

(19)



URZĄD
PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ
POLSKIEJ

(10) **PL 243470 B1**

(12)

Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **437426**

(22) Data zgłoszenia: **2021.03.26**

(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2022.10.03 BUP 40/2022**

(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2023.08.28 WUP 35/2023**

(51) MKP:

G01N 33/50 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/542 (2006.01)

(73) Uprawniony z patentu:

**CAPTOR THERAPEUTICS SPÓŁKA AKCYJNA,
Wrocław, PL
INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII
DOŚWIADCZALNEJ IM. LUDWIKA
HIRSZFELDA POLSKIEJ AKADEMII NAUK,
Wrocław, PL**

(72) Twórca(-y) wynalazku:

**MICHAŁ WALCZAK, Wrocław, PL
ALESSANDRO POTENZA, Bazylea, CH
MARIA SAGAN, Wrocław, PL**

(74) Pełnomocnik:

Magdalena Wezner-Ptasińska, Wrocław, PL

(54) Tytuł:

Sposób identyfikacji niskocząsteczkowych związków indukujących powstawanie kompleksu trójskładnikowego oraz test płytkowy wykorzystujący taki sposób

PL 243470 B1

Opis wynalazku

Dziedzina wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób *in vitro* identyfikacji niskocząsteczkowych związków indukujących powstawanie kompleksu trójskładnikowego z wykorzystaniem pary fluoroforów (akceptora i donora fluorescencyjnego) przyłączonych do pierwszego i drugiego białka, przy czym w przypadku pierwszego białka, cząsteczka fluoroforu przyłączona jest nie bezpośrednio, lecz z wykorzystaniem pary związków białkowych zawierających konkretne sekwencje aminokwasowe. Pomiar aktywności niskocząsteczkowego związku odbywa się poprzez pomiar zmiany poziomu fluorescencji, wywołanej transferem energii pomiędzy tymi wspomnianymi fluoroforami wskutek zbliżenia się tych cząsteczek indukowanego przez związek niskocząsteczkowy.

Przedmiotem wynalazku jest również test płytkowy wykorzystujący wspomniane związki białkowe.

Stan techniki

Technologia indukowanej degradacji – znaczenie, mechanizm działania i kompleks trójskładnikowy

Technologia indukowanej degradacji w ostatnich latach jest najbardziej dynamicznie rozwijającym się obszarem w procesie rozwoju leków. Dzięki zaangażowaniu naturalnych komponentów komórki – ligazy ubikwityny i proteasomu – umożliwia ona usunięcie białek odgrywających rolę w procesach chorobotwórczych. Innowacyjność technologii, polega na zbliżeniu celu molekularnego (białka) do wybranej ligazy ubikwityny za pośrednictwem niskocząsteczkowych związków chemicznych. W efekcie, dochodzi do ubikwitinacji celu molekularnego, czyli naznaczenia go do degradacji w proteasomie, co prowadzi do uzyskania efektu terapeutycznego. Niewątpliwą przewagą tej technologii jest potencjał celowania w dowolne białko w komórce, co otwiera możliwość opracowania związków działających na cele molekularne do tej pory uznawane za nieosiągalne (ang. *undruggable targets*), stanowiące około 80% ludzkiego proteomu. Do tej puli zaliczane są czynniki transkrypcyjne, białka błonowe oraz białka strukturalne (ang. *scaffold proteins*), które nie posiadają aktywności enzymatycznej, możliwej do zablokowania przez klasyczne inhibitory, a ich funkcja wynika z ich poziomu oraz oddziaływań z innymi białkami.

Indukowana degradacja białek chorobotwórczych, może zostać osiągnięta dzięki wykorzystaniu związków chemicznych, wywołujących fizyczne zbliżenie wybranego celu molekularnego do ligazy ubikwityny, utworzenie tzw. kompleksu trójskładnikowego i w konsekwencji wyznaczenie celu molekularnego do degradacji w proteasomie.

Jedną z dostępnych strategii jest wykorzystanie bifunkcyjnych degraderów, które zbudowane są z liganda wiążącego białko chorobotwórcze oraz liganda wiążącego ligazę ubikwityny, połączonych linkerem. Podczas rozwoju degraderów wysoka selektywność oraz skuteczność wytworzenia nowych oddziaływań białko-białko osiągana jest przez modyfikację wszystkich składowych (ligandów oraz linkera), co w konsekwencji sprowadza się do badania dużej ilości związków przed znalezieniem skutecznego degradera.

Alternatywna strategia oparta jest o poszukiwanie tzw. klejów molekularnych (ang. *molecular glues*) – małych związków chemicznych, które bezpośrednio wiążą się jedynie do ligazy ubikwityny, tworząc przy tym nową powierzchnię oddziaływania, umożliwiającą rozpoznanie nowych białek (tzw. neosubstratów). W obecności takich związków, „zmodyfikowana” ligaza oddziałuje z białkami, posiadającym szczególny motyw, a w konsekwencji dochodzi do utworzenia kompleksu trójskładnikowego, ubikwitinacji celu molekularnego i jego degradacji. W przeciwieństwie do klasycznych inhibitorów, tworzących kompleksy dwuskładnikowe z celem molekularnym zależnie od siły wiązania i zajęcia jednej kieszeni wiążącej, mechanizm działania związków bifunkcyjnych i klejów molekularnych jest bardziej skomplikowany i wymaga uzyskania stanu równowagi wiązania między trzema składnikami równocześnie. Badania wskazują, że wyznaczenie siły tworzenia kompleksu trójskładnikowego oraz określenie jego stabilności oraz kooperatywności oddziaływań białko-białko dużo lepiej przekłada się na skuteczność degradacji celu molekularnego, niż charakterystyka oddziaływań dwuskładnikowych (Bondeson DP i wsp. *Cell Chem Biol.* 2018 Jan 18; 25(1): 78–87.e5).

Pomimo szybkiego rozwoju technologii, opracowanie i optymalizacja związków indukujących degradację białek są nadal bardzo pracochłonne. Stwarza to potrzebę opracowania łatwego, szybkiego i przepustowego testu pozwalającego na pomiar tworzenia kompleksu trójskładnikowego, co umożliwi

uszeregowanie związków względem ich aktywności oraz wyznaczenie zależności między strukturą a aktywnością. Wybór odpowiedniego testu do charakterystyki związków indukujących oddziaływania białko-białko jest kluczowy dla dostarczenia wartościowej informacji zwrotnej dla chemików medycznych i dalszego rozwoju związków.

Znane metody screeningowe związków oraz ich ograniczenia

Wśród obecnie stosowanych sposobów umożliwiających pomiar powstania kompleksu trójskładnikowego wyróżnia się testy biofizyczne, biochemiczne oraz komórkowe.

Wśród testów komórkowych, znajduje się opracowany i skomercjalizowany przez firmę Promega – nano-BRET. Test ten pozwala na pomiar tworzenia kompleksu międzybiałkowego w żywych komórkach w wyniku działania związku, dzięki czemu aktywność degraderów oznaczana jest w warunkach fizjologicznych. Pomimo oczywistych zalet, w teście tym odrzucone zostają związki o słabej przepuszczalności przez błonę komórkową. Z tego względu testy w układach izolowanych, z wykorzystaniem białek rekombinowanych, pozwalają na lepsze zrozumienie zależności między strukturą a aktywnością związków.

Techniki biofizyczne SPR/BLI, umożliwiają detekcję oddziaływań białko-białko z wykorzystaniem metod spektroskopowych. Obie wymagają immobilizacji jednego białka na powierzchni sensorów kompatybilnych z urządzeniem. Strategie przyłączenia białek do powierzchni nośników, obejmują zarówno metody bezpośredniego sieciowania jak i ich wychwytywania z wykorzystaniem odpowiednich metek detekcyjnych, co może wiązać się z ograniczeniem swobody konformacyjnej, czy zablokowaniem miejsca wiązania (szczególnie w pierwszym przypadku). Innymi ograniczeniami tych sposobów są: czułość pomiaru, szczególnie w przypadku oddziaływań z niskocząsteczkowym ligandem; średnia przepustowość, zależna od modelu urządzenia; wysoki koszt sensorów, których zużycie zwiększa się w przypadku białek niestabilnych; wysoki koszt instrumentów pomiarowych. Z tych względów obie techniki nie są pierwszym wyborem, w przypadku badań przesiewowych.

Popularna ostatnio technologia ALPHA (ang. *Amplified Luminescent Proximity Homogenous Assay*) również wymaga immobilizacji białek na powierzchni nośników tzw. ziaren (ang. *beads*), przy czym jedno białko przyłączane jest do nośnika donorowego, a drugie do nośnika akceptorowego. Powstanie kompleksu trójskładnikowego, w obecności związku bifunkcyjnego, wykrywane jest w wyniku reakcji biochemicznej między ziarnami indukowanej falą światła o długości 680 nm z udziałem tlenu singletowego. W przypadku tej techniki, białka przyłączane są na powierzchni ziaren z wykorzystaniem metek detekcyjnych, co może powodować zawadę steryczną i wpływać na wiązanie. Ponadto, za transfer energii między donorem i akceptorem, odpowiada tlen singletowy, który jest reaktywną formą tlenu i może być wyciszany (ang. *quenched*) w obecności niektórych związków chemicznych, co prowadzi do fałszywie negatywnych wyników. Konieczność korzystania ze specjalnych ziaren, jest dodatkowym ograniczeniem, wpływającym na koszt testu oraz łatwość jego użycia.

Testy umożliwiające pomiar oddziaływań międzybiałkowych w roztworze, są oparte o polaryzację fluorescencji (ang. *Fluorescence Polarization, FP*), izotermiczną kalorymetrię miareczkową (ang. *Isothermal titration calorimetry*) czy zjawisko transferu energii rezonansu fluorescencji (FRET). W przypadku testów FP czy ITC ich wspólnym ograniczeniem jest duża ilość potrzebnego materiału, co w przypadku niektórych, trudnych do otrzymania białek rekombinowanych jest poważnym ograniczeniem i uniemożliwia ich zastosowanie w badaniach przesiewowych. Dodatkowo, test FP wymaga posiadania dodatkowej sondy fluorescencyjnej specyficznie wiążącej się do jednego z białek, co ogranicza jego zastosowanie w przypadku jej braku. ITC jest techniką o niskiej przepustowości, ze względu na długi czas trwania pojedynczego pomiaru (ok. 40 min).

Technika FRET jest podobna opisanego testu ALPHA, gdyż wykorzystuje zjawisko transferu energii między donorem a akceptorem w wyniku zbliżenia się dwóch cząsteczek do siebie. W odróżnieniu od testu ALPHA, FRET nie wymaga immobilizacji białek na nośnikach, ponieważ białka są bezpośrednio znakowane fluoroforami, dla których widmo emisji donora pokrywa się z widmem wzbudzenia akceptora. Dzięki temu zjawisku, zbliżenie dwóch białek w wyniku działania związku, może zostać odczytane przez pomiar fluorescencji. Chociaż technika ta ma wiele zalet, uniwersalność jej zastosowania jest ograniczona przez konieczność bezpośredniego znakowania białek fluoroforami, co w niektórych przypadkach jest problematyczne.

Podsumowując, na rynku dostępny jest duży wybór technik umożliwiających badanie kompleksu trójskładnikowego. Możliwość ich zastosowania w badaniach przesiewowych jest różna i często zależna od stabilności białek wybranych do badania, dostępnej ilości rekombinowanych preparatów, dostępności sond fluorescencyjnych, możliwości zakupu specjalnych nośników do immobilizacji oraz możliwości

sprzętowych laboratorium. Z tego powodu nadal istnieje potrzeba rynkowa opracowania testu uniwersalnego, sprawdzającego się niezależnie od wybranej ligazy i celu molekularnego, umożliwiającego badanie białek dla których nieznane są sondy fluorescencyjne czy specyficzne przeciwciała, bez konieczności immobilizacji białek, a przy tym zapewniającego dużą czułość w małej skali, zwiększając przez to przepustowość badania.

Cel wynalazku

Celem niniejszego wynalazku było opracowanie alternatywnego sposobu identyfikacji niskocząsteczkowych związków indukujących oddziaływanie białko-białko oraz powstawanie kompleksu trójskładnikowego, który umożliwiłby przewyższenie wad takich rozwiązań znanych ze stanu techniki.

W szczególności celem wynalazku było opracowanie sposobu ułatwiającego znakowanie analizowanych białek (np. fluoroforami).

Dodatkowo, celem wynalazku jest opracowanie sposobu, który mógłby być wykorzystany w postaci testu płytkowego, zapewniającego szybkie, powtarzalne testowanie związków niskocząsteczkowych, przykładowo w celu wykrywania związków o pożądanej aktywności biologicznej i/lub farmakologicznej.

Istota wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób *in vitro* identyfikacji niskocząsteczkowych związków indukujących powstawanie kompleksu trójskładnikowego. Istotą wynalazku jest to, że kontaktuje się

pierwsze białko połączone ze związkiem białkowym zawierającym pierwszą sekwencję aminokwasową o SEQ ID NO. 12,

drugie białko z przyłączoną cząsteczką fluoroforu,

związek białkowy zawierający drugą sekwencję aminokwasową o SEQ ID NO. 11, z przyłączoną cząsteczką fluoroforu oraz związek niskocząsteczkowy,

przy czym jedna z cząsteczek fluoroforu stanowi akceptor fluorescencyjny, a druga stanowi donor fluorescencyjny, przy czym widmo emisji donora fluorescencyjnego nakłada się na widmo absorpcji akceptora fluorescencyjnego,

a następnie dokonuje się pomiaru emisji promieniowania fluorescencyjnego dla długości fal odpowiadających widmom emisyjnym cząsteczek akceptora i donora fluorescencyjnego,

przy czym zmiana emisji promieniowania fluorescencyjnego przy długości fali odpowiadającej widmu emisyjnemu akceptora fluorescencyjnego względem długości fali odpowiadającej widmu emisyjnemu donora fluorescencyjnego oznacza utworzenie kompleksu trójskładnikowego zawierającego pierwsze białko, drugie białko i związek niskocząsteczkowy.

Korzystnie, związek białkowy zawierający drugą sekwencję aminokwasową zawiera lub składa się z sekwencji wybranej z grupy obejmującej sekwencje o SEQ ID NO. 2 i SEQ ID NO. 4.

Korzystnie, pierwsze białko jest połączone ze związkiem białkowym zawierającym pierwszą sekwencję aminokwasową za pomocą fuzji.

Korzystnie, drugie białko jest połączone z cząsteczką fluoroforu wiązaniem kowalencyjnym lub niekowalencyjnym.

Korzystnie, związek białkowy zawierający drugą sekwencję aminokwasową jest połączony z cząsteczką fluoroforu wiązaniem kowalencyjnym lub niekowalencyjnym.

Korzystnie, pierwsze białko stanowi dowolne białko z grupy obejmującej białka wchodzące w skład kompleksów ligaz ubikwityny E3, białko CRBN, enzymy koniugujące E3, enzymy deubikwitynujące, enzymy odpowiadające za neddylację, kinazy, fosfatazy, oksydoreduktazy, transferazy, hydrolazy, liazy, izomerazy oraz ligazy, przy czym białka te stanowią białka pełnej długości lub fragmenty białek pełnej długości, występujące pojedynczo lub w fuzji z innymi peptydami czy białkami, a

drugie białko, związek białkowy zawierający pierwszą sekwencję aminokwasową i związek białkowy zawierający drugą sekwencję aminokwasową stanowią białka pełnej długości lub fragmenty białek pełnej długości, pojedynczo lub w fuzji z innymi peptydami czy białkami.

W szczególnie korzystnej postaci wynalazku, pierwsze białko stanowi białko CRBN.

Korzystnie sposób stanowi przesiewowy sposób identyfikacji związków o aktywności biologicznej i/lub farmakologicznej.

Przedmiotem wynalazku jest ponadto, test płytkowy *in vitro*. Istotą wynalazku jest to, że test zawiera

pierwsze białko połączone ze związkiem białkowym zawierającym pierwszą sekwencję aminokwasową o SEQ ID NO. 12,

drugie białko z przyłączoną cząsteczką fluoroforu, związek białkowy zawierający drugą sekwencję aminokwasową o SEQ ID NO. 11, z przyłączoną cząsteczką fluoroforu, przy czym druga sekwencja aminokwasowa wykazuje silne powinowactwo do pierwszej sekwencji aminokwasowej,

przy czym jedna z cząsteczek fluoroforu stanowi akceptor fluorescencyjny, a druga stanowi donor fluorescencyjny, gdzie widmo emisji donora fluorescencyjnego nakłada się na widmo absorpcji akceptora fluorescencyjnego.

Korzystnie związek białkowy zawierający drugą sekwencję aminokwasową zawiera lub składa się z sekwencji wybranej z grupy obejmującej sekwencje o SEQ ID NO. 2 i SEQ ID NO. 4.

Korzystnie, pierwsze białko jest połączone ze związkiem białkowym zawierającym pierwszą sekwencję aminokwasową za pomocą fuzji.

Korzystnie, drugie białko jest połączone z cząsteczką fluoroforu wiązaniem kowalencyjnym lub niekowalencyjnym.

Korzystnie, związek białkowy zawierający drugą sekwencję aminokwasową jest połączony z cząsteczką fluoroforu wiązaniem kowalencyjnym lub niekowalencyjnym.

Korzystnie, pierwsze białko stanowi dowolne białko z grupy obejmującej białka wchodzące w skład kompleksów ligaz ubikwityny E3, białko CRBN, enzymy koniugujące E3, enzymy deubikwitynujące, enzymy odpowiadające za neddylację, kinazy, fosfatazy, oksydoreduktazy, transferazy, hydrolazy, liazy, izomeryzy oraz ligazy, przy czym białka te stanowią białka pełnej długości lub fragmenty białek pełnej długości, występujące pojedynczo lub w fuzji z innymi peptydami czy białkami, a

drugie białko, związek białkowy zawierający pierwszą sekwencję aminokwasową i związek białkowy zawierający drugą sekwencję aminokwasową stanowią białka pełnej długości lub fragmenty białek pełnej długości, pojedynczo lub w fuzji z innymi peptydami czy białkami.

Korzystnie, test płytkowy stanowi test do przesiewowej identyfikacji związków o aktywności biologicznej i/lub farmakologicznej.

Krótki opis figur rysunku

Przedmiot wynalazku zilustrowano na rysunku, na którym:

Fig. 1 przedstawia oczyszczone białko CaptorPrey-N [SEQ ID NO. 2], zwizualizowane za pomocą metody SDS-PAGE.

Fig. 2 przedstawia oczyszczony kompleks białkowy 8xHis-CRBN : 8xHis-CaptorBait-DDB1 [SEQ ID NO. 8], zwizualizowany za pomocą metody SDS-PAGE.

Fig. 3 przedstawia oczyszczone białko 6xHis-BRD4 (44-168)-AviTag [SEQ ID NO. 10], zwizualizowane za pomocą metody SDS-PAGE.

Fig. 4 przedstawia wynik testu LinkScape opartego na sposobie według wynalazku.

Fig. 5 przedstawia schemat działania testu LinkScape opartego na sposobie według wynalazku.

Szczegółowy opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób identyfikacji niskocząsteczkowych związków indukujących powstawanie kompleksu trójskładnikowego z wykorzystaniem pary fluoroforów (akceptora i donora fluorescencyjnego) przyłączonych do pierwszego i drugiego białka, przy czym w przypadku pierwszego białka, cząsteczka fluoroforu przyłączona jest nie bezpośrednio, lecz z wykorzystaniem pary związków białkowych zawierających konkretne sekwencje aminokwasowe. Pomiar aktywności niskocząsteczkowego związku odbywa się poprzez pomiar zmiany poziomu fluorescencji, wywołanej transferem energii pomiędzy tymi wspomnianymi fluoroforami wskutek zbliżenia się tych cząsteczek indukowanego przez związek niskocząsteczkowy.

W kontekście niniejszego wynalazku określenie kompleks trójskładnikowy oznacza kompleks zawierający pierwsze białko, drugie białko i związek niskocząsteczkowy.

W trakcie badań przeprowadzonych przez twórców wynalazku zauważono, że transfer energii wynikający ze zjawiska FRET (ang. *fluorescence resonance energy transfer*) pomiędzy dwoma fluoroforami zachodzi, poza opisanymi wcześniej warunkami, również wtedy, gdy fluorofor jest połączony z białkiem, dla którego poszukiwany jest niskocząsteczkowy związek, nie bezpośrednio (co jest znane w stanie techniki), lecz za pomocą układu złożonego z pary związków białkowych zawierających sekwencje o SEQ ID NO. 11 (Captor Prey) i SEQ ID NO. 12 (Captor Bait). Ten zaskakujący efekt techniczny ułatwia przeprowadzenie i zwiększa wiarygodność testu. Pomaga bowiem uniknąć bezpośredniego znakowania tego białka fluoroforem, co mogłoby zaburzać jego aktyw-

ność. Dodatkowo, sposób ten jest użyteczny w konstruowaniu testu wysokoprzepustowego, z użyciem różnych białek. Bezpośrednie znakowanie fluoroforem każdego z nich jest bowiem czasochłonne i kosztowne.

Przykładowy układ związków wykorzystywanych w korzystnej postaci wykonania sposobu według wynalazku przedstawiony jest na Fig. 5.

Pierwsze białko (1) oraz drugie białko (2) wyznakowane są kompatybilnymi fluoroforami, przy czym w przypadku pierwszego białka znakowanie zrealizowane jest przy pomocy pary związków białkowych zawierających sekwencje o SEQ ID NO. 11 (O – CaptorPrey) i SEQ ID NO. 12 (□ – CaptorBait). W wyniku fizycznego zbliżenia białek (1) oraz (2) w obecności aktywnego związku niskocząsteczkowego, następuje transfer energii pomiędzy fluoroforami (FRET). W efekcie obserwowana jest emisja światła o odmiennej długości fali (λ).

Pomiar aktywności niskocząsteczkowego związku chemicznego odbywa się poprzez pomiar zmiany poziomu fluorescencji wywołanej transferem energii pomiędzy fluoroforem (donorem) przyłączonym do drugiego białka oraz fluoroforem (akceptorem) przyłączonym do białka (związku białkowego) CaptorPrey, jak przedstawiono na Fig. 5.

Przykładowo dla następującego zestawu związków (opisanych również w poniższych przykładach wykonania):

Pierwsze białko (1) białko 8xHis-CRBN : 8xHis-CaptorBait-DDB1

Drugie białko (2) 6xHis-BRD4(44-168)-AviTag

zmiana fluorescencji jest monitorowana przy $\lambda=520$ nm w stosunku do fluorescencji przy $\lambda=490$ nm. Długości fali do pomiaru mogą być z łatwością dobrane przez znawcę w dziedzinie w zależności od zastosowanego zestawu fluoroforów.

W sposobie według wynalazku wykorzystywane są związki białkowe zawierające określone sekwencje aminokwasowe, konkretnie sekwencje o SEQ ID NO. 11 (określaną również jako Captor Prey) i SEQ ID NO. 12 (określaną również jako Captor Bait).

Stosowane w niniejszym opisie określenie „związek białkowy” oznacza związek składający się z aminokwasów, korzystnie białko pełnej długości lub fragment białka pełnej długości same lub w fuzji z innymi peptydami czy białkami.

W konsekwencji określenie związek białkowy zawierający lub składający się z sekwencji o danym numerze identyfikacyjnym SEQ ID NO. oznacza odpowiednio związek którego częścią jest dana sekwencja, a pozostałą część stanowią aminokwasy przyłączone od strony N-końca i lub C-końca wspomnianej sekwencji, lub związek składający się wyłącznie z określonej sekwencji.

W korzystnych postaciach wykonania wynalazku związek białkowy zawierający sekwencję aminokwasową o SEQ ID NO. 11 stanowi związek białkowy zawierający lub składający się z sekwencji aminokwasowej o SEQ ID NO. 2 (określanej również jako Captor Prey-N) lub SEQ ID NO. 4 (określanej również jako Captor Prey-C).

Zastosowane w sposobie wynalazku fluorofory mogą być dowolnymi stosowanymi w dziedzinie wynalazku parami akceptor/donor fluorescencyjny, pod warunkiem ich zgodności z zastosowanymi białkami i związkami białkowymi. W korzystnej postaci wykonania wynalazku, akceptor fluorescencyjny przyłączony jest do związku białkowego zawierającego drugą sekwencję aminokwasową o SEQ ID NO. 11, a donor fluorescencyjny przyłączony jest do drugiego białka. Taki układ nie wyklucza odwrotnego zastosowania akceptora/donora. W innej korzystnej postaci wykonania wynalazku donor fluorescencyjny przyłączony jest do związku białkowego zawierającego drugą sekwencję aminokwasową o SEQ ID NO. 11, a akceptor fluorescencyjny przyłączony jest do drugiego białka.

Połączenie cząsteczek fluoroforów ze związkiem białkowym i drugim białkiem może być zrealizowane przy wykorzystaniu wiązania kowalencyjnego lub niekowalencyjnego.

Pierwsze białko może stanowić dowolne białko, przy czym korzystnie stanowi białko z grupy obejmującej białka wchodzące w skład kompleksów ligaz ubikwityny E3, enzymy koniugujące E3, enzymy deubikwitynujące, enzymy odpowiadające za neddylację, kinazy, fosfatazy, oksydoreduktazy, transferazy, hydrolazy, liazy, izomerazy oraz ligazy. Istotne jest, że wskazane powyżej białka stanowią białka pełnej długości lub fragmenty białek pełnej długości, występujące pojedynczo lub w fuzji z innymi peptydami czy białkami. W najkorzystniejszej postaci wykonania, pierwsze białko stanowi ligaza ubikwityny E3 (np. kompleks CRBN : DDB1) zastosowana w poniższych przykładach wykonania.

Drugie białko może stanowić dowolne białko, przy czym białko to może być otrzymane i oczyszczone w całości lub jako fragment białka pełnej długości, pojedynczo lub w fuzji z innymi peptydami czy

białkami. W korzystnej postaci wykonania, drugie białko stanowi białko 6xHis-BRD4(44-168) zastosowane w poniższych przykładach wykonania.

Związek białkowy zawierający pierwszą sekwencję aminokwasową i związek białkowy zawierający drugą sekwencję aminokwasową mogą być otrzymane i oczyszczone w całości lub jako fragmenty białek pełnej długości, pojedynczo lub w fuzji z innymi peptydami czy białkami, i mogą stanowić dowolne związki zawierające odpowiednio sekwencje aminokwasowe o SEQ ID NO. 12 i SEQ ID NO. 11. W korzystnej postaci wykonania wynalazku związek białkowy zawierający drugą sekwencję aminokwasową zawiera lub składa się z sekwencji wybranej z grupy obejmującej sekwencje aminokwasowe o SEQ ID NO. 2 i SEQ ID NO. 4.

Jako związek niskocząsteczkowy może być zastosowany dowolny niskocząsteczkowy związek chemiczny wykazujący potencjalną aktywność biologiczną lub farmakologiczną, korzystnie potencjalnie indukujący powstawanie kompleksu trójskładnikowego, szczególnie korzystnie może go stanowić związek dBET 1, stosowany w poniższych przykładach.

Sposób według wynalazku może znaleźć zastosowanie przede wszystkim w przesiewowych testach związków wykazujących aktywność biologiczną lub farmakologiczną – kandydatów na leki.

W korzystnej postaci wynalazku, sposób według wynalazku urzeczywistniany jest w postaci testu płytkowego służącego identyfikacji związków indukujących powstawanie kompleksu trójskładnikowego, korzystnie związków wykazujących aktywność biologiczną lub farmakologiczną.

Test oparty na sposobie według wynalazku (LinkScape) – opis technologii oraz jej zalety

Sposób według wynalazku umożliwia identyfikację niskocząsteczkowych związków indukujących powstawanie kompleksu trójskładnikowego w roztworze. W szczególnie korzystnej postaci wykonania test ten znajduje zastosowanie w monitorowaniu powstawania kompleksu trójskładnikowego, w którego skład wchodzi stanowiąca pierwsze białko – ligaza ubikwityny E3 (np. kompleks CRBN : DDB1), stanowiące drugie białko – białko substratowe (BRD4) oraz stanowiący związek niskocząsteczkowy – związek bifunkcyjny (dBET1). Białko substratowe za pomocą znanych w biochemii reakcji (np. biotyna : streptawidyna) zostaje wyznakowane kompatybilnym akceptorem fluorescencji (z fluoroforem przyłączonym do związku białkowego zawierającego sekwencję aminokwasową o SEQ ID NO. 11 (sekwencję CaptorPrey) dla reakcji typu FRET/BRET). W obecności testowanego bifunkcyjnego związku, zdolnego do wiązania się zarówno do ligazy jak i do białka substratowego, dochodzi do zbliżenia donora i akceptora fluorescencji (na odległość poniżej około 120 Angströmów, przy czym określenie około oznacza odchylenie równe $\pm 5\%$ względem deklarowanej wartości) i transferu energii pomiędzy fluoroforami w mechanizmie FRET, co prowadzi do emisji światła o długości fali odpowiadającej widmu emisyjnemu cząsteczki akceptorowej.

Sposób ten opiera się o nowe zastosowanie fragmentów rekombinowanych białek FimG oraz FimF (w niniejszym dokumencie nazywane odpowiednio CaptorPrey (SEQ. ID NO. 11) oraz CaptorBait (SEQ ID NO. 12) do znakowania pierwszego białka fluoroforem, a następnie przeprowadzenie testu płytkowego opartego o pomiar fluorescencji z udziałem tego białka. W szczególnej postaci wykonania wynalazku sposób uwzględnia przygotowanie rekombinowanych wariantów białka CaptorPrey (CaptorPrey-N (SEQ. ID NO. 2) lub CaptorPrey-C (SEQ. ID NO.4), dla których możliwe jest znakowanie fluoroforem poprzez przygotowanie koniugatów tiolowo – maleimidowych. Tak zmodyfikowany CaptorPrey może zostać użyty do uniwersalnego i specyficznego wyznakowania fluoroforem dowolnego białka posiadającego w swojej sekwencji peptyd CaptorBait.

Opisany układ, ze względu na stabilność komponentów, z których jest złożony, oraz budowę modułową i kombinatoryczną zapewniającą uniwersalność jego zastosowania do badania oddziaływania pomiędzy dowolnymi białkami, idealnie nadaje się do wysokoprzepustowej identyfikacji związków indukujących powstawanie kompleksu trójskładnikowego. Uniwersalność została uzyskana przez wykorzystanie rekombinowanego białka CaptorPrey, które umożliwia wykonanie testu bez konieczności znakowania bezpośrednio ligazy ubikwityny. Brak konieczności bezpośredniego znakowania ligaz E3 czy enzymów E2 wykorzystywanych w teście, pozwala na uniknięcie zablokowania aktywności niektórych białek (ligazy z rodziny HECT oraz enzymy E2 posiadają cysteinę w miejscu aktywnym). Dodatkowo, znakowanie jedynie CaptorPrey umożliwia zredukowanie ilości wykorzystanego znacznika, ujednolicenie protokołu znakowania oraz uniknięcie strat białek wykorzystanych do badania (np. podczas oczyszczania białka z wolnego fluoroforu po znakowaniu).

Test oparty na sposobie według wynalazku nadaje się do pomiaru w systemie 96- i 384-dołkowym i wymaga standardowego spektrofлуorymetru. Wspomniany test jest kompatybilny ze znacznikami typu FRET/BRET, a więc może zostać dostosowany do odpowiednich wymagań. Dzięki zastosowaniu

znaczników zarówno na białku donorowym jak i akceptorowym, możliwy jest pomiar sygnału obu białek, co pozwala na kontrolę błędów pipetowania i ewentualną korektę sygnału w celu uzyskania faktycznego stosunku białek. Test ten ma również zdecydowanie większą czułość i zakres dynamiczny, niż w przypadku innych metod fluorescencyjnych, jak na przykład FP. Ponadto, wszystkie reagenty mogą zostać łatwo odmierzone w dołkach płytki pomiarowej tak, aby użytkownik miał możliwość szybkiego pomiaru stałych dysocjacji i/lub stałych kinetycznych reakcji enzymatycznej, co zwiększa przepustowość badania.

Tworzenie kompleksu CaptoPrey : CaptoBait

Przy konstrukcji pary CaptoPrey oraz CaptoBait wykorzystano mechanizm opisany dla oddziaływania białek strukturalnych bakterii *E. coli*. Pile typu 1 *E. coli*, złożone są z 4 podjednostek białek strukturalnych – FimH, FimG, FimF oraz FimA. Białka te tworzą silne, lecz niekowalencyjne oddziaływania, przez tzw. mechanizm uzupełnienia nicią donorową. Każda z podjednostek, w celu utworzenia poprawnej struktury, musi zostać uzupełniona fragmentem kolejnej podjednostki (tzw. nicią donorową).

Mechanizm ten został wykorzystany do opracowania nowego systemu oczyszczania białek z wykorzystaniem chromatografii powinowactwa (Giese Ch. i wsp., Angew Chem Int Ed Engl. 2012, 51, 4474–4478). Autorzy cytowanej publikacji przygotowali wariant białka FimG pozbawiony nici donorowej (FimGt) oraz 15-aminokwasowy peptyd (DsF) odpowiadający nici donorowej sąsiedniej podjednostki FimF. Uzyskany kompleks FimGt/DsF był kinetycznie bardzo stabilny, o stałej dysocjacji (K_D) równej $1,5 \times 10^{-20} \text{ M}$.

W dalszych badaniach Giese Ch. i wsp. (Giese Ch. i wsp., Angew Chem Int Ed Engl. 2016 Aug 1; 55(32): 9350–5) zoptymalizowali sekwencje zarówno FimGt oraz DsF, celem zwiększenia komplementarności powierzchni elektrostatycznej. W wyniku mutacji kilku reszt aminokwasowych w obu białkach, uzyskano termodynamicznie najbardziej stabilny kompleks FimGt (Q134E-S138E)/DsF (T4R-T6R-D13N) o parametrach kinetycznych: $k_{on} = (2,52 \pm 0,05) \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $k_{off} = (2,2 \pm 0,5) \times 10^{-17} \text{ s}^{-1}$ zwiększając powinowactwo oddziaływania o dwa rzędy wielkości ($K_D = (8,8 \pm 2,0) \times 10^{-22} \text{ M}$).

Dotychczas, opisana para białek została wykorzystana jedynie w chromatografii powinowactwa, celem ułatwienia oczyszczania białek o niskiej ekspresji oraz dużych kompleksów białkowych. W opisanym tutaj wynalazku układ ten został po raz pierwszy wykorzystany do uniwersalnego znakowania białek fluoroforem. Twórcy wynalazku zauważyli, że układ ten po odpowiednim zmodyfikowaniu może być wykorzystany w teście płytkowym ze względu na powolną dysocjację, a także stabilność układu w szerokim zakresie pH, stężenia soli oraz temperatury.

Przykład wykonania

Układ zawierający kompleks CRBN : DDB1 oraz białko substratowe BRD4

Opis ogólny.

Niniejszy przykład wykonania przedstawia sposób identyfikacji związku testowego dBET1 (nisko-cząsteczkowego związku indukującego powstawanie kompleksu trójskładnikowego) za pomocą przykładowego testu płytkowego, w którym wykorzystano następujące elementy:

1. kompleks białkowy 8xHis-CRBN : 8xHis-CaptorBait-DDB1 (SEQ. ID NO. 8);
2. rekombinowane białko 6xHis-BRD4(44-168)-AviTag (SEQ. ID NO. 10), skoniugowane z fluoroforem;
3. rekombinowane białko CaptorPrey skoniugowane z fluoroforem;
4. związek testowy dBET1.

W powyższym układzie, aktywność związku dBET1, rozumiana jako zdolność fizycznego zbliżenia do siebie białka 8xHis-CRBN : 8xHis-CaptorBait-DDB1 oraz białka 6xHis-BRD4(44-168)-AviTag jest monitorowana poprzez zmianę poziomu fluorescencji przy $\lambda = 520 \text{ nm}$ (pasmo emisji zastosowanego akceptora fluorescencyjnego) w stosunku do fluorescencji przy $\lambda = 490 \text{ nm}$ (pasmo emisji zastosowanego donora fluorescencyjnego).

Opis eksperymentalny.

- a) Otrzymywanie białka rekombinowanego CaptorPrey

W celu uzyskania rekombinowanego białka CaptorPrey przygotowano 2 warianty bakteryjnego plazmidu ekspresyjnego zawierającego sekwencję białka FimGt (Q134E, S138E) opisanego przez Giese Ch. i wsp., Angew Chem Int Ed Engl. 2016 Aug 1;55(32): 9350–5; zmodyfikowanego poprzez użycie poniższych primerów:

- Dla uzyskania sekwencji CaptorPrey-N:
NF: TTCAGCCAAACCGTGTACGGTTTC
NR: CCGCACATATGTATATCTCCTTCTTAA
- Dla uzyskania sekwencji CaptorPrey-C:
CF: TGCTCATAAGGATCCGGCTGCTAAC
CR: TGAACCGCTGTAGGTATAGGTGATTTC

Sekwencje nukleotydowe i aminokwasowe CaptorPrey-N przedstawiono odpowiednio jako SEQ ID NO. 1 oraz SEQ ID NO. 2, a CaptorPrey-C jako SEQ ID NO. 3 oraz SEQ ID NO. 4. Obecność poprawnej sekwencji nukleotydowej potwierdzono poprzez sekwencjonowanie.

Ekspresję obu wariantów białka przeprowadzono w komórkach bakteryjnych szczepu BL21DE3 w pożywce Terrific Broth (TB) przez 4 h (37°C, 200 rpm).

W celu uzyskania ciałek inkluzyjnych dezintegrację komórek bakteryjnych przeprowadzono przez sonikację pelletu bakteryjnego w buforze do lizy (Tris-HCl 50 mM pH 8,0, NaCl 100 nM, 1 mM EDTA, 1 mM PSF). Lizat zwirowano (500 rcf, 10 min, 4°C), następnie frakcję supernatantu podano ultrawirowaniu (60 000 rcf, 10 min, 4°C). Uzyskane ciałka inkluzyjne oczyszczono wstępnie poprzez kilka cykli sonikacji w buforze (Tris-HCl 50 mM pH 8,0, NaCl 100 nM, 2% Triton, 2M mocznik) i w wodzie, na przemian z ultrawirowaniem (60 000 rcf, 10 min, 4°C).

Ciałka inkluzyjne rozpuszczono w buforze denaturującym (Tris-HCl 20 mM pH 8,0, 8M mocznik, 1 mM EDTA, 100 nM DTT) przez noc, w 4°C, na mieszadle magnetycznym. Rozwór poddano ultrawirowaniu (60 000 rcf, 30 min, 20°C), supernatant poddano oczyszczaniu za pomocą chromatografii jonowymiennej na złożu HighQ, stosując elucję w gradiencie NaCl (0 – 400 nM), w buforze 20 mM Tris-HCl pH 8,0). Frakcje zawierające białko połączono i dializowano do buforu (20 mM CH₃COOH-NaOH pH 4,0, 8M mocznik), następnie zatężono do stężenia białka wynoszącego 80 µM.

Zatężony roztwór białka rozcieńczono 40-krotnie buforem (100 mM Tris-HCl pH 8,5, 1 mM GSH, 0,5 mM GSSG) i inkubowano przez 1 h w temperaturze pokojowej (RT). Kolejne etapy przeprowadzono w temperaturze 4°C. Białko zatężono i przedializowano do buforu (20 mM Tris, pH 8,0). Następnie białko oczyszczono na złożu Superdex 200 26/60, eluując do buforu końcowego (20 mM Tris pH 7,5).

Oczyszczone białko CaptorPrey-N zwizualizowano za pomocą metody SDS-PAGE. Wyniki tej wizualizacji przedstawiono na Fig. 1.

b) Przygotowanie znakowanego fluorescencyjnie białka CaptorPrey

Oczyszczone białko CaptorPrey-N oraz CaptorPrey-C wyznakowano Alexa Fluor™ 488 C5 maleimide (Invitrogen, numer katalogowy: A10254) zgodnie z protokołem producenta (Thermo Fisher). Następnie koniugaty CaptorPrey-N-Alexa488 oraz CaptorPrey-C-Alexa488 oczyszczono z nadmiaru znacznika na kolumnie odsalającej.

c) Otrzymywanie białka rekombinowanego CRBN : DDB1-CaptorBait

W celu uzyskania rekombinowanego kompleksu białkowego 8xHis-CRBN : 8xHis- DDB1-CaptorBait przygotowano 2 plazmidy pAC8 do ekspresji w komórkach owadzych zawierające sekwencje kodujące 8xHis-CRBN oraz 8xHis-DDB1-CaptorBait. Sekwencje nukleotydowe i aminokwasowe 8xHis-CRBN przedstawiono odpowiednio jako SEQ ID NO. 5 oraz SEQ ID NO. 6, a 8xHis-DDB1-CaptorBait jako SEQ ID NO. 7 oraz SEQ ID NO. 8. Obecność poprawnej sekwencji nukleotydowej potwierdzono poprzez sekwencjonowanie.

Wektory bakulowirusowe zawierające sekwencje kodujące 8xHis-CRBN oraz 8xHis-DDB1-CaptorBait wytworzono osobno poprzez kotransfekcję komórek owadzych Sf-9 (Thermo Fisher Scientific) wyżej opisanymi plazmidami pAC8 oraz zlinearyzowanym DNA bakulowirusowym. Wektory bakulowirusowe amplifikowano w komórkach Sf-9 do 3 (trzeciego) pasażu. Ekspresję białka przeprowadzono w komórkach High Five™ (Thermo Fisher Scientific) poprzez koinfekcję wektorami bakulowirusowymi zawierającymi sekwencje kodujące 8xHis-CRBN oraz 8xHis-DDB1-CaptorBait. Ekspresję prowadzono przez 2 dni (27°C, 130 rpm).

Zebrany pellet komórkowy zlizowano w buforze (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 0,2M NaCl, 1 mM DTT, 1 mM PSF, koktajl inhibitorów proteaz (Sigma Aldrich, nr. kat. 11697498001)) przez sonikację. Lizat poddano ultrawirowaniu (60 000 rcf, 40 min, 4°C) i oczyszczaniu na złożu NiNTA w buforze (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 0,2M NaCl, 1 mM DTT), eluując białko w tym samym buforze z dodatkiem 200 mM imidazolu. W następnym kroku białko oczyszczono na złożu Superdex 200 26/60, eluując do buforu końcowego (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 200 mM NaCl, 1 mM DTT, 5% glicerol).

Oczyszczony kompleks białkowy 8xHis-CRBN : 8xHis-CaptorBait-DDB1 zwizualizowano za pomocą metody SDS-PAGE. Wyniki tej wizualizacji przedstawiono na Fig. 2.

Otrzymywanie białka rekombinowanego 6xHis-BRD4 (44-168)-AviTag

W celu uzyskania białka rekombinowanego przygotowano bakteryjny plazmid ekspresyjny zawierający sekwencję kodującą 6xHis-BRD4 (44-168)-AviTag. Sekwencje nukleotydowe i aminokwasowe przedstawiono odpowiednio jako SEQ ID NO. 9 oraz SEQ ID NO. 10. Obecność poprawnej sekwencji nukleotydowej potwierdzono poprzez sekwencjonowanie.

Ekspresję białka przeprowadzono w komórkach bakteryjnych szczepu BL21DE3 w medium Terrific Broth (TB) przez noc (25°C, 200 rpm).

Zebrany pellet komórkowy zlizowano w buforze (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 0,1 M NaCl, 1 mM PSF) przez sonikację. Lizat poddano wirowaniu (14 000 rcf, 20 min, 4°C) i oczyszczaniu na złożu NiNTA (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 100 mM NaCl). Elucję prowadzono w tym samym buforze, w gradiencie imidazolu. Następnie przeprowadzono oczyszczanie na złożu Superdex 75 pg 26/600, eluując do buforu końcowego (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 100 mM NaCl).

Oczyszczone białko 6xHis-BRD4 (44-168)-AviTag, zwizualizowano za pomocą metody SDS-PAGE. Wyniki tej wizualizacji przedstawiono na Fig. 3.

Otrzymywanie biotynylowanego białka 6xHis-BRD4 (44-168)-AviTag

Biotynylację białka 6xHis-BRD4(44-168)-AviTag przeprowadzono z wykorzystaniem zestawu Bulk BirA: BirA biotin – protein ligase bulk reaction kit (Avidity), zgodnie z instrukcją producenta. Następnie białko oddzielono od mieszaniny reakcyjnej na kolumnie Superdex 75 pg 26/600 do buforu Tris 50 mM pH 8,0, 100 mM NaCl.

Przeprowadzenie testu płytkowego

Mieszanina reakcyjna zawierająca białkowe składniki testu została przygotowana poprzez rozpietowanie na płytce 384-dołkowej po 3,3 µl roztworu 1 (1200 nM CRBN : DDB1-CaptorBait, 6000 nM CaptorPrey-N-Alexa488 lub CaptorPrey-C-Alexa488, 2% DMSO w buforze PBS) oraz po 3,3 µl roztworu 2 (600 nM 6xHis-BRD4(44-168)-AviTag, 150 nM TbSA, 2% DMSO, 3 mM DTT, 0.3% Tween w buforze PBS). W dołkach kontrolnych (rzęd B w Tabeli 1) roztwór 1 nie zawierał białka CRBN : DDB1-CaptorBait.

Po 30 minutach inkubacji na płytce do płytki dodano po 3,3 µl odpowiedniego rozcieńczenia związku dBET1 przygotowanego w buforze PBS z 6% DMSO. W Tabeli 1 poniżej przedstawiono końcowe stężenia w mieszaninie reakcyjnej. W tabeli tej A oznacza dołki testowe zawierające: 400 nM CRBN : DDB1-CaptorBait, 2000 nM CaptorPrey-N-Alexa488 lub CaptorPrey-C-Alexa488, 200 nM 6xHis-BRD4(44-168)-AviTag, 50 nM TbSA, 2% DMSO, 1 mM DTT, dBET1 (w stężeniu wskazanym poniżej) w buforze PBS, a B oznacza dołki kontrolne zawierające: 2000 nM CaptorPrey-N-Alexa488 lub CaptorPrey-C-Alexa488, 200 nM 6xHis-BRD4(44-168)-AviTag, 50 nM TbSA, 2% DMSO, 1 mM DTT, dBET 1 (w stężeniu wskazanym poniżej) w buforze PBS.

Tabela 1: Układ płytki testowej – stężenia związku dBET1 w tabeli przedstawiono w nM.

	1	3	5	7	9	11	13	15	17	19	21	23
A	10000, 0	5000, 0	2500, 0	1250, 0	625, 0	312, 5	156, 3	78, 1	39, 0	19, 5	9, 8	0
B	10000, 0	5000, 0	2500, 0	1250, 0	625, 0	312, 5	156, 3	78, 1	39, 0	19, 5	9, 8	0

Po zwirowaniu płytki przeprowadzono pomiar fluorescencji z użyciem czytnika 10 płytek PHERA-star z układem optycznym Lanthascreen przy wykorzystaniu parametrów przedstawionych w Tabeli 2.

Tabela 2: Parametry "LanthaScreen kinetic protocol"

Ustawienia optyczne	
Równoczesna podwójna emisja	YES
Mnożnik stosunku:	1
Początek integracji [μ s]:	100
Czas trwania integracji [μ s]:	500
Ustawienia ogólne	
Ustawiony czas [s]:	0.5
Liczba cykli	60
Liczba błysków na dołek w cyklu	200
czas cyklu [s]	60
Całkowity zmierzony czas/dolek [ms]	1166
Zwłoka przed cyklem	0

Wyniki w danym punkcie czasowym oraz stężeniu przedstawiono jako stosunek fluorescencji przy $\lambda = 520$ nm do sygnału przy $\lambda = 490$ nm. Wzrost tej wartości należy interpretować jako wynik zjawiska FRET pomiędzy cząsteczkami fluoroforów, będącego następstwem zbliżenia wyznakowanych nimi białek (w tym przypadku – CRBN-DDB1 oraz BRD4). Wzrost wartości zależny od stężenia związku (w tym przypadku dBET1) świadczy o powstawaniu kompleksu trójskładnikowego, indukowanego przez oddziaływanie związku równocześnie z CRBN-DDB1 oraz BRD4.

Wyniki testu LinkScape opartego na sposobie według wynalazku w układzie zawierającym kompleks CRBN : DDB1 znakowany fluoroforem poprzez układ CaptorBait : CaptorPrey-N oraz białko BRD4, przeprowadzonego z różnymi stężeniami związku niskocząsteczkowego dBET1 przedstawiono wizualnie na Fig. 4. Na wykresie przedstawiono średnie wartości (w cyklach 11–15) stosunku fluorescencji przy $\lambda=520$ do fluorescencji przy $\lambda=490$ (520/490) w zależności od stężenia dBET1, znormalizowane do najwyższej wartości sygnału. Wyniki przedstawione na Fig. 5 potwierdzają pozytywny wynik testu.

Wykaz sekwencji**SEQ ID NO. 1**

Sekwencja nukleotydowa CaptorPrey-N (ORF).

ATGTGCGGTTTCAGCCAAACCGTGTACGGTTTCCACCACCAATGCCACGGTTGATCTC
GGCGATCTTTATTCTTTTCAGTCTTATGTCTGCCGGGGCGGCATCGGCCTGGCATGAT
GTTGCGCTTGAGTTGACTAATTGTCCGGTGGGAACGTCGAGGGTCACTGCCAGCTT
CAGCGGGGCAGCCGACAGTACCGGATATTATAAAAACCAGGGGACCGCGCAAAACA
TCCAGTTAGAGCTACAGGATGACAGTGGCAACACATTGAATACTGGCGCAACCAAAA
CAGTTCAGGTGGATGATTCCTCACAATCAGCGCACTTCCCGTTACAGGTCAGAGCAT
TGACAGTAAATGGCGGAGCCACTCAGGGAACCATTGAGGCAGTGATTGAAATCACCT
ATACCTACAGCTAA

SEQ ID NO. 2

Sekwencja aminokwasowa CaptorPrey-N (ORF). Sekwencję CaptorPrey zaznaczono pogrubioną czcionką.

MCGSAKPCTVSTTNATVDLGDLYSFSLMSAGAASAWHDVALELTNCPVGTSRVTASF
SGAADSTGYYNQGT AQNIQLELQDDSGNTLNTGATKTVQVDDSSQSAHFPLQVRAL
TVNGGATQGTIEAVIEITYTYS

SEQ ID NO. 3

Sekwencja nukleotydowa CaptorPrey-C (ORF).

ATGGCCAAACCGTGTACGGTTTCCACCACCAATGCCACGGTTGATCTCGGCGATCTT
TATTCTTTCAGTCTTATGTCTGCCGGGGCGGCATCGGCCTGGCATGATGTTGCGCTT
GAGTTGACTAATTGTCCGGTGGGAACGTCCAGGGTCACTGCCAGCTTCAGCGGGGC
AGCCGACAGTACCGGATATTATAAAAACAGGGGACCGCGCAAAACATCCAGTTAGA
GCTACAGGATGACAGTGGCAACACATTGAATACTGGCGCAACCAAAACAGTTCAGGT
GGATGATTCTCACAATCAGCGCACTTCCCGTTACAGGTCAGAGCATTGACAGTAAA
TGGCGGAGCCACTCAGGGAACCATTGAGGCAGTGATTGAAATCACCTATACCTACAG
CGGTTTCATGCTCATAA

SEQ ID NO. 4

Sekwencja aminokwasowa CaptorPrey-C (ORF). Sekwencję CaptorPrey zaznaczono pogrubioną czcionką.

**MAKPCTVSTTNATVDLGDLYSFLMSAGAASAWHDVALELTNCPVGTSRVTASFSGA
ADSTGYKYNQGT AQNIQLELQDDSGNTLNTGATKTVQVDDSSQSAHFPLQVRALTVN
GGATQG TIEAVIEITYTYS GSCS**

SEQ ID NO. 5

Sekwencja nukleotydowa 8xHis-CRBN (ORF).

ATGGGTCACCACCATCACCATCATCACCATGGTGGAGGCGGTCTTGAAGTCTTGTTT
CAAGGTCCTGGCGGCGGTATGGCCGGCGAAGGAGATCAGCAGGACGCTGCGCACA
ACATGGGCAACCACCTGCCGCTCCTGCCTGCAGAGAGTGAGGAAGAAGATGAAATG
GAAGTTGAAGACCAGGATAGTAAAGAAGCCAAAAAACCAACATCATAAATTTTGACA
CCAGTCTGCCGACATCACATACATACCTAGGTGCTGATATGGAAGAATTCATGGCA
GGACTTTGCACGATGACGACAGCTGTCAGGTGATTCCAGTTCTTCCACAAGTGATGA
TGATCCTGATTCCCGGACAGACATTACCTCTTCAGCTTTTTTACCCTCAAGAAGTCAG
TATGGTGCGGAATTTAATTCAGAAAGATAGAACCCTTGCTGTTCTTGCATACAGCAAT
GTACAGGAAAGGGAAGCACAGTTTGAACAACAGCAGAGATATATGCCTATCGAGAA
GAACAGGATTTTGAATTGAGATAGTGAAAGTGAAAGCAATTGGAAGACAAAGGTTT
AAAGTCCTTGAGCTAAGAACACAGTCAGATGGAATCCAGCAAGCTAAAGTGCAAATT
CTTCCCGAATGTGTGTTGCCTTCAACCATGTCTGCAGTTCAATTAGAATCCCTCAATA
AGTGCCAGATATTTCTTCAAAACCTGTCTCAAGAGAAGACCAATGTTTCATATAAATG
GTGGCAGAAATACCAGAAGAGAAAAGTTTCATTGTGCAAATCTAACTTCATGGCCTCG
CTGGCTGTATTCCTTATATGATGCTGAGACCTTAATGGACAGAATCAAGAAACAGCTA
CGTGAATGGGATGAAAATCTAAAAGATGATTCTCTTCCTTCAAATCCAATAGATTTTC
TTACAGAGTAGCTGCTTGCTTCTTCTATTGATGATGTATTGAGAATTCAGCTCCTTAAAA
TTGGCAGTGCTATCCAGCGACTTCGCTGTGAATTAGACATTATGAATAAATGTACTTC
CCTTTGCTGTAAACAATGTCAAGAAACAGAAATAACAACCAAAAATGAAATATTCAGTT
TATCCTTATGTGGGCGGATGGCAGCTTATGTGAATCCTCATGGATATGTGCATGAGA

CACTTACTGTGTATAAGGCTTGCAACTTGAATCTGATAGGCCGGCCTTCTACAGAACAC
CAGCTGGTTTCCTGGGTATGCCTGGACTGTTGCCAGTGTAAGATCTGTGCAAGCCA
TATTGGATGGAAGTTTACGGCCACCAAAAAAGACATGTCACCTCAAAAATTTGGGG
CTTAACGCGATCTGCTCTGTTGCCACGATCCCAGACACTGAAGATGAAATAAGTCC
AGACAAAGTAATACTTTGCTTG

SEQ ID NO. 6

Sekwencja aminokwasowa 8xHis-CRBN (ORF).

MGHHHHHHHHGGGGLEVLFGQPGGGMAGEGDQQDAAHNMGNHLPLPAESEEDEM
EVEDQDSKEAKKPNIIINFDTSLPTSHTYLGDMEEFHGRTLHDDSDCQVIPVLPQVMMILI
PGQTLPLQLFHPQEVSMVRNLIQKDRTFVLAYSNVQEREAQFGTTAEIYAYREEQDFGI
EIVKVKAIQRQRFKVLELRQSDGIQQAQVQILPECVLPSTMSAVQLESLNKCQIFPSKPV
SREDQCSYKWWQKYQKRKFHCANLTSWPRWLYSLYDAETLMDRIKKQLREWDENLKD
DSLPSNPIDFSYRVAACLPIDDLVRIQLLKIGSAIQRLRCELDIMNKCTSLCCKQCQETEITT
KNEIFSLSLCGPMAAYVNPBGYVHETLTVYKACNLNLIGRPSTEHSWFPGYAWTVAQCKI
CASHIGWKFTATKKDMSPQKFWGLTRSALLPTIPDTEDEISPDKVILCL

SEQ ID NO. 7

Sekwencja nukleotydowa 8xHis-CaptorBait-DDB1 (ORF).

ATGGGTCACCACCATCACCATCATCACCATGGTGGAGGCGGTCTTGAAGTCTTGTTT
CAAGGTCCTGGCGGCGGTGCAGACTCCCGTATAAGGATTGCGGTTACGTTCTGTA
TAATGGTGGCGGCGGTGGCATGTCTGTAACACTACGTGGTAACGGCCCAGAAGCCCA
CCGCGGTGAACGGCTGCGTGACCGGACACTTTACTTCGGCCGAAGACTTAAACCTG
TTGATTGCCAAAAACACGAGATTAGAGATCTATGTGGTCACCGCCGAGGGGCTTCGG
CCCGTCAAAGAGGTGGGCATGTATGGGAAGATTGCGGTCATGGAGCTTTTCAGGCC
CAAGGGGGGAGAGCAAGGACCTGCTGTTTATCTTGACAGCGAAGTACAATGCCTGCAT
CCTGGAGTATAAACAGAGTGGCGAGAGCATTGACATCATTACGCGAGCCCATGGCA
ATGTCCAGGACCGCATTGGCCGCCCTCAGAGACCGGCATTATTGGCATCATTGAC
CCTGAGTGCCGGATGATTGGCCTGCGTCTCTATGATGGCCTTTTCAAGGTTATTCCA
CTAGATCGCGATAATAAAGAACTCAAGGCCTTCAACATCCGCCTGGAGGAGCTGCAT
GTCATTGATGTCAAGTTCCTATATGGTTGCCAAGCACCTACTATTTGCTTTGTCTACC
AGGACCCTCAGGGGCGGCACGTAAAAACCTATGAGGTGTCTCTCCGAGAAAAGGAA
TTCAATAAGGGCCCTTGGAACAGGAAAATGTCGAAGCTGAAGCTTCCATGGTGATC
GCAGTCCCAGAGCCCTTTGGGGGGGCCATCATCATTGGACAGGAGTCAATCACCTA
TCACAATGGTGACAAATACCTGGCTATTGCCCTCCTATCATCAAGCAAAGCACGATT
GTGTGCCACAATCGAGTGGACCCTAATGGCTCAAGATACCTGCTGGGAGACATGGA
AGGCCGGCTCTTCATGCTGCTTTTGGAGAAGGAGGAACAGATGGATGGCACCGTCA
CTCTCAAGGATCTCCGTGTAGAACTCCTTGGAGAGACCTCTATTGCTGAGTGCTTGA

CATACCTTGATAATGGTGTGTTGTGTTTGTGCGGTCTCGCCTGGGTGACTCCCAGCTTG
TGAAGCTCAACGTTGACAGTAATGAACAAGGCTCCTATGTAGTGGCCATGGAAACCT
TTACCAACTTAGGACCCATTGTCGATATGTGCGTGGTGGACCTGGAGAGGCAGGGG
CAGGGGCAGCTGGTCACTTGCTCTGGGGCTTTCAAGGAAGGTTCTTTGCGGATCAT
CCGGAATGGAATTGGAGGAAATGGCAACTCGGGCGAGATCCAGAAGCTGCACATTC
GCACAGTTCCCCTCTATGAGTCTCCAAGGAAGATCTGCTACCAGGAAGTGTCCCAGT
GTTTCGGGGTCTCTCCAGCCGCATTGAAGTCCAAGACACGAGTGGGGGCACGACA
GCCTTGAGGCCCAGCGCTAGCACCCAGGCTCTGTCCAGCAGTGTAAGCTCCAGCAA
GCTGTTCTCCAGCAGCACTGCTCCTCATGAGACCTCCTTTGGAGAAGAGGTGGAGG
TGCACAACCTACTTATCATTGACCAACACACCTTTGAAGTGCTTCATGCCACCAGTT
TCTGCAGAATGAATATGCCCTCAGTCTGGTTTCCTGCAAGCTGGGCAAAGACCCCAA
CACTTACTTCATTGTGGGCACAGCAATGGTGTATCCTGAAGAGGCAGAGCCCAAGCA
GGGTGCGATTGTGGTCTTTCAGTATTCGGATGGAAAACACAGACTGTGGCTGAAAA
GGAAGTGAAAGGGGCGGTGTACTCTATGGTGGAATTTAACGGGAAGCTGTTAGCCA
GCATCAATAGCACGGTGCGGCTCTATGAGTGGACAACAGAGAAGGAGCTGCGCACT
GAGTGCAACCACTACAACAACATCATGGCCCTCTACCTGAAGACCAAGGGCGACTTC
ATCCTGGTGGGCGACCTTATGCGCTCAGTGCTGCTGCTTGCCTACAAGCCCATGGA
AGGAAACTTTGAAGAGATTGCTCGAGACTTTAATCCCAACTGGATGAGTGCTGTGGA
AATCTTGATGATGACAATTTTCTGGGGGCTGAAAATGCCTTTAACTTGTTTGTGTGT
CAAAAGGATAGCGCTGCCACCACTGACGAGGAGCGGCAGCACCTCCAGGAGGTTG
GTCTTTTCCACCTGGGCGAGTTTGTCAATGTCTTTTGCCACGGCTCTCTGGTAATGCA
GAATCTGGGTGAGACTTCCACCCCCACACAAGGCTCGGTGCTCTTCGGCACGGTCA
ACGGCATGATAGGGCTGGTGACCTCACTGTCAGAGAGCTGGTACAACCTCCTGCTG
GACATGCAGAATCGACTCAATAAAGTCATCAAAAGTGTTGGGGAAGATCGAGCACTCC
TTCTGGAGATCCTTTCACACCGAGCGGAAGACAGAACCAGCCACAGGTTTCATCGAC
GGTGACTTGATTGAGAGTTTCTGGATATTAGCCGCCCCAAGATGCAGGAGGTGGT
GGCAAACCTACAGTATGACGATGGCAGCGGTATGAAGCGAGAGGCCACTGCAGACG
ACCTCATCAAGGTTGTGGAGGAGCTAACTCGGATCCATTAG

SEQ ID NO. 8

Sekwencja aminokwasowa 8xHis-CaptorBait-DDB1 (ORF). Sekwencję CaptorBait zaznaczono pogrubioną czcionką.

MGHHHHHHHHGGGGLEVLFGPGGG**ADSRIIRIGYVRNNGGGG**MSYNYVVTAQKP
TAVNGCVTGHFTSAEDLNLLIAKNTRLEIYVVTAEGLRPVKEVGMYGKIAVMELFRPKGE
SKDLLFILTAKYNAILEYKQSGESIDIITRAHGNVQDRIGRPSETGIIGIIDPECRMIGLRLY
DGLFKVIPLDRDNKELKAFNIRLEELHVIDVKFLYGCAPTICFVYQDPQGRHVKTIEVSL
REKEFNKGPWKQENVEAEASMVIAVPEPFGGAIIGQESITYHNGDKYLAIAPPIIKQSTIVC
HNRVDPNGSRYLLGDMEGRLFMLLLEKEEQMDGTVTLKDLRVELLGETSIAECLTYLDN

GVVFVGSRLGDSQLVKLNVDSENEQGSYVVAMETFTNLGPIVDMCVVDLERQGGQQLVT
CSGAFKEGSLRIIRNGIGGNGNSGEIQKLHIRTVPYIESPRKICYQEVSQCFGLSSRIEV
QDTSGGTTALRPSASTQALSSSVSSSKLFSSSTAPHETSFGEVEVHNLLIIDQHTFEVLH
AHQFLQNEYALSLVSKLGKDPNTYFIVGTAMVYPEEAEPKQGRIVVFQYSDGKLQTVAE
KEVKGAVYSMVEFNGKLLASINSTVRLYEWTTEKELRTECNHYNIMALYLKTKGDFILV
GDLMRSVLLLAYKPMEGNFEEIARDFNPNWMSAVEILDDDNFLGAENAFNLFVCQKDSA
ATTDEERQHLQEVGLFHLGEFVNVFCHGSLVMQNLGETSTPTQGSVLFGTVNGMIGLVT
SLSSESWYNLLLDMQNRLNKVIKSVGKIEHSFWRSFHTERKTEPATGFIDGDLIESFLDISR
PKMQEVVANLQYDDGSGMKREATADDLIKVVEELTRIH

SEQ ID NO. 9

Sekwencja nukleotydowa 6xHis-BRD4(44-168)-AviTag (ORF).

ATGCACCATCATCATCATCATTCTTCTGGTGTAGATCTGGGTACCGAGAACCTGTACT
TCCAATCCATGAACCCCCCGCCCCAGAGACCTCCAACCCTAACAAAGCCCAAGAGG
CAGACCAACCAACTGCAATACCTGCTCAGAGTGGTGCTCAAGACACTATGGAAACAC
CAGTTTGCATGGCCTTTCCAGCAGCCTGTGGATGCCGTCAAGCTGAACCTCCCTGAT
TACTATAAGATCATTAACACGCCTATGGATATGGGAACAATAAAGAAGCGCTTGAAAA
ACAACTATTACTGGAATGCTCAGGAATGTATCCAGGACTTCAACACTATGTTTACAAA
TTGTTACATCTACAACAAGCCTGGAGATGACATAGTCTTAATGGCAGAAGCTCTGGAA
AAGCTCTTCTTGCAAAAAATAAATGAGCTACCCACAGAAGAATCCGGTTTGAACGACA
TCTTCGAAGCTCAGAAGATCGAATGGCACGAATGA

SEQ ID NO. 10

Sekwencja aminokwasowa 6xHis-BRD4 (44-168)-AviTag (ORF).

MHHHHHHSSGVDLGTENLYFQSMNPPPPETSNPNKPKRQTNQLQYLLRVVLKTLWKHQ
FAWPFPQPVDAVKLNLPDYKIIKTPMDMGTIKKRLENNYYWNAQECIQDFNTMFTNCYI
YNKPGDDIVLMAEAELEKFLQKINELPTEESGLNDIFEAQKIEWHE

SEQ ID NO. 11

Sekwencja aminokwasowa CaptorPrey (ORF).

AKPCTVSTTNATVDLGDLYSFLMSAGAASAWHDVALELTNCPVGTSRVTSFSGAADS
TGYKYNQGT AQNIQLELQDDSGNTLNTGATKTVQVDDSSQSAHFPLQVRALTVNGGAT
QGTIEAVIEITYTYS

SEQ ID NO. 12

Sekwencja aminokwasowa CaptorBait (ORF).

ADSRIRIRGYVRNNG

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób *in vitro* identyfikacji niskocząsteczkowych związków indukujących powstawanie kompleksu trójskładnikowego, **znamienny tym**, że kontaktuje się
pierwsze białko połączone ze związkiem białkowym zawierającym pierwszą sekwencję aminokwasową o SEQ ID NO. 12,
drugie białko z przyłączoną cząsteczką fluoroforu,
związek białkowy zawierający drugą sekwencję aminokwasową o SEQ ID NO. 11, z przyłączoną cząsteczką fluoroforu oraz
związek niskocząsteczkowy,
przy czym jedna z cząsteczek fluoroforu stanowi akceptor fluorescencyjny, a druga stanowi donor fluorescencyjny, przy czym widmo emisji donora fluorescencyjnego nakłada się na widmo absorpcji akceptora fluorescencyjnego,
a następnie dokonuje się pomiaru emisji promieniowania fluorescencyjnego dla długości fal odpowiadających widmom emisyjnym cząsteczek akceptora i donora fluorescencyjnego,
przy czym zmiana emisji promieniowania fluorescencyjnego przy długości fali odpowiadającej widmu emisyjnemu akceptora fluorescencyjnego względem długości fali odpowiadającej widmu emisyjnemu donora fluorescencyjnego oznacza utworzenie kompleksu trójskładnikowego zawierającego pierwsze białko, drugie białko i związek niskocząsteczkowy.
2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że związek białkowy zawierający drugą sekwencję aminokwasową zawiera lub składa się z sekwencji wybranej z grupy obejmującej sekwencje o SEQ ID NO. 2 i SEQ ID NO. 4.
3. Sposób według dowolnego z zastrz. 1 albo 2, **znamienny tym**, że pierwsze białko jest połączone ze związkiem białkowym zawierającym pierwszą sekwencję aminokwasową za pomocą fuzji.
4. Sposób według dowolnego z zastrz. 1–3, **znamienny tym**, że drugie białko jest połączone z cząsteczką fluoroforu wiązaniem kowalencyjnym lub niekowalencyjnym.
5. Sposób według dowolnego z zastrz. 1–4, **znamienny tym**, że związek białkowy zawierający drugą sekwencję aminokwasową jest połączony z cząsteczką fluoroforu wiązaniem kowalencyjnym lub niekowalencyjnym.
6. Sposób według dowolnego z zastrz. 1–5, **znamienny tym**, że pierwsze białko stanowi dowolne białko z grupy obejmującej białka wchodzące w skład kompleksów ligaz ubikwityny E3, białko CRBN, enzymy koniugujące E3, enzymy deubikwitynujące, enzymy odpowiadające za neddylację, kinazy, fosfatazy, oksydoreduktazy, transferazy, hydrolazy, liazy, izomerazy oraz ligazy, przy czym białka te stanowią białka pełnej długości lub fragmenty białek pełnej długości, występujące pojedynczo lub w fuzji z innymi peptydami czy białkami, a drugie białko, związek białkowy zawierający pierwszą sekwencję aminokwasową i związek białkowy zawierający drugą sekwencję aminokwasową stanowią białka pełnej długości lub fragmenty białek pełnej długości, pojedynczo lub w fuzji z innymi peptydami czy białkami.
7. Sposób według zastrz. 6, **znamienny tym**, że pierwsze białko stanowi białko CRBN.
8. Sposób według dowolnego z zastrzeżeń 1–7, **znamienny tym**, że stanowi przesiewowy sposób identyfikacji związków o aktywności biologicznej i/lub farmakologicznej.
9. Test płytkowy *in vitro*, **znamienny tym**, że zawiera
pierwsze białko połączone ze związkiem białkowym zawierającym pierwszą sekwencję aminokwasową o SEQ ID NO. 12,
drugie białko z przyłączoną cząsteczką fluoroforu,
związek białkowy zawierający drugą sekwencję aminokwasową o SEQ ID NO. 11, z przyłączoną cząsteczką fluoroforu, przy czym druga sekwencja aminokwasowa wykazuje silne powinowactwo do pierwszej sekwencji aminokwasowej,
przy czym jedna z cząsteczek fluoroforu stanowi akceptor fluorescencyjny, a druga stanowi donor fluorescencyjny, gdzie widmo emisji donora fluorescencyjnego nakłada się na widmo absorpcji akceptora fluorescencyjnego.
10. Test płytkowy według zastrz. 9, **znamienny tym**, że związek białkowy zawierający drugą sekwencję aminokwasową zawiera lub składa się z sekwencji wybranej z grupy obejmującej sekwencje o SEQ ID NO. 2 i SEQ ID NO. 4.

11. Test płytkowy według zastrz. 9–10, **znamienny tym**, że pierwsze białko jest połączone ze związkiem białkowym zawierającym pierwszą sekwencję aminokwasową za pomocą fuzji.
12. Test płytkowy według zastrz. 9–11, **znamienny tym**, że drugie białko jest połączone z cząsteczką fluoroforu wiązaniem kowalencyjnym lub niekowalencyjnym.
13. Test płytkowy według zastrz. 9–12, **znamienny tym**, że związek białkowy zawierający drugą sekwencję aminokwasową jest połączony z cząsteczką fluoroforu wiązaniem kowalencyjnym lub niekowalencyjnym.
14. Test płytkowy według zastrz. 9–13, **znamienny tym**, że pierwsze białko stanowi dowolne białko z grupy obejmującej białka wchodzące w skład kompleksów ligaz ubikwityny E3, białko CRBN, enzymy koniugujące E3, enzymy deubikwitynujące, enzymy odpowiadające za nedylację, kinazy, fosfatazy, oksydoreduktazy, transferazy, hydrolazy, liazy, izomerazy oraz ligazy, przy czym białka te stanowią białka pełnej długości lub fragmenty białek pełnej długości, występujące pojedynczo lub w fuzji z innymi peptydami czy białkami, a drugie białko, związek białkowy zawierający pierwszą sekwencję aminokwasową i związek białkowy zawierający drugą sekwencję aminokwasową stanowią białka pełnej długości lub fragmenty białek pełnej długości, pojedynczo lub w fuzji z innymi peptydami czy białkami.
15. Test płytkowy według zastrz. 9–14, **znamienny tym**, że stanowi test do przesiewowej identyfikacji związków o aktywności biologicznej i/lub farmakologicznej.

Rysunki

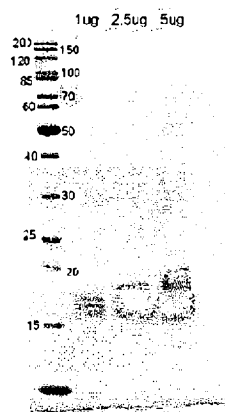


Figura 1

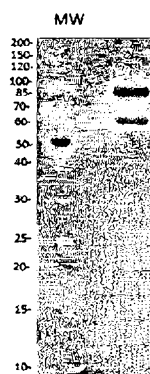


Figura 2

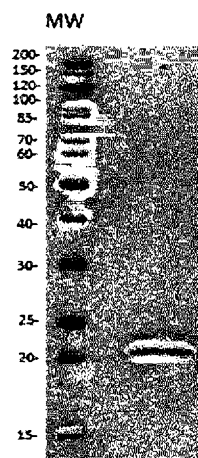


Figura 3

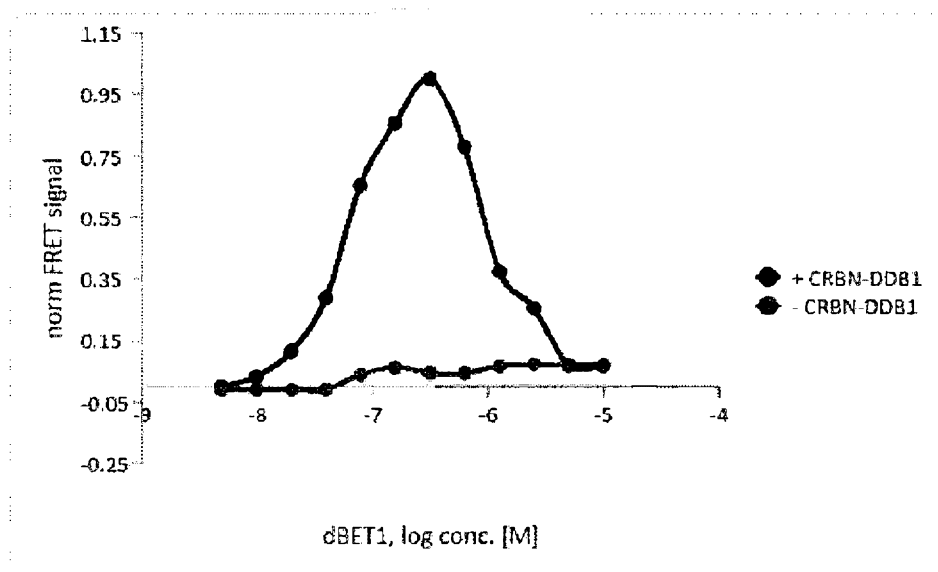


Figura 4

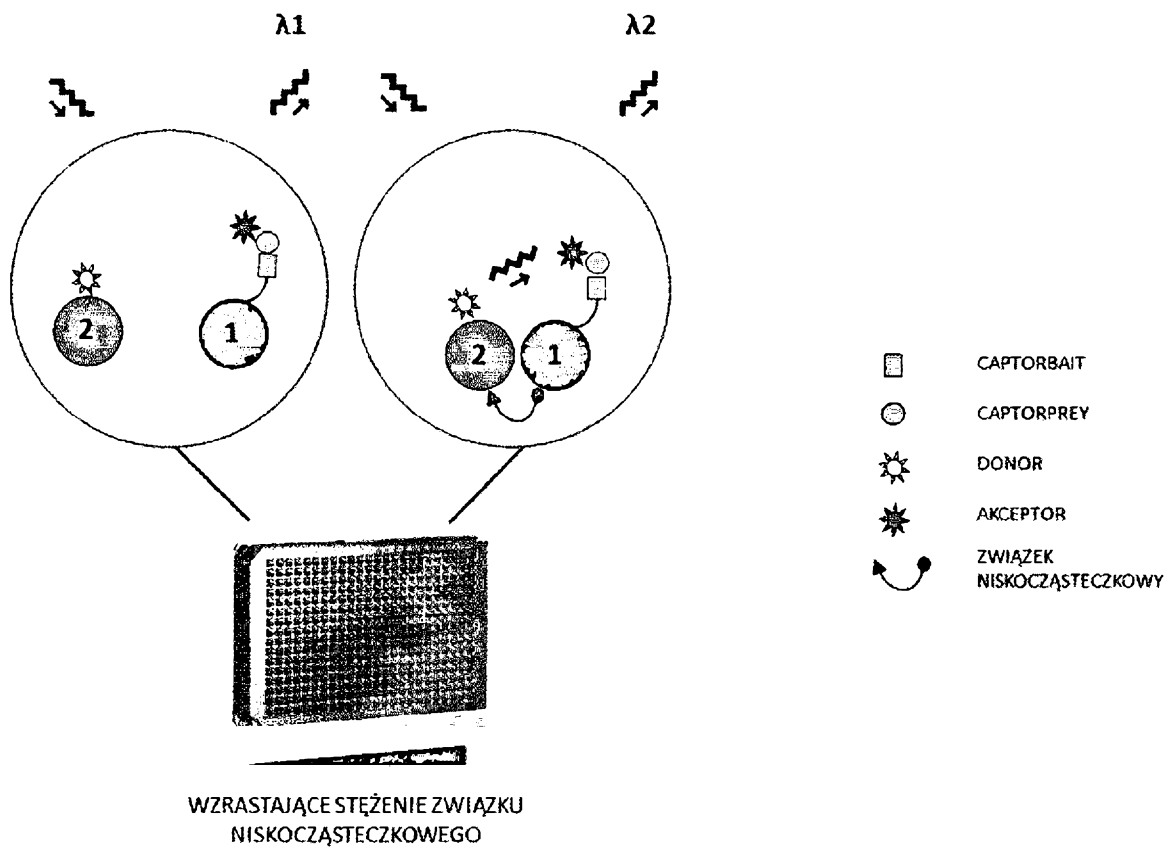


Figura 5