обычное значение и относится к комбинированию двух или большего числа агентов (например, полипептидов или малых органических молекул), комбинированию агентов и клеток, или комбинированию двух популяций разных клеток. Контакт может происходить *in vitro*, например, при смешивании двух полипептидов или смешивании популяции антител с популяцией клеток в пробирке или в ростовой среде. Контакт может также происходить в клетке или *in situ*, например, при приведении в контакт двух полипептидов в клетке путем коэкспрессирования в указанной клетке рекомбинантных полинуклеотидов, кодирующих указанные два полипептида, или в клеточном лизате.

В случае последовательностей полипептидов "консервативно модифицированные варианты" относятся к варианту, содержащему консервативные замены аминокислот, замены остатков аминокислот на

другой остаток аминокислоты, содержащий боковую цепь с аналогичным зарядом. Семейства остатков аминокислот с боковыми цепями, имеющими аналогичные заряды, были определены в данной области техники. Указанные семейства включают аминокислоты с основными боковыми цепями (например, лизин, аргинин, гистидин), кислыми боковыми цепями (например, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота), незаряженными полярными боковыми цепями (например, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин), неполярными боковыми цепями (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан), бета-разветвленными боковыми цепями (например, треонин, валин, изолейцин) и ароматическими боковыми цепями (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин).

Термин "сконструированная клетка", или "рекомбинантная клетка-хозяин" (или просто "клетка-хозяин") относится к клетке, в которую был введен рекомбинантный экспрессионный вектор. Следует понимать, что такие термины предназначены для обозначения не только конкретной рассматриваемой клетки, но и всего потомства такой клетки. Поскольку в последующих поколениях могут происходить определенные модификации ввиду мутаций или воздействия окружающей среды, такое потомство фактически может не быть идентичным родительской клетке, однако при этом входит в объем термина "клетка-хозяин" в настоящем документе.

Эксендин-4 представляет собой агонист рецептора глюкагоноподобного пептида-1 (ГПП-1) размером 39 аминокислот. Эксендин-4 присутствует в слюне ящерицы-ядозуба, *Heloderma suspectum*. Эксендин-4 отличается значимо более продолжительным периодом полувыведения относительно ГПП-1.

"Гибридный" белок или полипептид относится к полипептиду, состоящему по меньшей мере из двух полипептидов и связывающей последовательности, или функциональной связи между указанными двумя полипептидами, обеспечивающей образование одного непрерывного полипептида. Указанные два полипептида, объединенные в гибридный полипептид, как правило, происходят из двух независимых источников; соответственно, гибридный полипептид содержит два соединенных полипептида, которые обычно не объединяются в природе.

"Гетерологичный" в отношении двух полипептидов показывает, что указанные два полипептида не обнаруживаются в одной и той же клетке или в одном и том же микроорганизме в природе. Аллельные вариации или встречающиеся в природе мутационные явления не приводят к возникновению гетерологичной биомолекулы или последовательности согласно определению в настоящем документе. "Гетерологичная" область векторной конструкции представляет собой идентифицируемый сегмент полинуклеотида в составе большей полинуклеотидной молекулы, не обнаруживаемый в связанном с указанной большей молекулой состоянии в природе. Соответственно, в случаях, когда гетерологичная область кодирует ген млекопитающего, указанный ген обычно фланкирован полинуклеотидом, который не фланкирует указанный полинуклеотид генома млекопитающего в геноме исходного организма.

Термин "выделенный" означает, что полипептид или белок извлечен из естественного окружения. Однако некоторые из компонентов, обнаруживаемых совместно с указанным белком, могут по-прежнему быть обнаружены с "выделенным" белком. Соответственно, "выделенный полипептид" отличается от обнаруживаемого в природе, однако может представлять собой белок с чистотой, составляющей, по существу, менее 100%.

Термины "идентичный" или процент "идентичности" в контексте двух или большего числа нуклеиновых кислот или последовательностей полипептидов относятся к двум или большему числу одинаковых последовательностей или частей последовательностей. Две последовательности являются "по существу, идентичными" в том случае, если указанные две последовательности содержат определенный процент одинаковых остатков аминокислот или нуклеотидов (т.е. отличаются 60% идентичностью, необязательно 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или 99% идентичностью на протяжении определенной области, или, если уточнение отсутствует, на протяжении всей последовательности) при сравнении и выравнивании с достижением максимального совпадения в пределах окна сравнения или в пределах заданной области, по оценке с применением одного из перечисленных ниже алгоритмов сравнения последовательностей или неавтоматизированного выравнивания и визуального исследования. Необязательно, идентичность наблюдается на протяжении области, длина которой составляет по меньшей мере приблизительно 50 нуклеотидов (или 10 аминокислот), или, более предпочтительно, на протяжении области, длина которой составляет от 100 до 500 или 1000, или более нуклеотидов (или 20, 50, 200 или более аминокислот).

Способы выравнивания последовательностей для сравнения хорошо известны в данной области техники. Оптимальное выравнивание последовательностей для сравнения может быть проведено, например, с применением алгоритма локальной гомологии Смита и Ватермана (Smith and Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482c, 1970); с применением алгоритма гомологичного выравнивания Нидлмана-Вунша (Needleman and Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443, 1970); с применением метода поиска подобия Пирсона-Липмана (Pearson and Lipman, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85:2444, 1988); с применением компьютеризированных вариантов указанных алгоритмов (GAP, BESTFIT, FASTA и TFASTA из пакета программного обеспечения Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, Мэдисон, Висконсин); или с помощью неавтоматизированного выравнивания и визуального исследования (см., например, Brent et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc. (Ringbou ed., 2003)). Два примера алгоритмов, ко-

которые подходят для определения процента идентичности последовательностей и сходства последовательностей, представлены алгоритмами BLAST и BLAST 2.0, которые описаны в источниках: Altschul et al., Nuc. Acids Res. 25:3389-3402, 1977 и Altschul et al., J. Mol. Biol. 215 :403-410, 1990 соответственно.

Помимо процента идентичности последовательностей, описанного выше, другим свидетельством того, что две последовательности нуклеиновых кислот или полипептидов, по существу, идентичны, является иммунологическая перекрестная реактивность полипептида, кодируемого первой нуклеиновой кислотой, в отношении антител против полипептида, кодируемого второй нуклеиновой кислотой, согласно приведенному ниже описанию. Соответственно, полипептид, как правило, по существу, идентичен второму полипептиду, например, если указанные два пептида различаются только консервативными заменами. Другим свидетельством того, что две последовательности нуклеиновых кислот, по существу, идентичны, является то, что указанные две или комплементарные им молекулы гибридизуются друг с другом в жестких условиях, согласно приведенному ниже описанию. Еще одним свидетельством того, что две последовательности нуклеиновых кислот по существу идентичны, является возможность применения одинаковых праймеров для амплификации указанной последовательности.

"Лиганд" представляет собой молекулу, которую распознает конкретный антиген, рецептор или целевая молекула. Примеры лигандов, которые могут применяться при практической реализации настоящего изобретения, могут включать, не ограничиваясь перечисленными, агонисты и антагонисты клеточных мембранных рецепторов, токсины и яды, вирусные эпитопы, гормоны, рецепторы гормонов, полипептиды, пептиды, ферменты, субстраты ферментов, кофакторы, лекарственные средства (например, опиаты, стероиды и т.п.), лектины, сахара, полинуклеотиды, нуклеиновые кислоты, олигосахариды, белки и моноклональные антитела.

"Связь" относится к способам функционального связывания или функционального соединения двух биомолекул (например, полипептидов или полинуклеотидов, кодирующих два полипептида), включая, без ограничений, рекомбинантное слияние, ковалентное связывание, дисульфидные связи, ионные связи, водородные связи и электростатические связи. "Гибридный" или "конденсированный" относится к ковалентной связи. "Линкер" или "спейсер" относится к молекуле или группе молекул, соединяющих две биомолекулы, и служит для размещения указанных двух молекул в предпочтительной конфигурации с минимальными стерическими затруднениями.

Термин "функционально связанный" в отношении нуклеиновой кислоты относится к связи функционально взаимозависимых полинуклеотидных элементов. Нуклеиновая кислота "функционально связана", если она находится в отношениях функциональной взаимозависимости с другой последовательностью нуклеиновой кислоты. Например, промотор или энхансер функционально связан с кодирующей последовательностью, если он оказывает влияние на транскрипцию указанной кодирующей последовательности. "Функционально связанный" означает, что связанные последовательности ДНК, как правило, непрерывны и, в тех случаях, когда необходимо объединить две кодирующие белки области, непрерывны и расположены внутри рамки считывания.

Если не указано иное, термины "полипептид" и "пептид" используются в настоящем документе взаимозаменяемо и относятся к полимерам из остатков аминокислот. Они включают как короткие олигопептиды (например, пептиды, длина которых составляет менее чем приблизительно 25 остатков), так и более длинные полипептидные молекулы (например, полимеры, длина которых составляет более чем приблизительно 25 или 30 остатков аминокислот). Как правило, длина потенциальных пептидных или полипептидных лигандов, используемых в настоящем изобретении, может составлять от приблизительно 4 остатков аминокислот до приблизительно 350 или более остатков аминокислот. Согласно некоторым вариантам реализации длина указанных пептидов или полипептидов составляет от приблизительно 6 остатков аминокислот до приблизительно 60 остатков аминокислот. Согласно некоторым другим вариантам реализации их длина может составлять от приблизительно 8 остатков аминокислот до приблизительно 40 остатков аминокислот. Указанные пептиды или полипептиды могут включать встречающиеся в природе полимеры аминокислот и не встречающийся в природе полимер аминокислот, а также полимеры аминокислот, в которых один или большее количество остатков аминокислот представляют собой искусственный химический миметик соответствующей встречающейся в природе аминокислоты. Если не указано иное, подразумевается, что конкретная последовательность полипептида также охватывает соответствующие консервативным образом модифицированные варианты.

В настоящем документе термин "пептидный миметик" или "пептидомиметик" относится к производному соединению референсного пептида, имитирующему биологические функции указанного пептида. Как правило, производное пептидомиметика по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 75% или по меньшей мере на 90% обеспечивает биологическую функцию референсного полипептида.

Термин "функционально связанный" относится к функциональной взаимосвязи двух или более полинуклеотидных сегментов (например, сегментов ДНК). Как правило, указанный термин относится к функциональной взаимосвязи последовательности регуляции транскрипции с транскрибируемой последовательностью. Например, промоторная или энхансерная последовательность функционально связана с кодирующей последовательностью, если она стимулирует или модулирует транскрипцию указанной кодирующей последовательности в подходящей клетке-хозяине или другой экспрессионной системе. Как

правило, промоторные последовательности регуляции транскрипции, функционально связанные с транскрибируемой последовательностью, физически примыкают к указанной транскрибируемой последовательности, т.е. являются цис-действующими последовательностями. Однако некоторые последовательности регуляции транскрипции, такие как энхансеры, не обязательно должны физически примыкать к кодирующим последовательностям или быть расположены в непосредственной близости к кодирующим последовательностям, транскрипцию которых они повышают.

Если не указано иное, термин "рецептор" в широком смысле относится к молекуле, обладающей сродством к определенному лиганду. Рецепторы могут быть представлены встречающимися в природе или синтетическими молекулами. Они также могут применяться в неизменном состоянии или в виде агрегатов с другими веществами. Рецепторы могут присоединяться, ковалентно или нековалентно, с элементом для связывания, либо непосредственно, либо при помощи специфического связывающего вещества. Типичным примером рецепторов, которые могут применяться при практической реализации настоящего изобретения, является сигнальный рецептор клеточной поверхности.

Выражение "путь передачи сигнала" или "сигнальная активность" (например, опосредованная рГПП-1 сигнализация) относится по меньшей мере к одной биохимической реакции, однако чаще к серии биохимических реакций, происходящих в результате взаимодействия клетки со стимулирующим соединением или агентом. Соответственно, при взаимодействии стимулирующего соединения с клеткой возникает "сигнал", который передается по пути передачи сигнала, в конечном итоге приводя к клеточному ответу.

В настоящем документе термин "вариант" относится к молекуле (например, пептиду или полипептиду), которая содержит последовательность, по существу, идентичную последовательности референсной молекулы. Например, указанная референсная молекула может представлять собой полипептидный фермент согласно описанию в настоящем документе или его гибрид. Указанная референсная молекула может также представлять собой полинуклеотид, кодирующий указанный полипептид. Согласно некоторым вариантам реализации указанный вариант может отличаться последовательностью, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или более идентичной последовательности референсной молекулы. Согласно некоторым другим вариантам реализации указанный вариант отличается от референсной молекулы наличием одной или большего числа консервативных замен аминокислот. Согласно некоторым другим вариантам реализации вариант референсной молекулы представляет собой консервативно модифицированный вариант, например вариант с измененными последовательностями аминокислот (например, с одной или большим числом консервативных замен аминокислот), однако, по существу, сохраняет биологическую активность указанной референсной молекулы. Консервативные замены аминокислот хорошо известны специалисту в данной области техники.

Термин "вектор" предназначен для обозначения молекулы полинуклеотида, способной транспортировать другой полинуклеотид, к которому она была присоединена. Одним из типов векторов является "плазмида", представляющая собой кольцевую петлю двуцепочечной ДНК, в которую могут быть лигированы дополнительные сегменты ДНК. Другой тип векторов представлен вирусными векторами, отличающимися тем, что в вирусный геном могут быть лигированы дополнительные сегменты ДНК. Определенные векторы способны к автономной репликации в клетке-хозяине, в которую их вводят (например, бактериальные векторы, содержащие бактериальную точку начала репликации, и эпизомные векторы млекопитающих). Другие векторы (например, неэпизомные векторы млекопитающих) могут быть встроены в геном клетки-хозяина при введении в указанную клетку-хозяина; таким образом, они реплицируются вместе с геномом хозяина. Кроме того, определенные векторы способны направлять экспрессию генов, с которыми они функционально связаны. Такие векторы называются в настоящем документе "рекомбинантными экспрессионными векторами" (или просто "экспрессионными векторами").

III. Экспрессионная система для основанного на близости расположения выбора.

В способах согласно настоящему изобретению задействована экспрессионная система, которая позволяет закрепить и совместно локализовать экспрессируемый целевой белок (например, клеточный рецептор) и библиотеку потенциальных партнеров для связывания (например, потенциальных полипептидных лигандов) в клеточном компартменте, например в плазматической мембране. Указанные потенциальные партнеры для связывания экспрессируют с применением внутриклеточной комбинаторной библиотеки. Взаимодействие целевого белка и партнера для связывания активирует фермент-субстратную систему, регистрирующую возникновение молекулярного взаимодействия в указанном клеточном компартменте (например, плазматической мембране). Указанные целевой белок и партнер для связывания экспрессируют таким образом, что каждый из них соединен только с одним компонентом или несет только один компонент репортерной фермент-субстратной системы. Например, при использовании рецептора клеточной поверхности и пептидного лиганда указанная система функционирует только в том случае, если взаимодействие лиганда и рецептора обеспечивает сближение вступающих в реакцию молекул. Когда в результате указанного взаимодействия рецептор и его лиганд сближаются, протеолитическая реакция приводит к высвобождению активаторной или эффекторной молекулы, которая может обеспечивать детектируемый ответ в клетке-хозяине. Например, указанный активатор может представ-

лять собой пептидный или полипептидный транскрипционный фактор, который входит в ядро и связывается с промотором в ядре с активацией репортерного гена. Указанная экспрессионная система и итоговый формат выбора обеспечивают множество преимуществ. Например, указанная система позволяет проводить определение молекулярных взаимодействий обширного ряда потенциальных агонистов в физиологически релевантной среде интактной живой клетки. Кроме того, указанная система позволяет осуществлять поиск лигандов рецепторов в тех случаях, когда неизвестен механизм передачи сигнала или неизвестен собственно лиганд.

Для обеспечения совместно локализованной экспрессии потенциальных партнеров для связывания (например, полипептидных лигандов) и целевого белка (например, клеточного рецептора) на плазматической мембране партнер для связывания может быть соединен с трансмембранным белковым доменом и экспрессирован с первой экспрессионной конструкции. Целевой белок экспрессируют в форме гибрида с второй экспрессионной конструкции. Согласно некоторым вариантам реализации указанный целевой белок представляет собой рецептор клеточной поверхности, который содержит один или большее количество природных трансмембранных доменов (ТМ), например внеклеточный домен наряду с природным ТМ рецептора клеточной поверхности. Согласно некоторым другим вариантам реализации в соответствии с которыми целевой белок не содержит природного ТМ (например, представляет собой ядерный рецептор или другой лигандсвязывающий белок), он может быть экспрессирован в виде гибрида с гетерологичным трансмембранным белковым доменом. Согласно некоторым вариантам реализации в экспрессионных конструкциях используют линкерную последовательность, которая соединяет компоненты гибридного полипептида, например соединяет потенциальный лиганд (например, антитело или пептид) с трансмембранным белковым доменом. Например, большинство полученных к настоящему времени мембраносвязанных токсинов содержат участок из 20 чередующихся остатков глицина и аспарагина. Указанная линкерная последовательность может применяться в экспрессионных конструкциях согласно настоящему изобретению. Такой линкер, расположенный перед участком связывания с мембраной, может обеспечивать ротационную гибкость и расстояние, необходимые для связывания пептидного токсина с когнатым ионным каналом. Согласно различным вариантам реализации могут применяться линкеры различной длины, оптимизированные для экспрессии гибридных конструкций.

Согласно примеру схемы выбора с применением рецептора и пептидного лиганда указанные потенциальный лиганд и рецептор экспрессируют таким образом, что каждый из них соединен только с одним компонентом или несет только один компонент фермент-субстратной репортерной системы. Соответственно, согласно приведенным в настоящем документе примерам гибридная конструкция лиганд-ТМ может дополнительно экспрессировать фермент (или его субстрат), а указанная рецепторная конструкция может дополнительно экспрессировать последовательность субстрата (или фермента). Согласно различным вариантам реализации последовательность пептидного субстрата также связана с последовательностью эффектора или активатора (например, транскрипционным фактором). При связывании указанного лиганда с указанным рецептором ферментативное расщепление указанной последовательности субстрата приводит к высвобождению эффекторной молекулы. Высвобождаемая эффекторная молекула затем может активировать детектируемый сигнальный путь в клетке, обеспечивая подтверждение произошедшего связывания лиганда с рецептором.

Фермент-субстратные репортеры, подходящие для применения в настоящем изобретении, не ограничиваются какой-либо одной конкретной фермент-субстратной системой; при практической реализации настоящего изобретения могут применяться любые из ряда хорошо известных пар ферментов с полипептидными субстратами. Согласно приведенным в настоящем документе примерам один из примеров фермент-субстратной системы представлен TEV-протеазой и специфическим сайтом ферментативного расщепления пептида. TEV-протеаза представляет собой хорошо известную высокоспецифичную в отношении последовательности цистеинпротеазу вируса гравировки табака (TEV). Она является представителем РА-класса химотрипсин-подобных протеаз. Ввиду высокой специфичности в отношении последовательности ее часто используют для контролируемого расщепления гибридных белков *in vitro* и *in vivo*. При практической реализации настоящего изобретения может применяться TEV-протеаза дикого типа и любые варианты (например, консервативно модифицированные варианты) или ферментативные фрагменты фермента дикого типа. Последовательности и векторы, экспрессирующие TEV-протеазу и ее варианты, рутинно применяются в данной области техники, широко описаны в опубликованных источниках или доступны у коммерческих поставщиков, например Kapust et al., *Prot. Expr. Purif.* 19:312-8, 2000; Kapust et al., *Prot. Eng.*, 14: 993-1000, 2001; Chen et al., *Prot. Sci.* 19:2379-88, 2010; и Addgene (Кембридж, Массачусетс). Соответствующий сайт расщепления последовательностей TEV-протеазы также подробно описан и используется в данной области техники. Примеры подходящих последовательностей субстрата TEV-протеазы включают, например,

ENLYFQS (SEQ ID NO:4) (TEV1), ENFYFQS (SEQ ID NO:5) (TEV 2), ENLYYQS (SEQ ID NO:6) (TEV 3) и ENLFFQS (SEQ ID NO:7).

Согласно некоторым вариантам реализации указанная последовательность субстрата TEV-протеазы, используемая в конструкциях согласно изобретению, представлена последовательностью ENFYFQS (SEQ ID NO:5) (TEV 2).

Аналогичным образом, при практической реализации настоящего изобретения может применяться любой репортерный ген, хорошо известный в данной области техники. Он может представлять собой любой ген или полинуклеотид, кодирующий белок, экспрессия которого клеткой может быть детектирована и/или количественно определена. Соответственно, измеренный уровень экспрессии указанного репортера отражает уровень активации промоторного элемента, управляющего экспрессией репортерного гена. Примеры генов, подходящих для применения в качестве репортерных генов, включают, например, гены, которые кодируют метаболический фермент, фактор устойчивости к антибиотику, люминесцентный белок или флуоресцентный белок. Такие репортерные гены хорошо известны в данной области техники; конкретные примеры описаны в источнике: Wood (1995), *Curr. Opin. Biotechnol.* 6(1): 50-58. В некоторых конструкциях согласно настоящему изобретению указанный репортерный ген кодирует люциферазу. Согласно некоторым другим вариантам реализации указанный репортерный ген кодирует метаболический фермент, такой как β -галактозидаза. Согласно некоторым вариантам реализации указанный репортерный ген может представлять собой ген, дополняющий ауксотрофную мутацию в клетке-хозяине и позволяющий клеткам, которые экспрессируют указанный ген, расти на селективных средах.

Конструирование экспрессионных векторов и репортерных клеток для практической реализации способов согласно настоящему изобретению может быть легко реализовано в соответствии с общепринятыми методами молекулярной биологии. Примеры некоторых специфических протоколов для проведения требуемых этапов настоящего изобретения также приведены в настоящем документе. Например, согласно подробному описанию в настоящем документе, экспрессионные векторы, кодирующие гибриды лиганда/ТМ/фермента, могут быть получены путем присоединения потенциальных лигандов к N-концу трансмембранного домена рТФР (аминокислоты 514-561), тогда как фермент (например, TEV-протеазу) присоединяют к С-концу указанного трансмембранного домена. Для обеспечения ротационной гибкости между последовательностью лиганда и трансмембранного домена может быть встроена линкерная последовательность. Одна из линкерных последовательностей согласно примерам в настоящем документе содержит один или большее количество (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 или более) tandemных повторов GGGGS (SEQ IDNO: 1). Согласно некоторым вариантам реализации указанный линкер содержит 8, 10 или более tandemных повторов GGGGS (SEQ IDNO: 1). Гибрид лиганд/ТМ/фермент может быть клонирован в лентивирусный вектор (например, вектор pLV2 согласно примеру в настоящем документе) для получения вирусных частиц для трансфекции клетки-хозяина. В случае гибрида рецептора/субстрата/эффекторной молекулы, примером эффекторной молекулы может быть гибрид ДНК-связывающего домена Gal4 с С-концевым доменом активации VP16 вируса простого герпеса. Он обеспечивает получение искусственного транскрипционного фактора (GAL4-VP16), ортогонального в отношении любых клеток млекопитающих. Кодирующую область целевого рецептора (например, рТРО или рГПП-1) соединяют на С-конце с последовательностью субстрата или сайта расщепления фермента (например, сайта расщепления TEV-протеазой) и транскрипционным фактором GAL4-VP16. Указанная гибридная последовательность затем может быть клонирована в подходящий экспрессионный вектор (например, вектор pcDNA5).

При осуществлении настоящего изобретения могут применяться различные экспрессионные векторы. Например, лентивирусные векторы подходят для введения в клетку-хозяина и экспрессии в клетке-хозяине комбинаторной библиотеки потенциальных партнеров для связывания. Лентивирусные векторы представляют собой ретровирусные векторы, способные трансдуцировать или инфицировать как делящиеся, так и неделящиеся клетки, и, как правило, обеспечивают высокий титр вируса. Примеры векторов на основе лентивирусов, подходящих для применения в настоящем изобретении, включают, например, лентивирусный вектор pLV2 согласно примеру в настоящем документе. Другие лентивирусные векторы, которые могут быть использованы и модифицированы для практической реализации настоящего изобретения, включают, например, pLVX-Puro, pLVX-IRES-Neo, pLVX-IRES-Hyg и pLVX-IRES-Puro. Различные лентивирусные векторы с клонированными последовательностями потенциальных лигандов могут быть введены в подходящую клетку-хозяина для экспрессии библиотеки потенциальных лигандов. Например, для применения в настоящем изобретении подходят линия клеток HEK293, линия клеток HEK293T и линия клеток TF-1. Для экспрессии комбинаторной библиотеки в настоящем изобретении могут также применяться многие другие пакующие линии клеток, хорошо известные в данной области техники (например, линия клеток Lenti-X 293T). Наряду с векторами на основе лентивирусов и клетками-хозяевами, при практической реализации способов согласно настоящему изобретению могут также применяться другие векторы на основе ретровирусов и экспрессионные системы. Указанные векторы включают векторы на основе MMLV: pQCXIN, pQCXIQ и pQCXIH и совместимые с ними линии клеток-продуцентов, такие как пакующие линии клеток на основе HEK293: GP2-293, EcoPack 2-293 и AmphiPack 293, а также пакующая линия клеток на основе NIH/3T3 RetroPack PT67.

Для идентификации потенциальных лигандов, способных связываться с рецептором, клетка-хозяин может также содержать детектируемый репортерный ген, который может быть активирован эффекторной молекулой, что обеспечивает детекцию произошедшего связывания. Например, если выбранная эффекторная молекула представляет собой транскрипционный фактор GAL4-VP16, в клетку-хозяина может быть введен несущий UAS/репортерный ген вектор. Согласно приведенным в настоящем документе

примерам несущий репортерный ген вектор содержит последовательность контроля транскрипции (например, несколько повторов GAL4 UAS и поздний аденовирусный промотор), которая распознается транскрипционным фактором GAL4-VP16 и активирует экспрессию функционально связанной последовательности. Указанная функционально связанная последовательность, как правило, кодирует легко детектируемый сигнал. Например, последовательность контроля транскрипции в несущем репортерный ген векторе может запускать транскрипцию репортерного гена люциферазы luc2P или tdTomato в ответ на связывание транскрипционного фактора GAL4-VP16. Согласно приведенным в настоящем документе примерам стабильные клетки-хозяева или линии клеток, несущие репортерный ген, могут быть легко получены путем трансфекции указанной клетки-хозяина (например, клеток HEK293) несущей репортерный ген конструкцией (например, несущим UAS/репортерный ген вектором).

Примером реализации настоящего изобретения является детектирование совместно локализованной экспрессии и связывания лигандов с рецепторами рТПО и ГПП-1. Общую схему выбора, описанную в настоящем документе, можно широко применять при идентификации лигандов для любого клеточного рецептора. Указанные рецепторы включают любые рецепторы клеточной поверхности (например, рецепторы GPCR или связанные с ферментами рецепторы), которые, как правило, содержат собственные трансмембранные домены, как, например, рецепторы GPCR и связанный с ферментом рецептор. Помимо поверхностных рецепторов, содержащих трансмембранные домены, в системе выбора согласно настоящему изобретению могут быть исследованы другие клеточные рецепторы или лиганд-связывающие белки для идентификации их лигандов или партнеров для связывания, включая, например, цитоплазматические рецепторы или ядерные рецепторы. Рецепторы или лиганд-связывающие белки, не содержащие природных трансмембранных доменов, могут быть рекомбинантным способом соединены с гетерологичным трансмембранным доменом (например, ТМ рТФР) перед применением способов выбора согласно настоящему изобретению. Согласно различным вариантам реализации указанная система выбора может применяться для идентификации новых лигандов или модуляторов (агонистов или антагонистов) рецепторов, для которых не были идентифицированы лиганды (орфанные рецепторы). В случае рецепторов, у которых имеется известный лиганд, идентификация новых агонистов или антагонистов может требоваться, в частности, для имитации, усиления или ингибирования эффекта указанного лиганда.

Некоторые варианты реализации настоящего изобретения относятся к сопряженным с G-белками рецепторам (GPCR). GPCR составляют самое большое семейство белковых рецепторов клеточной поверхности. Существует три основных семейства GPCR, Gs-, Gi- и Gq-сопряженные рецепторы. При активации разные GPCR стимулируют ряд путей передачи сигнала. Например, сопряженный с Gs рецептор повышает, а сопряженный с Gi рецептор снижает уровень синтеза цАМФ. Соответственно, указанные два разных GPCR могут активировать или ингибировать элемент ответа на цАМФ. С другой стороны, сопряженный с Gq рецептор повышает внутриклеточную концентрацию кальция и активирует элемент множественного ответа. На основании гомологии последовательностей и функционального сходства GPCR могут быть разделены на рецепторы класса А (родопсिनотипные рецепторы), класса В (семейство рецепторов секретина), класса С (метаботропные глутаматные рецепторы/рецепторы феромонов), класса D (рецепторы феромонов спаривания грибов), класса Е (рецепторы циклического АМФ) и класса F (рецепторы Frizzled/Smoothed). Некоторые варианты реализации настоящего изобретения относятся к связанным с ферментами рецепторам. Связанные с ферментами рецепторы включают рецепторные тирозинкиназы; связанные с тирозинкиназами рецепторы; рецептороподобные тирозинфосфатазы; рецепторные серин/треониновые киназы; рецепторные гуанилатциклазы и связанные с гистидинкиназами рецепторы. Самая большая популяция из перечисленных связанных с ферментами рецепторов представлена рецепторными тирозинкиназами. Большинство указанных молекул представляют собой рецепторы факторов роста и гормонов, таких как эпидермальный фактор роста (ЭФР), тромбоцитарный фактор роста (ТФР), фактор роста фибробластов (ФРФ), фактор роста гепатоцитов (ФРГ), инсулин, фактор роста нервов (ФРН) и т.п.

Помимо обеспечения совместно локализации на плазматической мембране предложенные в настоящем изобретении способы могут также применяться для выбора лигандов, совместно локализованных с рецептором в других клеточных компартментах. Любая ситуация, в которой два белка избирательным образом сближаются, повышает эффективную молярность их взаимодействия. Соответственно, например, предложенные в настоящем изобретении способы могут также применяться для мониторинга взаимодействий между органеллами или в целом для отслеживания направленного транспорта белков путем перенаправления репортерной системы.

IV. Локализованные в плазматической мембране библиотеки лигандов.

В настоящем изобретении предложены комбинаторные библиотеки полипептидов или антител (например, одноцепочечных антител), которые могут быть локализованы на плазматической мембране при экспрессии в клетках. Каждая библиотека может содержать по меньшей мере 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 , 1×10^9 , 1×10^{10} или более разных последовательностей полипептидов или антител. Как правило, каждый компонент библиотеки содержит специфическую или рандомизированную последовательность полипептида или антитела, которая функционально связана с трансмембранным доменом. Указанный

трансмембранный домен, например трансмембранная область рТФР, согласно приведенным в настоящем документе примерам, обеспечивает прикрепление экспрессированных пептидов к клеточной мембране. Помимо доменов рТФР, при конструировании библиотек лигандов согласно настоящему изобретению могут также применяться многие другие трансмембранные домены, хорошо известные в данной области техники, а также варианты (например, консервативно модифицированные варианты) указанных известных трансмембранных белковых доменов. См., например, Remm et al., *Genome Res.* 10: 1679-1689, 2000; и Hubert et al., *Cell Adh. Migr.* 4:313-324, 2010.

Согласно некоторым вариантам реализации потенциальные лиганды представлены комбинаторной библиотекой полипептидных или пептидных последовательностей. Для конструирования комбинаторных библиотек согласно настоящему изобретению может быть использован любой полипептид или пептид (например, рандомизированный пептид). Их длина может составлять по меньшей мере 4, 5, 6, 7, 8, 10, 15, 20, 25, 50, 100, 200, 300 или более остатков аминокислот. Как правило, для экспрессии библиотеки полипептидов используют стандартные техники генетического конструирования. Для получения библиотеки рекомбинантных полипептидов или пептидов согласно настоящему изобретению полинуклеотиды, кодирующие указанный пептид, встраивают в подходящую экспрессионную систему. При экспрессии гибридных пептидов могут использоваться подходящие экспрессионные векторы многочисленных типов, известные в данной области техники, в том числе, например, векторы, содержащие экспрессионные системы на основе бактерий, вирусов, дрожжей, грибов, насекомых или млекопитающих. Согласно приведенным в настоящем документе примерам предпочтительная экспрессионная система для получения пептидных или полипептидных библиотек согласно настоящему изобретению основана на лентивирусах. Способы получения и применения таких экспрессионных векторов хорошо известны. Для ознакомления с указанной и другими молекулярно-биологическими техниками, применяемыми для получения и экспрессирования комбинаторных библиотек согласно настоящему изобретению, см., например, источники: текущее издание руководства Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York; Miller et al., *Genetic Engineering*, 8:277-298 (Plenum Press, текущее издание), Wu et al., *Methods in Gene Biotechnology* (CRC Press, New York, N.Y., текущее издание), *Recombinant Gene Expression Protocols*, в руководстве: *Methods in Molecular Biology*, Vol. 62, (Tuan, ed., Humana Press, Totowa, N.J., текущее издание), а также *Current Protocols in Molecular Biology*, (Ausubel et al., Eds.) John Wiley & Sons, NY (текущее издание), и цитируемые в них источники. Согласно иллюстративному варианту реализации полинуклеотид может быть помещен под контроль подходящего промотора в экспрессионном векторе, например, промотора EFl- α в лентивирусном векторе, согласно приведенным в настоящем документе примерам.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения используемая комбинаторная библиотека лигандов представляет собой библиотеку антител. При конструировании комбинаторных пептидных библиотек согласно настоящему изобретению могут применяться любые последовательности антител. Согласно некоторым вариантам реализации обычно используют библиотеку одноцепочечных антител. Библиотеки одноцепочечных антител могут содержать только тяжелую или легкую цепь антитела или ее варибельный домен. Однако чаще компоненты библиотек одноцепочечных антител образуются соединенными варибельными доменами тяжелых и легких цепей, разделенными пептидным спейсером, в составе непрерывной последовательности одного белка. См., например, Ladner et al., WO 88/06630; McCafferty et al., WO 92/01047. Разнообразие библиотек антител может обеспечиваться за счет получения кодирующих антитело последовательностей из естественных источников, таких как неклональная популяция иммунизированных или неиммунизированных В-клеток. Согласно альтернативному или дополнительному варианту разнообразие может быть достигнуто посредством искусственного мутагенеза, что хорошо известно в данной области техники. Согласно некоторым вариантам реализации указанная библиотека антител экспрессирует одноцепочечные фрагменты варибельных областей (scFv). Библиотека специфических scFv, подходящая для применения согласно настоящему изобретению, описана в данной области техники, например, в источнике: Gao et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99: 12612-6, 2012. Такая библиотека антител может быть получена и экспрессирована с применением различных векторов, хорошо известных в данной области техники. Предпочтительно, библиотеку антител для применения в настоящем изобретении конструируют с применением лентивирусного вектора или вектора на основе ретровируса. Конструирование такой библиотеки антител для экспрессии в эукариотической клетке-хозяине может выполняться в соответствии с техниками, примеры которых приведены в настоящем документе, и другими способами, хорошо известными в данной области техники.

Многие техники, хорошо известные в данной области техники, могут быть легко использованы для увеличения разнообразия компонентов библиотеки потенциальных лигандов. Указанные техники включают, например, комбинаторную перестановку цепей, гуманизацию последовательностей антител, введение мутаций, аффинное созревание, применение мутаторных клеток-хозяев и т.п. Все указанные способы могут быть использованы при практической реализации способов, описанных в настоящем документе, по усмотрению специалиста. См., например, Aujame et al., *Hum. Antibod.* 8: 155-168, 1997; Barbas et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 7978-82, 1991; Barbas et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:3809-13, 1994; Boder et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 10701-10705, 2000; Cramer et al., *Nat. Med.* 2: 100-102, 1996; Fisch et al.,

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:7761-7766, 1996; Glaser et al., J. Immunol. 149: 3903-3913, 1992; Eving et al., Immunotechnology, 2: 127-143, 1996; Kanppik et al., J. Mol. Biol., 296: 57-86, 2000; Low et al., J. Mol. Biol. 260: 359-368, 1996; Riechmann and Winter, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97: 10068-10073, 2000; и Yang et al., J. Mol. Biol. 254: 392-403, 1995.

Согласно некоторым вариантам реализации указанные библиотеки потенциальных лигандов включают варианты или мутанты, происходящие из одного потенциального полипептида или исходного карбоксидного полипептида (например, известного полипептидного лиганда клеточного рецептора). Например, молекула полинуклеотида, кодирующая указанный потенциальный полипептид, может быть изменена по одному или большему числу выбранных кодонов. Изменение определяется как замена, удаление или вставка одного или большего числа нуклеотидов в ген, кодирующий потенциальный полипептид, что приводит к изменению последовательности аминокислот указанного полипептида. Предпочтительно, указанные изменения обеспечивают путем замены по меньшей мере одной аминокислоты любой другой аминокислотой в одной или нескольких областях молекулы. Указанные изменения могут быть осуществлены путем применения различных способов, известных в данной области техники. Указанные способы включают, не ограничиваясь перечисленными, опосредованный олигонуклеотидами мутагенез (например, Zoller et al., Methods Enzymol. 154:329-50, 1987), касетный мутагенез (например, Well et al., Gene 34:315, 1985), допускающую ошибки ПЦР (см., например, Saiki et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86:6230-4, 1989; и Keohavong and Thilly, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:9253-7, 1989), и ДНК-шаффлинг (Stemmer, Nature 370:389-91, 1994; и Stemmer, Proc. Natl. Acad. Sci. 91:10747-51, 1994).

Согласно некоторым вариантам реализации указанные потенциальные лиганды могут быть дополнительно конъюгированы с партнером для получения гибрида (например, другим пептидом или другим фрагментом), который может применяться для улучшения очищения, повышения экспрессии указанного пептида в клетке-хозяине, способствовать детекции, стабилизации пептида и т.п. Примеры подходящих партнеров для получения гибридов для потенциальных пептидных лигандов согласно настоящему изобретению включают полиэтиленгликоль, ПЭГ или другие химические вещества. К подходящим пептидным или полипептидным партнерам для получения гибридов относятся, среди многих других, например, бета-галактозидаза, глутатион-S-трансфераза, гистидиновая метка и т.п. Согласно некоторым вариантам реализации указанные потенциальные пептиды или полипептиды согласно настоящему изобретению могут быть снабжены детектируемой меткой.

Согласно некоторым вариантам реализации указанные потенциальные лиганды могут содержать одно или большее число встречающихся в природе производных 20 стандартных аминокислот, например, 4-гидроксипролин, 5-гидроксилизин, 3-метилгистидин, гомосерин, орнитин или карбоксиглутамат, и могут включать аминокислоты, не связанные полипептидными связями. Аналогичным образом, они могут также представлять собой циклические полипептиды и другие конформационно ограниченные структуры. Способы модификации полипептида для получения аналогов и производных хорошо известны в данной области техники, см., например, Roberts and Vellaccio, The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology, Eds. Gross and Meinhofer, Vol. 5, p. 341, Academic Press, Inc., New York, N.Y. (1983); и Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery, Ed. Manfred E. Wolff, Ch. 1, pp. 619-620, John Wiley & Sons Inc., New York, N.Y. (1995).

V. Выбор лигандов с применением основанных на близости расположения анализов.

В настоящем изобретении предложены способы идентификации одного или большего числа лигандов целевой молекулы (например, целевого рецептора) в большой внутриклеточной комбинаторной библиотеке потенциальных лигандов, которая может быть экспрессирована и локализована на плазматической мембране популяции клеток-хозяев. Согласно указанным способам разные потенциальные лиганды из библиотеки и целевая молекула (например, поверхностный рецептор) совместно локализованы на плазматической мембране клеток-хозяев. И целевая молекула (например, рецептор), и потенциальный лиганд соединены с одним из компонентов фермента и когнатного пептидного субстрата или последовательности распознавания указанного фермента. При связывании совместно локализованного лиганда с соседней целевой молекулой (например, рецептором), эффекторная молекула (например, транскрипционный фактор), соединенная с последовательностью субстрата, высвобождается в результате ферментативной реакции. Указанная эффекторная молекула может затем обеспечивать детектируемый ответ при активации искусственного клеточного ответа или сигнального пути, например, флуоресцентный ответ, люминесцентный ответ или другой сигнал.

Клетки-хозяева для практической реализации способов согласно настоящему изобретению могут представлять собой любые хорошо известные эукариотические клетки или линии клеток, которые могут содержать и экспрессировать целевую молекулу, потенциальные лиганды и репортерную конструкцию, описанные в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам реализации в качестве клеток-хозяев при экспрессии гибридных молекул для основанного на близости расположения выбора лигандов используют клетки млекопитающих. Например, они могут быть представлены либо гибридомной линией клеток, либо линией клеток млекопитающих (например, клетками НЕК293), несущей экзогенные экспрессионные векторы согласно приведенным выше примерам. Указанные клетки включают любые нормальные мортальные или аномальные иммортализованные клетки животных или человека. Помимо ли-

ний клеток, описанных в приведенных в настоящем документе примерах, в данной области техники также известен ряд других подходящих линий клеток-хозяев, способных экспрессировать целевую молекулу и конструкции с потенциальными лигандами согласно настоящему изобретению. Указанные линии клеток включают, например, линии клеток CHO, различные линии клеток COS, клетки HeLa, линии миеломных клеток, трансформированные В-клетки и другие линии гибридомных клеток. Общее описание применения культур клеток тканей млекопитающих для экспрессии полипептидов приведено, например, в источнике: Winnacker, *From Genes to Clones*, VCH Publishers, N.Y., N.Y., 1987. Экспрессионные векторы для использования в клетках-хозяевах млекопитающих могут включать такие последовательности контроля экспрессии, как точка начала репликации, промотор и энхансер, и необходимые сайты обработки информации, такие как сайты связывания рибосом, сайты сплайсинга РНК, сайты полиаденилирования и последовательности терминации транскрипции. Указанные экспрессионные векторы обычно содержат промоторы, происходящие из генов млекопитающих или вирусов млекопитающих. Подходящие промоторы могут быть конститутивными, специфическими в отношении типа клеток, стадий специфическими, и/или модулируемыми или регулируемыми. Подходящие промоторы включают, не ограничиваясь перечисленными, промотор EFl- α и промотор UbC человека согласно примерам в настоящем документе, промотор металлотионеина, конститутивный аденовирусный основной поздний промотор, индуцируемый дексаметазоном промотор вируса опухоли молочной железы мышей (MMTV), промотор вакуолизирующего вируса обезьян SV40, промотор pol III ассоциированного с лекарственной мультирезистентностью белка (MRP), конститутивный промотор MPSV, индуцируемый тетрациклином промотор цитомегаловируса (CMV) (такой как немедленно-ранний промотор CMV человека), конститутивный промотор CMV, и комбинации промоторов и энхансеров, известные в данной области техники.

Экспрессия конструкции с потенциальными лигандами и конструкции с целевой молекулой (например, рецептором) для мониторинга связывающей активности может осуществляться с применением общепринятых методов молекулярной биологии и способов согласно примерам в настоящем документе. Выбор лигандов целевого рецептора из библиотеки потенциальных лигандов может также осуществляться с применением стандартных процедур, хорошо известных в данной области техники или описанных в специфических примерах в настоящем документе. Независимо от используемых лигандов библиотека экспрессионных векторов (например, лентивирусных векторов), кодирующих комбинаторную библиотеку полипептидных лигандов или антител, может сначала быть введена в подходящие клетки-хозяева (например, HEK293) для получения библиотеки лиганд-кодирующих вирусов. При котрансфекции указанными вирусами клеток-хозяев наряду с вирусом, экспрессирующим специфическую мембраносвязанную целевую молекулу (рецептор, такой как рТРО или рГПП-1), происходит экспрессия и совместная локализация библиотеки гибридных лигандов с рецептором на мембране. Согласно некоторым вариантам реализации сначала в клетку-хозяина могут быть введены экспрессирующий целевую молекулу вектор и конструкция с репортерным геном. Затем в указанную клетку-хозяина, которая стабильно экспрессирует целевую молекулу (например, поверхностный рецептор) может быть введена экспрессирующая лиганды библиотека.

В зависимости от используемой в описанных способах специфической эффекторной молекулы и репортерного гена для детекции связывания лигандов с целевой молекулой могут применяться различные анализы основанных на близости расположения реакций. Например, клетка-хозяин, несущая и UAS/репортерный ген, и гибрид целевого рецептора/сайта расщепления/транскрипционного фактора, может быть сначала инфицирована лентивирусами, несущими библиотеку гибридов потенциальных лигандов/TM/TEV-протеазы, с применением транскрипционного фактора GAL4-VP16 и транскрипционного элемента отклика GAL4 UAS. Затем клетки культивируют перед измерением активности репортерного гена.

В настоящем изобретении могут быть задействованы различные способы детекции и количественного определения экспрессии репортера, которые обычно основаны на измерении активности белка, кодируемого указанным репортером. В данной области техники известен широкий спектр подходящих детектируемых маркеров, в том числе флуоресцентных, радиоактивных, ферментативных или других лигандов, таких как авидин/биотин, которые способны обеспечивать детектируемый сигнал. Согласно некоторым вариантам реализации может быть использована флуоресцентная или ферментная метка, например, уреазы, щелочная фосфатаза или пероксидаза, вместо радиоактивных или других неблагоприятных для окружающей среды реагентов. Известны колориметрические индикаторные субстраты для ферментных меток, которые могут применяться для получения видимых глазом или спектрофотометрических сигналов. Согласно приведенным в настоящем документе примерам репортерный ген может представлять собой ген люциферазы, экспрессия которого может быть легко детектирована посредством люциферазного анализа, или по экспрессии гена tdTomato, которую можно наблюдать при помощи флуоресцентной микроскопии. Другие примеры репортерных генов, подходящих для применения в настоящем изобретении, включают гены бета-лактамазы и гены, кодирующие GFP или другие флуоресцентные белки, которые могут быть визуализированы при помощи флуоресцентной микроскопии или детектированы с применением сортировки клеток с активированной флуоресценцией.

Если репортерный ген кодирует фермент, может быть использован субстрат для указанного фермента, который метаболизируется с образованием измеряемого продукта. Например, субстрат β -галактозидазы X-gal, который расщепляется указанным ферментом с образованием реакционного продукта синего цвета, часто используют для анализа репортерной экспрессии β -галактозидазы. (Miller J. ed. (1992) *A Short Course in Bacterial Genetics: A Laboratory Manual and Handbook for Escherichia Coli and Related Bacteria*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York. Как вариант, используют субстрат β -галактозидазы о-нитрофенил- β -D-галактопиранозид (ONPG), который метаболизируется β -галактозидазой с образованием соединения желтого цвета. Количество фермента определяют путем изменения оптической плотности окрашенного соединения с применением спектрофотометрии или считывающего устройства (ридера) для ИФА-ELISA. Поглощение регистрируют при 420 нм (Miller J.H. ed. (1972), *Experiments in Molecular Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York). Другие широко используемые репортерные гены представлены генами фактора устойчивости к антибиотикам хлорамфеникол-ацетилтрансферазы (ХАТ), люциферазы светлячков (согласно описанию в приведенных ниже примерах) и зеленого флуоресцентного белка медузы (Valdivia and Falkow (1997), *Trends Microbiol.* 5(9):360-363; Naylor (1999), *Biochem. Pharmacol.* 58(5):49-757; Himes and Shannon (2000), *Methods Mol. Biol.* 130:165-174). Кроме того, различные альтернативные белки могут также применяться в качестве репортеров на основании возможности их детектирования и количественного определения. Анализы для измерения уровней экспрессии таких генов хорошо разработаны и широко применяются специалистами в данной области техники (Rosenthal (1987), *Methods Enzymology*, 152:704-720; Davey et al. (1995), *Methods Mol. Biol.* 49:143-148 и Bronstein et al. (1994), *Anal. Biochem.* 219(2):169-181).

Примеры

Представленные ниже примеры приведены для дополнительной иллюстрации настоящего изобретения, а не для ограничения его объема. Для специалиста в данной области техники будут очевидны другие варианты настоящего изобретения, также охваченные прилагаемой формулой изобретения.

Пример 1. Материалы и способы.

Линии клеток. Клетки HEK293 (ATCC кат. № CRL-1573) или HEK293T (ATCC кат. № CRL-3216) поддерживали на среде DMEM, содержащей 10% (по объему) ФБС, пенициллина и стрептомицина, и трансфицировали с применением липофектамина 2000 (Life technologies). Антибиотики для клеток млекопитающих генетицин и гигромицин получали от Invivogen. Реагент для люциферазного анализа получали от Promega (EI 500).

Конструирование плазмид. Лентивирусный вектор, кодирующий лиганд/ТМ/ТЕV-протеазу. Лиганд соединяли с N-концом трансмембранного домена рТФР (аминокислоты 514-561); с С-концом указанного трансмембранного домена соединяли ТЕV-протеазу. Между лигандом и трансмембранным доменом добавляли различное количество линкерных последовательностей GGGGS (SEQ ID NO: 1). Конструкцию лиганд/трансмембранный домен/ТЕV вводили в лентивирусный вектор под контролем промотора UBC (убиквитина С).

Вектор, несущий рецептор/сайт расщепления ТЕV/транскрипционный фактор.

GAL4-VP16. ДНК-связывающий домен Gal4 соединяли с С-концевым доменом активации VP16 вируса простого герпеса для получения искусственного транскрипционного фактора, ортогонального в клетках млекопитающих. За кодирующей областью рТПО или рГПП-1 размещали сайт расщепления ТЕV-протеазой и транскрипционный фактор GAL4-VP16 и клонировали в pcDNA5, экспрессию которой контролировал промотор CMV. Указанный вектор содержит гентамициновую селекционную кассету для получения стабильных линий клеток.

Вектор, несущий вышележащую активаторную последовательность (Upstream Activator Sequence, UAS) и репортерный ген. Несущий UAS/репортерный ген вектор содержит 9 повторов GAL4 UAS и поздний аденовирусный промотор. Указанная последовательность запускает транскрипцию репортерного гена люциферазы luc2P или tdTomato в ответ на связывание транскрипционного фактора GAL4-VP16. Указанный вектор содержит гигромициновую селекционную кассету для получения стабильных линий клеток.

Получение стабильной репортерной линии клеток. Стабильные линии клеток получали путем трансфекции клеток HEK293, вначале несущим UAS/репортерный ген вектором с применением липофектамина. Трансфицированные клетки отбирали с применением 200 мкг/мл гигромицина. Через две недели отобранные клетки собирали и трансфицировали вектором, несущим специфический рецептор/сайт расщепления ТЕV/транскрипционный фактор GAL4-VP16. Клетки отбирали с применением 800 мкг/мл гентамицина и 100 мкг/мл гигромицина в течение двух недель.

Упаковка лентивируса. Вирус продуцировали в клетках HEK293T посредством котрансфекции лентивирусными векторами и вирусными пакующими векторами pCMVD8.9 и pVSVg в соотношении 1:1:1. Супернатанты, содержащие вирус, собирали через 48 ч после трансфекции и фильтровали через мембранный фильтр с размером пор 0,22 мкм (Millipore). Титр лентивирусного состава определяли с применением набора Lenti-X p24 ELISA (Clontech).

Анализ основанной на близости расположения реакции. Клетки стабильной линии, несущей и UAS/репортерный ген, и рецептор/сайт расщепления/транскрипционный фактор, высевали в 96-луночный планшет с плотностью 20000 клеток на лунку. Клетки инфицировали лентивирусом, несущим лиганд-ТМ-TEV-протеазу при значении индекса множественности заражения (MOI), равном 1. Клетки культивировали в течение 24-72 ч перед измерением активности репортерного гена. Люциферазную активность оценивали с применением системы люциферазного анализа (Promega), а экспрессию tdTomato наблюдали при помощи флуоресцентной микроскопии.

Пример 2. Конструкции системы.

Авторы изобретения конструировали фермент-субстратную систему, в которой протекает малоэффективная и, таким образом, медленная при базовых концентрациях протеолитическая реакция. Авторы изобретения использовали TEV-протеазу и высокоспецифичный сайт расщепления. Протеазу прикрепляли к С-концу трансмембранного (ТМ) домена рТФР в содержащих лиганд конструкциях (фиг. 1). Сайт расщепления располагался между цитоплазматической частью рецептора и искусственным пептидным транскрипционным фактором. После расщепления указанный транскрипционный фактор высвобождается и активирует экспрессию репортерного гена (фиг. 1). Принципиальным является то, что, поскольку и потенциальный лиганд, и его рецептор заякорены в плазматической мембране, любое их взаимодействие приводит к сближению внутриклеточных реактантов, к которым они прикреплены, и способствует генерации сигнала.

В указанной системе показатель эффективной молярности оказывает действие на двух уровнях. Во-первых, поскольку реактанты располагаются в плазматической мембране и совместно локализованы, наблюдается выраженный эффект секвестрации, благоприятствующий взаимодействию. Во-вторых, взаимодействие указанных секвестрированных молекул обеспечивает сближение компонентов фермента и субстрата, таким образом значительно повышая эффективную молярность сигнальных компонентов системы. Важно отметить, что для указанной системы необходимо только молекулярное взаимодействие в мембране; указанная система в значительной степени независима от каких-либо специфических эффектов, например, конформационных изменений в результате взаимодействия.

Пример 3. Проверка концепции.

Для валидации указанного способа авторы изобретения исследовали как однократно проходящие через мембрану, так и несколько раз проходящие через мембрану белки. В случае однократно проходящих через мембрану рецепторов авторы изобретения исследовали естественный лиганд тромбopoэтин (ТПО) а также scFv-антитела к рецептору тромбopoэтина (рТПО), полученные авторами ранее (Zhang et al., Chemistry & Biology, 20:734-741, 2013). В случае несколько раз проходящих через мембрану рецепторов авторы изобретения исследовали распознавание пептидов GPCR-рецептором ГПП-1.

Гормон ТПО или связывающие рТПО антитела, 3D9 или 14F12, были экспонированы на поверхности клеток за счет соединения с N-концом трансмембранного домена рТФР. Сконструированное аналогичным образом нерелевантное антитело использовали в качестве отрицательного контроля. Мембраносвязанный белок 3D9-scFv способен активировать рТПО-репортерную линию клеток SIE-bla и, соответственно, был использован в качестве положительного контроля. Указанные антитела или аутентичный ТПО при экспонировании на плазматической мембране усиливали опосредованный транскрипционным фактором сигнал по сравнению с контрольным нерелевантным антителом (фиг. 2). Авторы изобретения также провели ортогональный эксперимент для контроля неспецифических взаимодействий рецепторного компонента системы с пептидами или антителами. Для этого авторы изобретения исследовали линию клеток, несущих гибриды рГПП-1/транскрипционный фактор и нерелевантные активаторы, такие как активирующие ТПО антитела или ТПО, которые были активны только в клетках, экспрессирующих рТПО. Результаты показали, что экспонирование антител или ТПО не усиливало сигнал в клетках, несущих несоответствующий рецептор. Авторы изобретения также протестировали эффект длины линкера между лигандом и ТМ-доменом на реакции, основанные на близости расположения. Тромбopoэтин содержит 332 АК, а scFv содержит приблизительно 250 АК. При связывании ТПО с плазматической мембраной 3-9 tandemными повторами GGGS (SEQ ID NO: 1) получали аналогичные сигналы; однако в случае scFv большее расстояние приводило к более высокой активности (фиг. 2). Соответственно, более длинный гибкий линкер может быть более универсальным.

Затем авторы изобретения исследовали возможность применения указанного способа для несколько раз проходящих через мембрану белков. В ходе предыдущего исследования авторы изобретения обнаружили, что мембраносвязанный эксендин-4 может активировать рецептор глюкагоноподобного пептида-1 (рГПП-1). Соответственно, авторы изобретения использовали рГПП-1 и эксендин-4 в качестве пары рецептор-лиганд для указанного исследования. рГПП-1 принадлежит к семейству $\beta 1$ сопряженных с G-белками рецепторов с 7 трансмембранными доменами. Модель связывания рецептора класса В с пептидным лигандом предусматривает двухэтапный механизм, согласно которому С-концевая часть пептидного лиганда сначала взаимодействует с N-концевым эктодоменом рецептора. На втором этапе N-конец лиганда взаимодействует с трансмембранными спиралями и соединяющими петлями рецептора, что приводит к активации и передаче сигнала.

Авторы изобретения соединяли полноразмерный рГПП-1 с транскрипционным фактором. Мембраносвязанный эксендин-4 соединяли с TEV-протеазой в С-концевом внутриклеточном домене. Взаимодействие коэкспрессируемых рецептора и эксендина-4 приводило к значимому повышению сигнальной активности, с 1 по 3 день включительно после инфицирования (фиг. 3А). Авторы изобретения также проверили, оказывает ли эффект на отношение сигнала к шуму (С/Ш) длина С-концевого фрагмента рГПП-1, к которому прикреплен транскрипционный фактор. Полноразмерный рецептор содержит внутриклеточный концевой фрагмент длиной 59 АК. Предыдущие исследования показали, что С-конец может быть усечен вплоть до С-концевого остатка Leu422 при отсутствии эффекта на активность ГПП-1 или экспрессию указанного рецептора. Внутриклеточный фрагмент усеченного рецептора содержит 22 аминокислоты. Авторы изобретения соединяли аминокислоты 1-426 рГПП-1 с высвобождаемым транскрипционным фактором, прикрепленным к усеченному рецептору. Конструкция с более коротким внутриклеточным концевым фрагментом рецептора обеспечивала более высокий показатель отношения С/Ш. Для дополнительного контроля авторы изобретения исследовали неспецифические пептидные лиганды аналогичной длины. Неспецифические пептиды, такие как Vc1.1, представляющий собой блокатор nAHP (никотинового ацетилхолинового рецептора)/ГАМК (метаботропного рецептора ГАМК) обеспечивали еще более низкие значения показателя С/Ш (фиг. 3В). И, наконец, при замене рГПП-1 на нерелевантный сопряженный с G-белком рецептор, CXCR4, отклика не наблюдалось (фиг. 3В).

Пример 4. Эффект разных сайтов расщепления TEV.

Для снижения шума при сохранении силы сигнала тестировали четыре последовательности субстрата TEV, которые TEV может расщеплять с разной эффективностью. TEV-протеаза распознает линейный эпитоп общей формы

E-X-X-Y-X-Q-G (SEQ ID NO:2) или
E-X-X-Y-X-Q-S (SEQ ID NO:3);

расщепление происходит между Q и G, или между Q и S.

Наиболее эффективным субстратом оказался

ENLYFQS (SEQ ID NO:4) (TEV1),

который авторы изобретения использовали во всех описанных выше экспериментах.

Авторы изобретения выдвинули предположение, что последовательности субстрата, расщепляемые менее эффективно, будут генерировать меньший уровень шума при сохранении силы сигнала. Систематическое исследование показало, что множество различных аминокислот может быть размещено в различных положениях с обеспечением разной эффективности расщепления (Kcat/Km). Авторы изобретения сравнили отношение С/Ш для четырех разных последовательностей

ENLYFQS (SEQ ID NO:4) (TEV1), ENFYFQS (SEQ ID NO: 5) (TEV 2),
ENLYYQS (SEQ ID NO:6) (TEV 3) и ENLFFQS (SEQ ID NO:7) (TEV 4).

Соответствующие показатели Kcat/Km составляют $4,51 \pm 0,65$; $0,024 \pm 0,001$; $0,056 \pm 0,005$; $0,35 \pm 0,041 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$.

Авторы изобретения провели мониторинг эффекта использования указанных последовательностей на реакционную кинетику в основанной на близости расположения сигнальной системе. Относительно слабый субстрат TEV2 обеспечивал максимальное отношение сигнал/шум даже через 3 дня после инфицирования, тогда как использование лучших субстратов TEV1 и TEV4 приводило к появлению очень высокого уровня шума, начиная с 2 дня (фиг. 3В). Соответственно, TEV2 представляет собой на настоящий момент оптимальный сайт расщепления для контроля усиливаемой близостью расположения реакции.

Пример 5. Флуоресцентные белки могут применяться в качестве репортерных генов.

В основанных на близости расположения реакциях для общего применения при выборе функциональных антител или пептидов использование таких репортерных генов, как гены GFP или β -лактамазы, может быть идеальным в сочетании с таким способом выбора, как сортировка клеток с активированной флуоресценцией. Кроме того, флуоресцентные белки подходят для динамического клеточного анализа в живых клетках, позволяющего получать оценку сигнальной активности на протяжении периода времени в одном образце. Как показано на фиг. 4, авторы изобретения использовали tdTomato в качестве репортерного гена и наблюдали его экспрессию под микроскопом. Мембраносвязанный эксендин-4 индуцировал высокий процент клеток, экспрессирующих tdTomato, тогда как нерелевантный белок (антитело) не обеспечивал генерации поддающихся оценке уровней флуоресценции, что согласуется с результатами при использовании репортерного гена люциферазы. Примечательно, что ослабленные сайты расщепления TEV2 и TEV3 демонстрировали значительно меньший уровень фона.

Хотя вышеприведенное изобретение было достаточно подробно описано с приведением иллюстративного материала и примеров для ясности понимания, в свете представленных принципов изобретения специалисту в данной области техники будет ясно, что некоторые изменения и модификации могут быть введены в изобретение без отступления от сущности или объема прилагаемой формулы изобретения.

Все публикации, базы данных, последовательности из базы GenBank, патенты и патентные заявки, цитируемые в описании, включены в настоящий документ посредством ссылок в той же мере, как если бы они были конкретным и индивидуальным образом включены посредством ссылок.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ идентификации партнера связывания с целевым полипептидом, включающий:

(а) получение первой конструкции, экспрессирующей гибридную молекулу, содержащую указанный целевой полипептид, содержащий первый трансмембранный домен (ТМ), и второй конструкции, экспрессирующей комбинаторную библиотеку гибридных молекул, которые содержат потенциальный партнер связывания, присоединенный ко второму трансмембранному домену (ТМ), причём одна из гибридных молекул дополнительно содержит фермент, а вторая гибридная молекула содержит последовательность субстрата указанного фермента и активатор искусственного сигнального пути;

(b) экспрессию указанных первой и второй конструкций в клетке-хозяине для получения популяции клеток, при этом каждая клетка содержит указанные первую и вторую гибридные молекулы, которые совместно локализованы на плазматической мембране;

(с) выбор клетки, в которой активирован искусственный сигнальный путь, из указанной популяции клеток и

(d) идентификацию второй гибридной молекулы в указанной клетке, с идентификацией таким образом партнера связывания целевого полипептида.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что указанный первый трансмембранный домен (ТМ) представляет собой природный домен указанного целевого полипептида.

3. Способ по п.1, отличающийся тем, что указанный первый трансмембранный домен (ТМ) присоединен к указанному целевому полипептиду с помощью рекомбинации.

4. Способ по п.1, отличающийся тем, что указанный фермент соединен через N-концевую часть с указанным вторым трансмембранным доменом, а последовательность субстрата соединена с указанным первым трансмембранным доменом через N-концевую часть и с указанным активатором через C-концевую часть.

5. Способ по п.1, отличающийся тем, что расщепление указанной последовательности субстрата указанным ферментом приводит к отсоединению активатора от указанной второй гибридной молекулы.

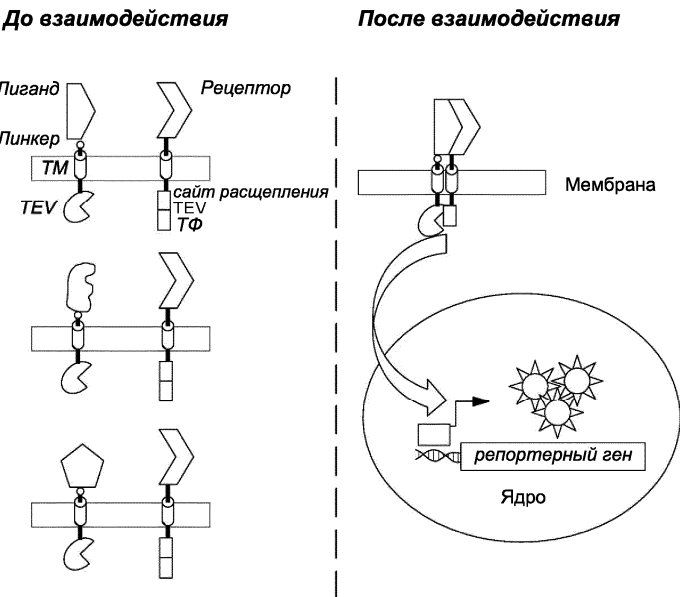
6. Способ по п.1, отличающийся тем, что указанный целевой полипептид представляет собой клеточный рецептор, а указанный партнер для связывания представляет собой лиганд указанного рецептора, при этом необязательно указанный клеточный рецептор представляет собой рецептор клеточной поверхности, а указанный второй трансмембранный домен представляет собой трансмембранный домен рецептора тромбоцитарного фактора роста (рТФР), при этом необязательно указанный клеточный рецептор представляет собой сопряженный с G-белком рецептор (GPCR) и/или указанный клеточный рецептор представляет собой рецептор тромбопоэтина (рТПО) или рецептор глюкагоноподобного пептида-1 (рГПП-1).

7. Способ по п.1, отличающийся тем, что указанный фермент представляет собой протеазу, а указанная последовательность субстрата содержит сайт расщепления указанной протеазой, при этом необязательно указанная протеаза представляет собой TEV-протеазу и/или указанная последовательность субстрата содержит ENLYFQS (SEQ ID NO: 4) (TEV 1), ENFYFQS (SEQ ID NO: 5) (TEV 2), ENLYYQS (SEQ ID NO: 6) (TEV 3) или ENLFFQS (SEQ ID NO: 7) (TEV 4).

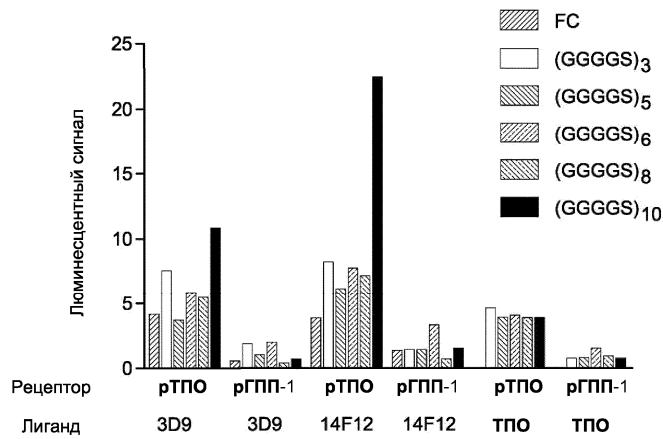
8. Способ по п.1, отличающийся тем, что указанный потенциальный партнер для связывания представляет собой пептид или антитело, при этом необязательно указанный потенциальный партнер для связывания соединен с указанным вторым трансмембранным доменом посредством линкерной последовательности, при этом необязательно указанная линкерная последовательность содержит 3, 5, 6, 8, 10 или более tandemных повторов GGGGS (SEQ ID NO: 1).

9. Способ по п.1, отличающийся тем, что указанный активатор представляет собой транскрипционный фактор, а указанный искусственный сигнальный путь представляет собой экспрессию репортерного гена под контролем последовательности регуляции транскрипции, распознаваемой указанным транскрипционным фактором, при этом необязательно указанный репортерный ген вводят в указанную клетку-хозяин с помощью лентивирусного вектора, и/или указанный репортерный ген вводят в указанную клетку-хозяин до экспрессии указанных гибридных молекул, при этом необязательно указанный транскрипционный фактор представляет собой GLA4-V16, а указанная последовательность регуляции транскрипции содержит GAL4 UAS и поздний промотор аденовируса, и/или указанный репортерный ген представляет собой ген люциферазы luc2P или репортерный ген tdTomato.

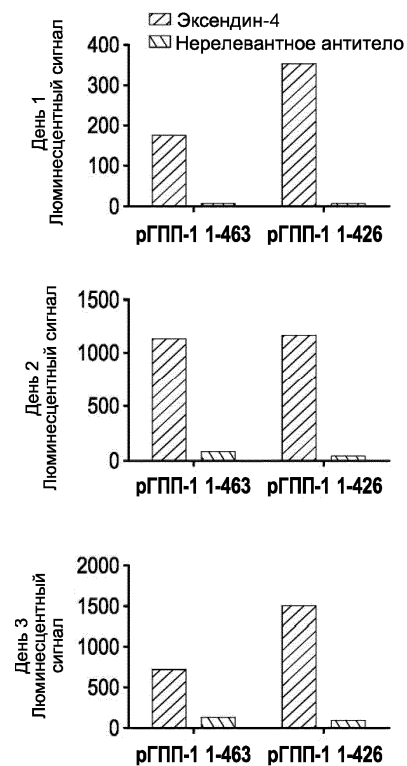
10. Способ по п.1, отличающийся тем, что указанная клетка-хозяин представляет собой клетку HEK293 или HEK293T, при этом необязательно указанная клетка-хозяин стабильно экспрессирует указанную первую гибридную молекулу, при этом необязательно указанную вторую гибридную молекулу экспрессируют в указанной клетке-хозяине с помощью лентивирусного вектора.



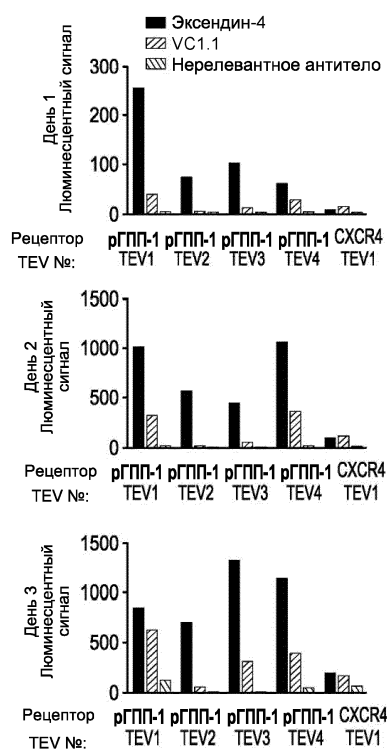
Фиг. 1



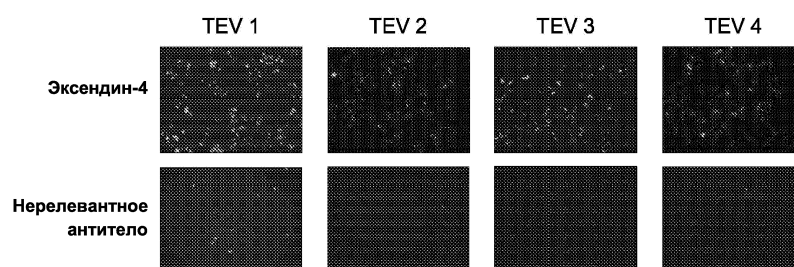
Фиг. 2



Фиг. 3А



Фиг. 3В



Фиг. 4

