



**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2010112854/15, 28.08.2008

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
28.08.2008

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:

04.09.2007 US 60/969,756

30.07.2008 US 61/084,987

(43) Дата публикации заявки: 10.10.2011 Бюл. № 28

(45) Опубликовано: 27.02.2013 Бюл. № 6

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: US 20060115871 A1, 01.06.2006. US 2005100934 A1, 12.05.2005. IGOR STAGLJAR et al., A genetic system based on split-ubiquitin for the analysis of interactions between membrane proteins in vivo, Proc. Natl. Acad. Sci. USA April 1998, Vol.95, pp.5187-5192. MICHAEL C. WEHR et al., Monitoring regulated protein-protein interactions using split TEV, Nature Methods. Vol.3, no.12, 2006 pp.985-93.

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на национальной фазе: 05.04.2010

(86) Заявка РСТ:
US 2008/074543 (28.08.2008)(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2009/032716 (12.03.2009)

Адрес для переписки:

129090, Москва, ул. Б. Спасская, 25, стр.3,
ООО "Юридическая фирма Городиский и
Партнеры"

(72) Автор(ы):

**ЦАЙ Цзидун (US),
РАЙТ Пол С. (US),
УЭЙССЕНСИ Пол (US),
АЙСХИНГДРЕЛО Хайфенг (US)**

(73) Патентообладатель(и):

САНОФИ-АВЕНТИС (FR)**(54) ИДЕНТИФИКАЦИЯ МОЛЕКУЛ, МОДУЛИРУЮЩИХ БЕЛОК-БЕЛКОВОЕ
ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ**

(57) Реферат:

Группа изобретений относится к способам и системам анализа, основанных на ферментативном расщеплении в результате белок-белкового взаимодействия для модулирования (активации или инактивации)

репортера. Группа изобретений обеспечивает простую высокопроизводительную идентификацию моделирования белок-белковых взаимодействий. 2 н. и 32 з.п. ф-лы, 17 ил., 17 пр.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21)(22) Application: **2010112854/15, 28.08.2008**

(24) Effective date for property rights:
28.08.2008

Priority:

(30) Convention priority:
04.09.2007 US 60/969,756
30.07.2008 US 61/084,987

(43) Application published: **10.10.2011 Bull. 28**

(45) Date of publication: **27.02.2013 Bull. 6**

(85) Commencement of national phase: **05.04.2010**

(86) PCT application:
US 2008/074543 (28.08.2008)

(87) PCT publication:
WO 2009/032716 (12.03.2009)

Mail address:

129090, Moskva, ul. B. Spasskaja, 25, str.3, OOO
"Juridicheskaja firma Gorodisskij i Partnery"

(72) Inventor(s):

TsAJ Tszidun (US),
RAJT Pol S. (US),
UEhJSSENSI Pol (US),
AJSKHINGDRELO Khajfeng (US)

(73) Proprietor(s):

SANOFI-AVENTIS (FR)

(54) IDENTIFICATION OF MOLECULES MODULATING PROTEIN-PROTEIN INTERACTION

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: group of inventions refers to methods and systems of analysis based on enzymatic degradation following protein-protein interaction for

reporter modulation (activation or inactivation).

EFFECT: group of inventions provides simple high-efficiency identification of protein-protein interaction modelling.

34 cl, 17 dwg, 17 ex

RU 2 476 891 C2

RU 2 476 891 C2

ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к материалам и способам определения взаимодействия между рассматриваемыми молекулами. В частности, оно касается возможности установить, модулирует ли определенное соединение, например, «испытываемое соединение», взаимодействие двух или более рассматриваемых конкретных белков. Определение предполагает мониторинг активации репортерного гена, который может находиться в клетке, в растворе или в искусственном окружении или частице, содержащей один или более рассматриваемых реагентов, где активация или ее отсутствие вызывается модуляцией или отсутствием модуляции. Определение обычно проводят с использованием трансформированных или трансфицированных клеток, что также относится к одному из аспектов изобретения, как и агенты, применяемые для их трансформации или трансфекции. Можно также применять бесклеточную систему или систему, использующую искусственное окружение или частицы, содержащие один или несколько рассматриваемых реагентов, например, вирус, вирусоподобная частица, липосома и им подобные.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ И МАТЕРИАЛЫ, ИСПОЛЬЗОВАННЫЕ ПРИ ПОДГОТОВКЕ ЗАЯВКИ

Исследования белок-белковых взаимодействий, например, посредством идентификации лигандов для рецепторов, представляют большой интерес. Даже если лиганд или лиганды для определенного рецептора уже известны, сохраняется интерес к идентификации более эффективных или более селективных лигандов. Рецепторы, связанные с G-белком, GPCR, также называемые 7-трансмембранными рецепторами (7TMR), будут обсуждаться в настоящем документе как один из множества примеров класса белков, которые могут быть охарактеризованы указанным выше способом. Вместе с тем данный метод анализа может использоваться в отношении любых белков, которые вступают во взаимодействие, например, участников метаболического пути или каскада.

GPCR являются самым многочисленным классом рецепторов клеточной поверхности, известным для человека, а потому рассматриваются в качестве основного применения настоящего изобретения. К лигандам, которые модулируют сигналы GPCR, относятся гормоны, нейротрансмиттеры, пептиды, гликопротеины, липиды, нуклеотиды и ионы. GPCR также известны как сенсорные рецепторы, например, рецепторы света, запаха, феромонов и вкуса. В связи с разнообразными и многочисленными функциями GPCR являются объектами интенсивных исследований, например, для химической и биологической защиты и для лекарственных препаратов, применяемых для лечения различных патологических состояний. Удалось добиться успехов в создании многих лекарственных препаратов. Например, в работе Howard et al., *Trends Pharmacol. Sci.*, 22:132-140 (2001) отмечается, что более 50% продаваемых лекарственных препаратов проявляют активность в отношении этих рецепторов.

Используемое в настоящем документе сокращение «GPCR» относится к любому члену суперсемейства рецепторов GPCR. Это суперсемейство характеризуется структурой, содержащей семь трансмембранных доменов (7TM). К примерам таких рецепторов, среди прочих, относятся рецепторы класса А или «родопсиноподобные» рецепторы; рецепторы класса В или «секретиноподобные» рецепторы; класса С или «метаботропные глутаматоподобные» рецепторы; рецепторы, относящиеся к классу Frizzled и Smoothed; семейство адгезионных рецепторов или рецепторов EGF-7TM/LNB-7TM; адипонектиновые рецепторы и родственные им рецепторы; а также хемосенсорные рецепторы, в том числе рецепторы запаха, вкуса, сошниково-носовые и

феромонные рецепторы. Например, суперсемейство GPCR человека, среди прочих, включает рецепторные молекулы, описанные в работах Vassilatis et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100:4903-4908 (2003); Takeda et al., *FEBS Letters*, 520:97-101 (2002); Fredricksson et al., *Mol. Pharmacol.*, 63:1256-1272 (2003); Glusman et al., *Genome Res.*, 11:685-702 (2001);
5 и Zozulya et al., *Genome Biol.*, 2:0018.1-0018.12 (2001).

В сжатой форме общий механизм действия функции GPCR выглядит следующим образом: 1) GPCR связывает лиганд; 2) тем самым вызывает конформационные изменения; 3) стимулирует каскад клеточных событий, которые приводят к изменению
10 физиологии клетки. GPCR передают сигналы посредством модулирования активности множества внутриклеточных белков, например, белков, связывающих гетеротримерный гуанин-нуклеотид (G-белков) и β -аррестинов. В случае G-белков лиганд-рецепторный комплекс стимулирует обмен гуанин-нуклеотида и диссоциацию гетеротримера G-белка на α - и $\beta\gamma$ -субъединицы. В других обстоятельствах β -аррестин
15 может выступать вместо G-белка, противодействовать передаче сигнала G-белком, синергически усиливать передачу сигнала G-белком и пр.

Для GTP-связанной α -субъединицы и $\beta\gamma$ -гетеродимера регистрировались регулирования различных клеточных эффекторных белков, в том числе
20 аденилатциклазы и фосфолипазы C (PLC). В стандартных клеточных методах анализа для GPCR рецепторная активность отслеживается посредством измерения выхода регулируемого G-белком эффекторного пути, например, по накоплению цАМФ, продуцируемого аденилатциклазой, или высвобождение внутриклеточного кальция, например, стимулированное активностью PLC.

По многим причинам было сложно разработать стандартные методы анализа для
25 основанной на G-белке передаче сигнала для некоторых из мишеней. Например, во-первых, различные GPCR связаны с различными путями передачи сигнала, регулируемые G-белками. Стандартные методы анализа, основанные на G-белках, зависят от знания специфичности G-белка к целевому рецептору, или же такие методы
30 анализа требуют генно-инженерной клеточной системы, обеспечивающей участие целевого рецептора на эффекторном пути выбранного G-белка. Во-вторых, поскольку суперсемейство GPCR столь велико, все клетки экспрессируют множество эндогенных GPCR (а также другие рецепторы и сигнальные факторы). Поэтому
35 регистрируемые эффекторные пути могут модулироваться эндогенными молекулами, не только целевыми GPCR. Следствием данного явления могут быть ложноположительные или ложноотрицательные результаты, например, при попытке идентифицировать селективные модуляторы целевого GPCR.

Регулирование активности G-белка не является единственным результатом
40 связывания лиганд/GPCR. См., например, Luttrell et al., *J. Cell Sci.*, 115:455-465 (2002) и Ferguson, *Pharmacol. Rev.*, 53:1-24 (2001), где приводится обзор воздействий, которые в состоянии стать причиной подавления или прекращения передачи сигнала GPCR. Такие процессы подавления сигнала применяются для предотвращения чрезмерной
45 стимуляции клеток, а также для обеспечения временной взаимосвязи между внеклеточным сигналом и соответствующим внутриклеточным путем.

В общем случае, связывание агониста с GPCR обеспечивает фосфорилирование остатков серина и треонина в C-терминальной части молекулы рецептора GPCR-киназой. Связанные в комплекс с агонистом фосфорилированные по C-терминальной
50 части GPCR затем взаимодействуют с членами семейства аррестинов, например, α -аррестином, β -аррестином или β -аррестином-2, которые подавляют или прекращают передачу сигнала рецептором. Связывание может ингибировать взаимодействие

рецептора с G-белками, тем самым направляя рецептор на интернализацию с последующим распадом и (или) регенерацией. Например, связывание аррестина, такого как β -аррестина-2, с фосфорилированным GPCR может различным образом снижать активность целевого GPCR. Простейший механизм ингибирования аррестином его мишени предполагает связывание с внутриклеточным доменом GPCR и, тем самым, блокирование сайта связывания для гетеротримерного G-белка, что препятствует активации пути за счет внеклеточных сигналов (десенсibilизация). Другой регуляторный механизм, используемый аррестинами, заключается в связывании рецептора с элементами аппарата мембранной интернализации (например, эндоцитозом, опосредованным клатрином), что инициирует интернализацию рецептора в везикуле с оболочкой для слияния с эндосомой. После попадания в эндосому рецептор может подвергаться распаду (например, лизосомами) или может регенерироваться в цитоплазматическую мембрану, где он снова может быть активирован.

Поэтому можно сказать, что связывание лиганда с GPCR «модулирует» взаимодействие между GPCR и аррестинowymi белками, поскольку связывание лиганда с GPCR приводит к связыванию аррестина с GPCR, тем самым модулируя его активность. В настоящем документе термин «модулирует» (или любая его производная форма) в отношении взаимодействия или связывания просто означает некоторое изменение в характере взаимодействия двух белков настоящего изобретения, например, в присутствии испытываемого соединения или лиганда, по сравнению с характером взаимодействия этих двух белков в его отсутствие. Таким образом, модуляция включает простое связывание двух молекул. Например, присутствие испытываемого соединения может усиливать или повышать степень взаимодействия двух белков, ослаблять взаимодействие, блокировать, ингибировать, переадресовывать, снижать или модифицировать его определенным образом, определенным способом или в определенной форме, которые поддаются детектированию, или же испытываемое соединение может способствовать повышению вероятности взаимодействия и пр.

В некоторых случаях передача сигнала 7TMR может происходить без участия G-белков. Так, при связывании лиганда с 7TMR β -аррестин, а не G-белок используется для вызывания или инициирования каскада передачи сигнала в клетке. См., например, Violin & Lefkowitz, *Trends Pharm Sciences* 28(8)416-422, 2007 и DeFea, *Br J Pharm* 1-12, doi: 10.1038/sj.bjp.0707508, 2007, где приведена сводная информация о двух независимых и взаимозависимых путях передачи сигнала, которые начинаются с активированного 7TMR и в которых могут быть задействованы как G-белок, так и β -аррестин; или либо G-белок, либо β -аррестин.

Так, например, известные антагонисты 7TMR активируют передачу сигнала β -аррестином. Пропранолол, известный антагонист β_2 -адренергического рецептора (ADRB2) и передачи сигнала G-белком, оказался частичным агонистом передачи сигнала β -аррестина, активирующим пути передачи сигнала, инициируемые β -аррестином, как это было установлено в ходе практических применений настоящего изобретения.

События передачи сигналов в клетке, реагирующие на внешние стимулы, обычно опосредованы белок-белковыми взаимодействиями. Поэтому белок-белковые взаимодействия представляют значительный интерес для клеточных физиологов. Одним из инструментов мониторинга таких взаимодействий является дополнительный рибосомный белок или пермутированный белок, активирующий репортер, например,

протеаза вируса гравировки табака (TEV). Расщепленные части протеазы восстанавливают активность при совместной экспрессии в качестве слитой конструкции со взаимодействующими белками. Wehr et al., «Monitoring Regulated Protein-protein Interactions Using Split TEV», *Nature Methods*, 3:985-993 (2006). Это свойство использовалось в сочетании с репортерными системами, связанными с транскрипцией.

Понимание перечисленных механизмов позволило предложить альтернативные способы анализа активации и ингибирования GPCR. Один из таких способов предполагает мониторинг взаимодействия с аррестинами в интактной клетке, несущей в себе аппарат транскрипции. Преимущество такого подхода состоит в том, что отпадает необходимость в знаниях путей взаимодействия G-белка. См., например, патент США № 7049076: «Method for Assaying Protein-Protein Interaction», выданный Lee et al. Lee et al. сообщают о репортерной системе, которая нуждается в репортерных системах, связанных с транскрипцией. Согласно Lee et al. при взаимодействии двух белков от первого белка отщепляется пептидный фактор транскрипции. Второй белок является фактором транскрипции, который активирует репортерный ген. Затем фактор выполняет репортерную функцию за счет транспортировки к ядру, чтобы осуществить транскрипцию детектируемого репортера. Поскольку способ зависит от транскрипции, его невозможно применять, например, в тромбоцитах, искусственном окружении или частицах, например, липосомах, спиралевидных агрегатах, вирусоподобных частицах и частицах вирусов.

В работе Oakley et al., *Assay Drug Dev. Technol.*, 1:21 30 (2002) и патентах США №№ 5891646 и 6110693, «Methods Of Assaying Receptor Activity and Constructs Useful in Such Methods», выданных Barak et al., описываются методы анализа, с помощью которых измеряется перераспределение флуоресцентно-меченных молекул аррестина в цитоплазме на активированные рецепторы на поверхности клетки. Указанные методы опираются на визуализацию клеток с высоким разрешением для измерения релокализации аррестина и активации рецепторов. Квалифицированным специалистам в области будет очевидно, что это сложная и трудоемкая процедура, которой могут помешать аффинность и воздействие комплементарных фрагментов фермента, используемого в настоящем изобретении, который может конкурировать с искомым взаимодействием, индуцированным модулятором. Поэтому недостатком данного метода является получение ложноположительных результатов, возникающих вследствие собственной реассоциации фермента, независимо от связывания лиганда. Было бы желательно разработать более простой, более стабильный метод анализа с меньшей частотой ложноположительных результатов, который можно было бы без труда адаптировать для высокопроизводительного скрининга.

Выдавалось и направлялось множество других патентов США и патентных заявок, касающихся перечисленных проблем. Например, патент США № 6528271, «Inhibition Of β -Arrestin Mediated Effects Prolongs and Potentiates Opioid Receptor-Mediated Analgesia», выданный Bohn et al., описывает методы анализа для скрининга болеутоляющих средств, в которых измеряется ингибирование связывания β -аррестина. В опубликованных патентных заявках США, например, 2004/0002119, 2003/0157553 и 2003/0143626; а также в патенте США № 6884870 предложены различные формы анализа с использованием GPCR. В патенте США № 7128915 описана аналогичная технология GPCR. В указанном выше патенте США № 7049076, который в общем касается функций GPCR или методов скрининга, продемонстрирована значимость исследований GPCR.

Таким образом, для решения насущных задач в области достаточно одной из

особенностей настоящего изобретения, а именно, обеспечения более простого метода анализа для отслеживания и (или) определения модулирования специфических белок-белковых взаимодействий, например, опосредованных рецепторами физиологических процессов, таких как опосредованный GPCR клеточный отклик, где к белкам, среди прочих, относятся интегрированные в мембрану белки, в том числе рецепторы в целом, а также GPCR в качестве важного примера.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В настоящем изобретении предлагаются способы, позволяющие определить, модулирует ли испытываемое соединение рассматриваемое специфическое белок-белковое взаимодействие. Белок-белковое взаимодействие является фундаментальным механизмом биологии, посредством которых клетка может взаимодействовать со своим окружением, внеклеточным событием, например, связыванием лиганда с рецептором, и может продуцировать внутренний ответ в условиях интернализации лиганда или без таковой. В интернализации может быть задействовано два или более белка, части которых находятся на мембране или за ее пределами. Поэтому образование димера, гетеродимера или мультимера может продуцировать внутренний ответ. Внутриклеточные белок-белковые взаимодействия могут быть также задействованы в сигнальных каскадах. Общая схема настоящего изобретения применима к белок-белковым взаимодействиям любого рода. Например, взаимодействие может осуществляться между двумя интегрированными в мембрану белками, между интегрированным в мембрану белком и цитоплазматическим белком, между цитоплазматическими белками и пр. В одном из примеров осуществления рассматривается цитоплазматический белок, который подвергается транслокации в другую органеллу, например, ядро, где происходит активация репортера для возникновения сигнала. Предпочтительно использование анализа на клеточной основе, но может применяться и бесклеточная система, например, с привлечением лизатов, мембранных фракций, ядерных фракций и пр. Сюда же относятся и системы с искусственным окружением или частицами, содержащие один или несколько рассматриваемых реагентов, например, липосомы, вирусоподобные частицы и пр. Настоящее изобретение является усовершенствованием обсуждавшегося выше патента Lee et al., поскольку в данном случае отпадает потребность в транскрипции. Поэтому результаты могут быть получены быстрее, и их можно получать в клеточной и бесклеточной системах. Ниже приводится общее описание некоторых особенно предпочтительных примеров осуществления изобретения. Приведенные примеры осуществления носят иллюстративный характер и ни в коей мере не ограничивают широту охвата изобретения, описанного в настоящем документе и в формуле изобретения.

Одна из особенностей, рассматриваемых в настоящем изобретении, включает контакт по крайней мере одного испытываемого соединения с поверхностью клетки, которая экспрессирует рассматриваемый белок. Испытываемое соединение может оцениваться по его способности модулировать активность рассматриваемого белка, например, рецепторного белка. Экспрессия рассматриваемого белка может быть результатом трансформации или трансфекции выбранной клетки, например, клеточной линии насекомых или млекопитающих, проводимой посредством: (1) молекулы нуклеиновой кислоты или молекул, состоящей (состоящих) из (a) полинуклеотида, который кодирует первый рассматриваемый белок, и (b) полинуклеотида, который кодирует активирующий репортер белок, содержащий сайт расщепления, чувствительный к протеазе, или активную или активируемую часть

протеазы, и (2) молекулы нуклеиновой кислоты или молекул, состоящей (состоящих) из (а) полинуклеотида, который кодирует второй белок, взаимодействие которого с первым рассматриваемым белком изменяется в присутствии модулятора, например, положительно действующего испытываемого соединения, и (b) полинуклеотида, который кодирует протеазу или активную или активируемую часть протеазы, специфичную к сайту расщепления, кодируемому нуклеиновой кислотой (1).

Молекулы, например, положительно действующего испытываемого соединения, которые модулируют рассматриваемые белок-белковые взаимодействия (между двумя рассматриваемыми белками), могут оцениваться или анализироваться при добавлении, например, при необходимости, субстратов активирующего репортер белка в клетках, экспрессирующих первый и второй рассматриваемые белки, и репортерной системы в соответствии с описанием настоящего изобретения.

Поэтому способом, предлагаемым в настоящем изобретении, может быть использование пермутируемого фермента для регистрации рассматриваемого белок-белкового взаимодействия. Пермутируемый активирующий белок, например фермент, используемый в качестве репортера или активирующего репортер белка, может находиться в инактивированном состоянии, которое можно активировать, например, расщеплением, посредством, к примеру, ферментативной активности, связанной со вторым рассматриваемым белком. В другом варианте используется инактивированный активирующий репортер белок, который активируется при взаимодействии первого и второго рассматриваемых белков. Таким образом, можно проводить скрининг соединений, которые модулируют взаимодействие первого и второго рассматриваемых белков. Одним из достоинств такой системы является то, что она обеспечивает высокопроизводительную идентификацию молекул, которые избирательно модулируют определенные белок-белковые взаимодействия.

Фермент, который в состоянии (в одиночку или с одной или несколькими связанными молекулами) продуцировать регистрируемый «белок А», присутствует в форме, активность которой можно изменять. За счет такого изменения можно активировать или инактивировать фермент. Например, в фермент можно встраивать сайт расщепления, с тем чтобы инактивировать его при расщеплении, к примеру, посредством второго фермента, связанного со вторым рассматриваемым белком.

В альтернативном варианте расщепление может приводить к активации. Выбранный фермент (или ферменты) можно встраивать в желаемую клетку-хозяина за счет использования одной или нескольких нуклеиновых кислот. Например, вектор может включать полинуклеотид, который кодирует выбранную молекулу в качестве инактивированного фермента, который может быть активирован посредством расщепления неактивного фермента по сайту расщепления. Сайт расщепления может иметь естественное происхождение, но предпочтительно, его вставляют в полинуклеотид, чтобы его, экспрессия приводила к пермутированному ферменту. Например, в клетку-хозяин могут трансфектировать сайт расщепления, который не является нативным для белка данной клетки, и (или) белок, который не является нативным для клетки-хозяина. Альтернативные примеры осуществления включают фермент, активируемый за счет расщепления либо посредством удаления блокирующего пептида, либо посредством стимуляции изменения конфигурации двух полипептидов для их перегруппировки с последующей активацией ферментативной активности.

Таким образом, один из примеров осуществления относится к активному полипептиду, например ферменту. «Фермент» можно инактивировать посредством

расщепления. В целях специфичности, возможно, понадобится сформировать в ферменте сайт расщепления, распознаваемый протеазой, который не является нативным для клетки-хозяина. Сайт расщепления можно вводить в форме линкера, который связывает, то есть сохраняет в контакте, две части или два мотива «фермента», такой линкер может быть сайтом расщепления, нативным для «фермента», например, фермент с сайтом расщепления может происходить из другого типа клеток или другого вида организмов и отсутствовать в клетке-хозяине, или же сайт расщепления может получаться за счет консервативного замещения одной или нескольких аминокислот. Консервативные замещения хорошо известны специалистам в области. Например, заряд, размер, ароматичность или другие характеристики могут оставаться неизменными для сохранения активности. Активность необязательно должна совпадать с таковой для перемутированного «фермента», но должна изменяться при расщеплении по сайту расщепления. Сайт расщепления может быть вставлен между двумя частями фермента. Расщепление по сайту может разрушать фермент, вызывая, тем самым, инактивацию, или может допускать сохранение каталитической активности, например, за счет удаления пептидной части, которая блокирует связывание или каталитический сайт, или позволяя двум частям перемутированного фермента взаимодействовать таким образом, который обеспечивает восстановление активности.

Поэтому расщепление по сайту расщепления может инактивировать или активировать регистрируемый белок. Расщепление может проходить в присутствии испытываемого соединения, например, если продукт экспрессии молекулы нуклеиновой кислоты, которая включает полинуклеотид, кодирующий второй рассматриваемый белок, взаимодействует с первым рассматриваемым белком, тем самым инициируя активность протеазы, которая распознает и расщепляет последовательность, чувствительную к расщеплению протеазой в перемутированном белке, активирующем репортер.

Второй рассматриваемый белок взаимодействует с первым рассматриваемым белком в присутствии третьей молекулы или же, в альтернативном варианте, в ее отсутствие. Таким образом, считается, что такая третья молекула модулирует белок-белковое взаимодействие между полипептидами А и В. Поэтому белок-белковое взаимодействие или пептид-пептид (для целей настоящего обсуждения термины «белок» и «пептид» являются равнозначными), которое модулируется третьей молекулой, например, испытываемым соединением, эффективно выявляется системой настоящего изобретения. Молекулы, которые модулируют белок-белковое взаимодействие (между полипептидами, обозначаемыми 1 и 2, первый и второй, А и В, каковые выражения и определения в настоящем документе являются равнозначными), можно регистрировать по активной молекуле, активирующей репортер, или же при добавлении субстрата активного белка, активирующего репортер, к клеткам, экспрессирующим систему, включающую рассматриваемые белки.

Выбор белков А и В определяется в зависимости от поставленной цели, поскольку могут использоваться пары молекул, для которых известна или предполагается возможность ассоциации, взаимодействия и пр. Как обсуждалось в настоящем документе, подходящей парой является 7TMR с либо G-белком, либо β -аррестином. Другим примером является рецептор Frizzled и связывающий белок Dishevelled и пр. Еще одним примером будет белок, действующий во время и после взаимодействия клетка-клетка. Значит белки А и В находятся в клетке 1. Если клетка 1 вступает в контакт с клеткой 2, такое взаимодействие вызывает реакцию клетки 1 и в клетке 1, на

что указывает ассоциация, взаимодействие и пр. белков А и В, что далее показывают реагенты настоящего изобретения, которые продуцируют четкий и детектируемый сигнал.

5 Еще одним примером является случай, когда белок А экспрессируется на клетке 1, а белок В экспрессируется на клетке 2. Это может достигаться, например, методами
10 геной инженерии, так чтобы G-белок или β -аррестин имели внеклеточный домен, или так чтобы активирующий репортер белок имел внеклеточный домен, которые могла бы активировать, к примеру, клетка 1 после активации клетки 1 лигандом или
15 потенциальным лекарственным препаратом. В альтернативном варианте возможна спонтанная ассоциация эндогенных молекул двух клеток. В другом примере осуществления протеаза и активирующая репортер молекула подбираются таким образом, чтобы экспрессироваться на поверхности клетки или частицы в виде
20 внеклеточных доменов.

15 В еще одном примере осуществления к белкам, которые ассоциируются, агрегируются и пр. с образованием композитной структуры, относятся белки А и В. Рассматриваемый метод анализа может использоваться для идентификации молекул, которые способствуют ассоциации или агрегированию или препятствуют им.
20 Примером может быть образование капсида вируса, частицы вирусоподобного агрегата или образование рибосомы.

В рамках общих механизмов для рецепторов, связанных с G-белками (GPCR также известны как 7TMR, каковые термины равнозначно используются в настоящем документе), активация GPCR агонистом приводит к вовлечению в процесс
25 внутриклеточной молекулы, которая задействована в пути передачи сигнала, например, в иницировании, прекращении, синергическом усилении, противодействии и пр., например, в случае G-белка или β -аррестина. Поэтому киназа рецептора, связанного с G-белком, может действовать на активированный рецептор, приводя к
30 его фосфорилированию. Фосфорилированный рецептор способствует связыванию β -аррестинов с рецептором. Этот механизм сохраняется для некоторых GPCR. В других случаях активированный рецептор вместо этого реагирует с β -аррестином.

Для оценки реакционной способности молекул, модулирующих белок-белковое взаимодействие, например, активацию GPCR, была разработана система анализа
35 белок-белковых взаимодействий, которая была протестирована на системе GPCR-пермутированной репортерной молекулы. Например, системой молекулы репортера может быть система для анализа люцифераза/люциферин. Как правило, в качестве молекулы репортера выступает экзогенная молекула, чужеродная для клетки-хозяина
40 или механизма передачи сигнала. За счет этого удается свести к минимуму спонтанную активацию молекулы репортера клеткой-хозяином и в клетке-хозяине и, тем самым, генерацию сигнала, а значит, и ложноположительные результаты. Активирующая репортер молекула может иметь доменную структуру или может
45 пермутироваться так, чтобы продуцировать инактивированный белок, активирующий репортер, который может проявлять репортерную активность при определенных манипуляциях. Поэтому в настоящем применении подразумевается использование латентной молекулы, активирующей репортер. Пермутированная молекула, активирующая репортер, сводит к минимуму спонтанную активность молекулы,
50 активирующей репортер, а значит, и ложноположительные результаты. Например, при анализе комплементации фрагментов фермента аффинность фрагментов фермента может доминировать над кинетикой реакции с молекулой-мишенью, лигандом или молекулой, которая проходит скрининг, так что происходит спонтанная

реассоциация фрагментов фермента в функциональную молекулу, что способствует более высокому фону и (или) ложноположительным результатам. Рассматриваемый пермутированный белок, активирующий репортер, может быть сконструирован таким образом, чтобы содержать сайт, который под воздействием позволяет

5 пермутированной молекуле, активирующей репортер, образовать функциональную молекулу. Таким сайтом может быть сайт протеазы. Сайтом протеазы предпочтительно является уникальный сайт, который редко присутствует или отсутствует в клетке-хозяине или частице, в которой находится компонент или

10 компоненты рассматриваемого метода. За счет этого обеспечиваются дополнительные средства, позволяющие избежать спонтанной реассоциации интактной молекулы, активирующей репортер, а значит, сводятся к минимуму ложноположительные результаты. Специфический сигнал наблюдается, только если задействованные лиганды, в конечном счете, индуцируют протеазу в

15 непосредственной близости от инактивированного белка, активирующего репортер, для его расщепления, и только в этом случае может образовываться объект, активирующий или генерирующий активный сигнал. Специалистам в области известен ряд протеаз, которые могут использоваться для практических приложений настоящего

20 изобретения. Например, могут использоваться протеазы из вирусных источников, поскольку они, как правило, являются чужеродными для интактной клетки-хозяина. В одном из приложений используется ген пермутированного белка, активирующего репортер, в котором кодирующая последовательность люциферазы светлячка сцеплена с С-терминальным концом последовательности GPCR, а β -аррестин-2 (Ar2 или Arr2) связан с геном протеазы вируса гравировки табака (TEV). В другом примере осуществления пермутированная люцифераза сцеплена с β -аррестином (Ar или Arr), а ген TEV связан с белком на пути передачи сигнала, реагирующим с β -аррестином, или с рецептором, например, 7TMR, предположительно действующим независимо от G-

30 белков. Если плаزمид, сконструированный так, чтобы экспрессировать оба указанных выше белка, подвергается экспрессии в клетках, соединения, модулирующие взаимодействие GPCR-аррестин-2, привлекают слитый белок Arr2-протеазы в сайт распознавания протеазы в пермутированной люциферазе, и протеаза TEV расщепляет пермутированную люциферазу. Эффект воздействия

35 испытываемых соединений можно измерять по изменению энзиматической активности, которая обеспечивается за счет реконструкции белка, активирующего репортер, в этом случае люцифераза становится активной и может генерировать детектируемый сигнал за счет воздействия на подходящий субстрат, например люциферин.

Охват изобретения не ограничивается люциферазой или даже ферментами. Активирование посредством расщепления относится к известным явлениям, таким как проэнзимы. Возможно применение также неэнзиматических репортерных систем. Например, может использоваться зеленый флуоресцентный белок (GFP).

45 Пермутированный GFP, например GFP с перестановкой частей, может играть роль белка, активирующего репортер, и репортера. Действие протеазы, например, TEV или другой протеазы с ее сайтом распознавания, включенным в пермутированный пептид, приводит к расщеплению пермутированного белка, активирующего

50 репортер/репортера, тем самым делая возможным реорганизацию, которая продуцирует сигнал. GFP сам по себе обладает преимуществами детектируемой молекулы, передающей сигнал репортеру. В альтернативном варианте в репортерные молекулы можно ввести сайты расщепления, которые не оказывают заметного

возмущающего воздействия на сигнал. Расщепление, возникающее вследствие белок-белкового взаимодействия, затем приводит к снижению сигнала репортера. В конструкции репортера может вводиться несколько сайтов расщепления.

Третичная структура белка может быть подспорьем для квалифицированного

специалиста в области при определении места введения сайтов расщепления. Например, если две части полипептида находятся в тесном контакте, то можно ожидать, что разделение этих частей за счет нарушения последовательности снизит или устранил активность. Можно предположить, что после расщепления эти части

будут взаимодействовать, что приведет к восстановлению активности. Первым рассматриваемым белком может быть интегрированный в мембрану белок, например, трансмембранный рецептор, такой как GPCR. К примерам трансмембранных рецепторов относятся β -адренергический рецептор (ADRB2), рецептор аргинин-вазопрессина-2 (AVPR2 или V2), рецептор серотонина-1a (HTR1 A), мускариновый рецептор ацетилхолина m2 (CHRM2), рецептор хемокина-5 (C-C мотив) (CCR5), рецептор дофамина-D2 (DRD2), каппа-опиоидный рецептор (OPRK) или α 1a-адренергический рецептор (ADRA1A) и пр. Интегрированные в мембрану рецепторы хорошо известны специалистам в области. Следует понимать, что во всех случаях охват изобретения не ограничивается рамками конкретных примеров осуществления, описанных в форме примеров настоящего изобретения. Например, такие молекулы, как рецептор инсулиноподобного фактора роста-1 (IGF-1R), который представляет собой тирозинкиназу, и белки, которые в обычном состоянии не являются интегрированными в мембрану, подобно рецептору эстрогена-1 (ESR1) и рецептору эстрогена-2 (ESR2), могут также использоваться в настоящем изобретении. Протеаза или часть протеазы, связанная с белком В, может быть протеазой ядерного включения вируса гравировки табака А (TEV). TEV обладает сайтом распознавания, содержащим семь аминокислотных остатков, а потому более специфичен, чем протеазы с меньшими, статистически более распространенными сайтами распознавания. Другие протеазы также подходят для применения в настоящем изобретении. Например, энтерокиназа и протеаза фактора Ха, каждая из которых имеет последовательность распознавания с пятью аминокислотными остатками, тромбин и PureAct™ или Clean Cut™, каждый из которых имеет последовательность распознавания из шести аминокислотных остатков, и PreScission™ с последовательностью распознавания из семи аминокислотных остатков также являются протеазами, которые могут использоваться в настоящем изобретении. Настоящее изобретение не ограничивается использованием какой-либо конкретной протеазы. При этом протеаза должна обеспечивать расщепление на сайте, что приводит к генерации или изменению сигнала от репортера.

В качестве белка, который активирует репортер, может выступать любой фермент, который может действовать на субстрат для генерации детектируемого сигнала.

Например, фермент может прямо или косвенно усиливать или ослаблять флуоресценцию или хемилюминесценцию, или может вызывать изменение цвета.

Репортерный субстрат может иметь биологическую природу, например, белок, или может быть химическим соединением, реакцию которого катализирует репортерный фермент. Вторым рассматриваемым белком может быть ингибирующий белок, например аррестин. Аррестины обычно взаимодействуют с GPCR, чтобы модулировать активность в ответ на взаимодействие лиганда с рецептором. Клетка может быть эукариотом или прокариотом. В качестве репортера может выступать экзогенный компонент, например, β -галактозидаза или люцифераза. Для простоты

термин «репортерный фермент» используется в качестве эквивалента молекулы, активирующей репортер; активатора репортера; молекулы, модулирующей репортер; белка, модулирующего репортер; или белка, активирующего репортер, а также в качестве сокращенного названия молекулы, которая приводит к изменениям в выходе репортера. Например, репортерный фермент может ферментативно вызывать изменение репортерного сигнала или, например, может ферментативно или неферментативно вызывать изменение сигнала, например, сигнала флуоресценции. Квалифицированный специалист в области имеет представление о различных репортерных системах и белках, которые модулируют или активируют репортерный сигнал.

Нуклеотидная последовательность, кодирующая первый белок, может быть модифицирована, с тем чтобы увеличить взаимодействие со вторым белком. К таким модификациям, среди прочих, относятся полная или частичная замена нуклеотидной последовательности С-терминальной области первого белка нуклеотидной последовательностью, которая кодирует аминокислотную последовательность, имеющую более высокую аффинность по отношению ко второму белку, по сравнению с исходной последовательностью. Например, С-терминальная область может быть заменена нуклеотидной последовательностью, кодирующей С-терминальную область AVPR2, AGTRLI, F2RL1, CXCR2/IL-8b или CCR4. Такие модификации известны специалистам в области и определяют дополнительные характеристики настоящего изобретения.

Способы настоящего изобретения могут включать взаимодействие множества испытываемых соединений со множеством образцов клеток или частиц. Каждый образец может взаимодействовать с одним или несколькими испытываемыми соединениями. В другом примере осуществления клетка или частица содержат две различные молекулы с внеклеточными доменами, включающими различные молекулы, активирующие репортер, и обе они взаимодействуют с β -аррестином. Скрининг проводится посредством определения активности репортера, например, посредством мониторинга ферментативной активности в образцах, с тем чтобы установить, модулируют ли какие-либо соединения или смеси соединений специфическое белок-белковое взаимодействие. Способ может включать взаимодействие каждого испытываемого образца с одним и тем же испытываемым соединением, взаимодействие каждого испытываемого образца со смесью испытываемых соединений, или может сочетать такие подходы. С помощью способов настоящего изобретения можно проводить испытания или скрининг соединений, которые ингибируют связывание веществ с белком А. Например, в анализ можно включить известный лиганд белка А, и можно идентифицировать и (или) охарактеризовать соединения, которые модулируют связывание лиганда с белком, так же как в методе конкурентного анализа. Контрольные образцы могут использоваться в каждой процедуре анализа или могут анализироваться параллельно.

В некоторых примерах осуществления настоящего изобретения предлагаются способы, позволяющие определить, модулирует ли испытываемое соединение один или несколько видов рассматриваемого белок-белкового взаимодействия. Для таких примеров осуществления, как правило, характерно: взаимодействие испытываемого соединения с множеством образцов клеток, которые были трансформированы или трансфектированы: (а) первой молекулой нуклеиновой кислоты, в том числе (i) полинуклеотидом, который кодирует первый белок, и полинуклеотидной последовательностью, кодирующей сайт расщепления протеазы, и (ii)

полинуклеотидом, который кодирует белок, активирующий репортер в клетке; и (b) второй молекулой нуклеиновой кислоты, в том числе (i) полинуклеотидом, кодирующим второй белок, взаимодействие которого с первым белком в присутствии рассматриваемого испытываемого соединения предстоит измерять, и (ii) полинуклеотидом, который кодирует протеазу или полипептид, специфичный к расщеплению полипептида на сайте расщепления. Во многих образцах первый белок может отличаться от других первых белков. Затем способ включает установление активности репортера в одном или нескольких из множества образцов посредством определения модулирования одного или нескольких взаимодействий рассматриваемых белков.

Второй белок может отличаться в каждом образце или же быть одинаковым во всех образцах. Все образцы могут объединяться в общем приемнике, и каждый образец может содержать различные пары первого и второго белков. В альтернативном варианте каждый образец может испытываться в различном приемнике. Репортер в конкретном образце может отличаться от репортера в других образцах. Смесь испытываемых соединений может включать биологические пробы или присутствовать в них, например, в спинномозговой жидкости, моче, крови, сыворотке, гное, асцитной жидкости, синовиальной жидкости, экстракте тканей, растительном или травяном экстракте или в экссудате.

В других примерах осуществления настоящего изобретения предлагается рекомбинантная клетка, трансформированная или трансфектированная (a) молекулой нуклеиновой кислоты, включающей (i) полинуклеотид, который кодирует первый белок, (ii) полинуклеотид, кодирующий сайт расщепления протеазы, часть протеазы или полипептид с протеазной активностью, и (iii) полинуклеотид, который кодирует белок, активирующий репортер в клетке; и (b) молекулой нуклеиновой кислоты, включающей (i) полинуклеотид, кодирующий второй белок, взаимодействие которого с первым белком в присутствии испытываемого соединения предстоит измерять, и (ii) полинуклеотид, который кодирует протеазу, часть протеазы или полипептид с протеазной активностью, специфичный к указанному сайту расщепления.

Одну или обе молекулы нуклеиновой кислоты можно стабильно встраивать в геном испытываемой клетки-хозяина. Клетку можно также трансформировать или трансфектировать с помощью репортера. Первым белком может быть интегрированный в мембрану белок, например, трансмембранный рецептор, такой как GPCR. Примеры трансмембранных рецепторов включают ADRB2, AVPR2, HTR1A, CHRM2, CCR5, DRD2, OPRK или ADRA1A.

Как отмечалось выше, в роли протеазы или части протеазы может выступать не только протеаза ядерного включения вируса гравировки табака А, но и любой белок, который активирует белок, активирующий репортер, и может быть любым ферментом, который воздействует на субстрат, с тем чтобы получить приемлемый или детектируемый сигнал. Вторым белком может быть ингибирующий белок. Клетка может быть эукариотом или прокариотом, обычно для скрининга фармацевтических препаратов предпочтительно использовать эукариотические клетки. Особенно предпочтительны клетки, которые гликозилируют по механизму, подобному конечной мишени фармацевтического препарата. Клетки можно выращивать или конструировать таким образом, чтобы добиться желаемых параметров гликозилирования. Использование прокариотических клеток, которые не обладают характеристиками гликозилирования, соответствующими предлагаемой конечной мишени, может оказаться полезным для скрининга и определения характеристик.

В качестве репортера может выступать экзогенный компонент, например, β -галактозидаза, GFP или люцифераза. Нуклеотидную последовательность, кодирующую первый белок, можно модифицировать, с тем чтобы увеличить взаимодействие со вторым белком, например, с этой целью можно производить полную или частичную замену нуклеотидной последовательности С-терминальной области первого белка нуклеотидной последовательностью, которая кодирует аминокислотную последовательность, имеющую более высокую аффинность по отношению ко второму белку, по сравнению с исходной последовательностью. С-терминальную область можно заменить нуклеотидной последовательностью, кодирующей С-терминальную область AVPR2, AGTRLI, F2RL1, CXCR2/IL-8B, CCR4 или GRPR.

В рамках еще одного примера осуществления настоящего изобретения предлагается изолированная молекула нуклеиновой кислоты, включающая (i) полинуклеотид, который кодирует белок, (ii) полинуклеотид, кодирующий сайт расщепления для протеазы, часть протеазы или полипептид с протеазной активностью, и (iii) полинуклеотид, который кодирует белок, активирующий репортер в клетке или в другой системе для анализа. В качестве белка может использоваться интегрированный в мембрану белок, например, трансмембранный рецептор, такой как GPCR. Примеры трансмембранных рецепторов включают ADRB2, AVPR2, HTR1A, CHRM2, CCR5, DRD2, OPRK или ADRA1A. Протеаза или часть протеазы может быть протеазой ядерного включения вируса гравировки табака А. Как отмечалось выше, в роли белка, который активирует репортер, может выступать любой белок, взаимодействующий с субстратом для формирования сигнала, и он необязательно ограничивается примером TEV, который обсуждался в настоящем документе. Этот или иной пример настоящего изобретения не следует рассматривать как ограничивающий охват изобретения конкретным набором примеров осуществления.

В некоторых примерах осуществления настоящего изобретения предлагается вектор экспрессии, содержащий изолированную молекулу нуклеиновой кислоты, которая включает (i) полинуклеотид, который кодирует белок, (ii) полинуклеотид, кодирующий сайт расщепления для протеазы, часть протеазы или полипептид с протеазной активностью, и (iii) полинуклеотид, который кодирует белок, активирующий репортер в клетке и функционально связанный с промотером.

В некоторых примерах осуществления настоящего изобретения предлагается изолированная молекула нуклеиновой кислоты, которая включает (i) полинуклеотид, кодирующий белок, взаимодействие которого с другим белком в присутствии испытываемого соединения предполагается измерять, и (ii) полинуклеотид, кодирующий протеазу, часть протеазы или полипептид с протеазной активностью, специфичной по отношению к сайту расщепления. В роли рассматриваемого белка или другого белка может быть ингибирующий белок, например аррестин.

В некоторых примерах осуществления настоящего изобретения также включает вектор экспрессии, содержащий изолированную молекулу нуклеиновой кислоты, которая включает (i) полинуклеотид, кодирующий белок, взаимодействие которого с другим белком в присутствии испытываемого соединения предполагается измерять, и (ii) полинуклеотид, кодирующий протеазу или часть протеазы, которая специфична по отношению к сайту расщепления; причем указанная нуклеиновая кислота, в свою очередь, функционально связана с промотером.

Еще один пример осуществления касается слитого белка, который получается экспрессией: изолированной молекулы нуклеиновой кислоты, включающей (i)

полинуклеотид, который кодирует белок, (ii) полинуклеотид, кодирующий сайт расщепления протеазы, часть протеазы или полипептид с протеазной активностью, и (iii) полинуклеотид, который кодирует белок, активирующий репортер в клетке, и который функционально связан с промотером; или изолированной молекулы нуклеиновой кислоты, включающей (i) полинуклеотид, кодирующий белок, взаимодействие которого с другим белком в присутствии испытываемого соединения предстоит измерять, и (ii) полинуклеотид, который кодирует протеазу или часть протеазы, специфичную по отношению к сайту расщепления.

В других примерах осуществления изобретения предлагается использовать набор тестов, применяемый для того, чтобы установить, модулирует ли испытываемое соединение рассматриваемое белок-белковое взаимодействие. В набор тестов входят один или несколько следующих компонентов: отдельно расфасованные количества (a) молекулы нуклеиновой кислоты, включающей полинуклеотид, который кодирует первый белок (i) полинуклеотид, кодирующий сайт расщепления протеазы, часть протеазы или полипептид с протеазной активностью, (ii) полинуклеотид, который кодирует белок, активирующий репортерный ген в клетке; и (b) молекулы нуклеиновой кислоты, включающей (i) полинуклеотид, кодирующий второй белок, взаимодействие которого с указанным первым белком в присутствии испытываемого соединения предстоит измерять, (ii) полинуклеотид, который кодирует протеазу или часть протеазы, специфичную по отношению к сайту расщепления; каковой набор в качестве возможного варианта предусматривает хранение всех элементов (a) и (b) отдельно друг от друга. К набору может прилагаться инструкция по применению. В альтернативном варианте набор может содержать клетки, сконструированные таким образом, чтобы экспрессировать любой или оба рассматриваемых слитых белка.

Первым белком может быть интегрированный в мембрану белок, например, трансмембранный рецептор. Конкретным видом трансмембранных рецепторов является GPCR. Конкретным трансмембранным белком является GPCR. Примеры трансмембранных рецепторов включают ADRB2, AVPR2, HTR1A, CHRM2, CCR5, DRD2, OPRK или ADRA1A. Протеаза или часть протеазы, или полипептид с активностью протеазы может быть протеазой ядерного включения вируса гравировки табака А. Белком, который активирует указанный репортер, может быть, например, протеаза, которая действует на детектируемую молекулу, активирующую репортер, реагирующую на активацию посредством расщепления. Репортером может быть любая молекула, которая продуцирует детектируемый сигнал продукта расщепления. Вторым белком может быть ингибирующий белок, например аррестин. Набор может также включать отдельно расфасованное количество изолированной молекулы нуклеиновой кислоты, которая кодирует ген, активирующий репортер. В качестве активатора репортера может выступать, например, β -галактозидаза или люцифераза. Нуклеотидную последовательность, кодирующую указанный первый белок, можно модифицировать, с тем чтобы увеличить взаимодействие со вторым белком, например, с этой целью можно произвести полную или частичную замену нуклеотидной последовательности С-терминальной области указанного первого белка нуклеотидной последовательностью, которая кодирует аминокислотную последовательность, имеющую более высокую аффинность по отношению ко второму белку, по сравнению с исходной последовательностью. Нуклеотидную последовательность указанной С-терминальной области можно заменить нуклеотидной последовательностью, кодирующей С-терминальную область AVPR2, AGTRLI, F2RL1, CXCR2/IL-8B и CCR4.

Подразумевается, что любой способ или состав, описанный в настоящем документе, может применяться для любого другого способа или состава, описанного в настоящем документе. Использование единственного числа вместе с определением «содержащий» в формуле и (или) описании изобретения может относиться к
5
единственному числу, но также по смыслу не противоречит определениям «один или несколько», «по крайней мере один» и «один или более». Там, где соответствующие компоненты описываются с использованием незначительно различающихся формулировок, они необязательно определяют различные примеры осуществления, но
10
взятые вместе, описывают соответствующие элементы в широком смысле.

Эти и другие примеры осуществления настоящего изобретения будут более и глубже понятны из последующих описаний и сопроводительных рисунков. Следует, однако, понимать, что следующее описание, хотя и относится к различным примерам осуществления настоящего изобретения и множеству его специфических
15
подробностей, приводится лишь для иллюстрации и не носит ограничительного характера. В описание изобретения могут быть внесены различные замены, модификации, добавления и (или) перестановки, не затрагивающие его сущности, и настоящее изобретение охватывает все подобные замены, модификации, добавления и
20
(или) перестановки.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ФИГУР

Прилагаемые фигуры являются частью настоящего описания и включаются в него, чтобы дополнительно продемонстрировать определенные аспекты настоящего изобретения. Рассмотрение одной или нескольких приведенных фигур в сочетании с
25
подробным описанием конкретных примеров осуществления, представленных в настоящем документе, могут облегчить понимание сути настоящего изобретения.

На фиг. 1 приводится схематическое описание одного из примеров осуществления, в рамках которого модулятор **4** связывает ассоциированный с протеазой белок **1**, что побуждает этот белок взаимодействовать со вторым белком **2**, ассоциированным с репортерным модулятором **3**, например, пермутированным инактивированным модулирующим белком. Модулятором **4** является соединение, модулирующее белок-белковое взаимодействие. В настоящем примере, например, Ag или аррестин **2** слит с инактивированным пермутированным белком **3**, модулирующим или активирующим репортер. Протеаза **7** ассоциирована с белком **1**. Показан сайт расщепления **8** между
30
двумя сегментами белка, модулирующего репортер **3**. При расщеплении протеазы после взаимодействия с модулятором **4**, связанным с белком **1**, например 7TMR, активность белка, активирующего репортер, восстанавливается, что, в конечном
35
счете, приводит к детектируемому сигналу, который обозначен лампочкой **6**.

На фиг. 2 приводится схематическое представление анализа белок-белкового взаимодействия настоящего изобретения. Интегрированный в мембрану белок **21** со связанной внутриклеточной протеазой **22** взаимодействует с модулятором **4**. Инактивированный белок **23**, связанный с репортером, переносит инактивированный репортер **3** или активатор репортера **3**. При взаимодействии протеаза **22**, связанная с белком **21**, расщепляет сайт расщепления пермутированного белка **23**, активирующего репортер, что обеспечивает реорганизацию **5** частей белка в молекуле активирующего репортер белка **3**, после того как модулятор **4** связывает белок **21**. Репортерный активатор при этом обеспечивает реконструкцию репортера или активатора репортера **3**, чтобы вызывать или активировать репортерный сигнал.
40
45
50

На фиг. 3 схематически представлен пример осуществления, в котором взаимодействуют два трансмембранных белка. Молекула **4** вызывает (модулирует)

взаимодействие между двумя мембранными белками, по крайней мере один из которых, например, является рецепторным белком. На этой фигуре протеаза 22, например, TEV (7 на фиг. 1), связана с белком 1 и оказывается в непосредственной близости от пермутированного слитого белка 3, активирующего репортер и связанного со вторым мембранным белком 33. Протеолиз на сайте расщепления 8, который обеспечивается близостью белков 1, 33, приводит к активации 5 белка 3, активирующего репортер.

На фиг. 3 также приводится схематическое применение технологии идентификации молекул, модулирующих образование гомодимера или гетеродимера рецептора. Приведенные на схеме белки 1 и 33 относятся к интегрированным в мембрану белкам. Белки 1 и 33 были сконструированы таким образом, чтобы каждый из них включал либо протеазу 22, либо репортер 3, активированный протеазой 22. Молекула 4, модулирующая взаимодействие, связывает, например, белок 1 и (или) 33. При взаимодействии 1 и 33 протеаза 22 воздействует на активатор репортера 3, тем самым приводя к изменению сигнала. Гетеродимеризацию можно распространить с охватом традиционной гомодимеризации. Например, 1 и 33 могут представлять собой две копии одного и того же рецептора, но отличаться по связыванию с протеазой или репортером. Как уже упоминалось, определения «репортер» и «активатор репортера» часто употребляются как равнозначные для описания различных примеров осуществления настоящего изобретения.

На фиг. 4 приводится пример, включающий белок-белковое взаимодействие для внутриклеточных белков. Белок 41 является, например, ядерным рецептором гормонов, слитым с активатором 22, например TEV. Пермутирующая молекула 43, активирующая репортер, локализована в ядре клетки 40. Репортер может быть локализован в ядре за счет основного полипептида, действующего как пептидная последовательность для ядерной локализации. После связывания лиганда, например, гормона (не показан), происходит транслокация слитого NHR 41 в ядро, где он взаимодействует с репортерной системой.

На фиг. 5 показано, что активность регенерированной люциферазы, определяемой пермутированными слитыми белками люциферазы, за счет протеазы TEV в клетках может контролироваться посредством модификации сайта расщепления протеазы. Тем самым, появляется возможность регулировать отношение сигнал-шум. Приведены две конструкции, ADRB2 является β 2-адренергическим рецептором, Luc 234-550 и 2-233 представляют собой два фрагмента люциферазы, связанных посредством X, сайта расщепления TEV с меняющейся C-терминальной аминокислотой. В качестве X может выступать, например, серин, S, аргинин, R или валин, V. Активность реконструированной люциферазы от пермутированного слитого белка люциферазы наблюдалась в клетках млекопитающих, если в клетке присутствовали обе конструкции. Подверженность расщеплению при воздействии TEV может зависеть от конкретных аминокислотных остатков на сайте расщепления. Здесь, а также в других случаях, RLU обозначает частицы с относительной люминесценцией (или светом). В данном эксперименте не использовались лиганды.

На фиг. 6 показана зависимость индуцированной агонистом активности люциферазы, по данным клеточного анализа GPCR-пермутированной люциферазы с использованием ADRB2 рецептора, связанного с пермутированной люциферазой с различными сайтами расщепления протеазы TEV, R в положении X сайта расщепления TEV (левый график) и V в положении X (правый график). Протеаза TEV была слита с аррестином. По оси x на каждом графике отложено нулевое значение

(агонист отсутствует) и в присутствии 10 мкМ агониста.

На фиг. 7 приводится зависимый от дозы ответ активности люциферазы, по данным клеточного анализа GPCR-пермутированной люциферазы в системах с совместной промежуточной трансфекцией и частичной промежуточной трансфекцией. На левом графике в клетках СНО использовалась конструкция с валином на сайте расщепления протеазы. Проводили совместную промежуточную трансфекцию конструкций ADRB2-luc и Arr-TEV. На правом графике клетки стабильно трансфектировали R-содержащей конструкцией люциферазы, слитой с ADRB2, а затем проводили промежуточную трансфекцию конструкцией Arr-TEV.

На фиг. 8 приводится альтернативный метод анализа GPCR-пермутированной люциферазы. Конструкции экспрессии содержали ADRB2, связанный с активатором репортера, и аррестин-2, связанный с протеазой. Конструкции промежуточно трансфектировали в клетки НЕК 293. Кинетика реакции отображена на графике в случае одного часа (▲) и пяти часов (■) инкубирования реакции.

На фиг. 9 отражен процесс генерации линии клеток НЕК, стабильно экспрессирующей конструкцию аррестин/пермутированный фермент, содержащую V на сайте X, которые были промежуточно трансфектированы рецептором ADRB2-TEV (левый график), и линии клеток СНО, стабильно экспрессирующей Arr-luc234S233 и промежуточно трансфектированных конструкцией рецептор-TEV.

На фиг. 10 приводится оценка анализа Per-Luc для агониста (изопротеренола) (■), частичного агониста (▲), антагониста плюс изопротеренол (▼), антагониста (◆) и неспецифичного эндогенного рецептора (●): ответы в клетках НЕК, стабильно экспрессирующие конструкцию аррестин/пермутированный фермент и промежуточно трансфектированные ADRB2-TEV.

На фиг. 11 приведена оценка результатов анализа GPCR Per-Luc с агонистом V2 (рецептор вазопрессина-2) и обратным агонистом. Клетки НЕК, стабильно трансфектированные конструкцией аррестин/пермутированная люцифераза, были промежуточно трансфектированы конструкцией V2-TEV и индуцированы агонистом, 8AVP, аргинин-вазопрессином (левый график). Когда эти клетки тестировались в присутствии обратного агониста, наблюдалась зависимость от дозы, причем сигнал был опосредован аррестином, а не G-белком (правый график).

Фиг. 12 посвящена нескольким анализам ADRB2 на основе β-аррестина. На графике справа клетки DiscoverX НЕК были стабильно трансфектированы ADRB2 в соответствии с указаниями изготовителя и тестировались антагонистом (пропранололом) (■), агонистом (изопротеренолом) (▲) и их сочетанием (●) слева и справа агонистом (■), обратным агонистом (▲), справа) и их сочетанием (●). Результаты анализа, приведенные справа, сопоставлялись с результатами анализа настоящего изобретения для ответа на антагонист, агонист изопротеренола и их сочетание (левый график). Рассматриваемый анализ слева обеспечивал более высокий уровень дискриминации и более высокую специфическую активность.

Фиг. 13 отражает анализ V2 на основе β-аррестина. На приведенном графике обратный агонист V2 (SR121463) индуцирует сигнал, независимый от G-белка, но зависимый от аррестина.

На фиг. 14 отображена экспрессия конструкций, которые содержат перекрытие по существу полных по длине, но не точных копий люциферазы, соединенных, как предложено в настоящем документе, чтобы получить пермутированную люциферазу. CMV обозначает промотер цитомегаловируса. Luc2-456 и Luc234-550 представляют собой по существу полные по длине фрагменты люциферазы. В настоящем примере

GS соответствует пептидному линкеру, состоящему из глицина и серина. На сайтах расщепления TEV на С-терминальном конце находится валин.

На фиг. 15 приводится анализ для мониторинга внутриклеточных белок-белковых взаимодействий. Рапамицин является иммунодепрессантом, который одновременно связывается с рапамицин-связывающим белком (FKBP12 или FKBP) и FKBP-рапамицин-связывающим (FRB) доменом мишени рапамицина киназы млекопитающих (mTOR). mTOR является мышшиной серин/треониновой протеинкиназой, содержащей рапамицин-связывающий домен **151**, который представляет собой мишень рапамицина млекопитающих **154**. FKBP **152** обозначает FK506-связывающий белок с весом 12 кДа, который содержит сайт связывания рапамицина. TEV-протеаза сливается с рапамицин-связывающим доменом mTOR, FRB **151**. Пермутированный белок, активирующий репортер, сливается с FKBP **152**, рапамицин-связывающим доменом FKBP12. Рапамицин **154** реагирует с FRB **151** и FKBP **152**, опосредует связывание с ними и обеспечивает их доставку в непосредственное окружение, что приводит к активации пермутированного репортера.

На фиг. 16 приводится схема анализа, где белки А **21** и В **23** представляют собой два интегрированных в мембрану рецептора, которые спонтанно димеризуются (слева направо) или диссоциируют (справа налево) при связывании лиганда. Анализ позволяет отслеживать спонтанное взаимодействие двух рецепторов или индуцированное взаимодействие, при котором один или оба рецептора связывают лиганд, при этом лиганды могут быть одинаковыми или разными. В альтернативном варианте белки А **21** и В **23** могут димеризоваться спонтанно или без обязательного связывания с лигандом или модулятором (не показано). В данном примере осуществления протеаза и части пермутированного активатора репортера слитых белков экспрессируются на поверхности клетки или внешней части искусственного окружения или частицы. Анализ может также проводиться таким образом, чтобы отслеживать нарушение взаимодействия рецепторов, спонтанного или опосредованного одной или несколькими молекулами, что можно видеть по спаду, уменьшению или потере сигнала.

На фиг. 17 отражены данные для клеточного анализа, где белки А **171** и В **172** остаются внутри или на поверхности отдельных клеток, которые могут связываться, соприкасаться, взаимодействовать и пр. Опять же, А **171** или В **172** может переносить протеазу **177** или пермутированный белок **173**, активирующий сигнал. Анализ может детектировать спонтанное взаимодействие двух меченых рецепторов на двух клетках или индуцированное взаимодействие, при котором любой или оба рецептора связывают лиганды, которые могут быть разными или одинаковыми, что свидетельствует о взаимодействии или сближении клеток. В данном примере осуществления протеаза **177** и части **173** пермутированного активатора репортера слитых белков экспрессируются на поверхности клетки или внешней части искусственного окружения. Активированный пермутированный репортер **175** получается из белков А **171** и В **173**, которые ассоциируются друг с другом. В альтернативном варианте слитые белки рецептора и рассматриваемые слитые внутриклеточные белки могут находиться в одной клетке, и индуцирующий фактор, лиганд и пр., который отслеживается, экспрессируется на второй клетке или является второй клеткой. Анализ может также проводиться таким образом, чтобы отслеживать нарушение взаимодействия рецепторов и клеток, спонтанного или опосредованного одной или несколькими молекулами, что можно видеть по спаду, уменьшению или

потере сигнала.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ НЕСКОЛЬКИХ ПРИМЕРОВ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

В анализе настоящего изобретения детектируют белок-белковые взаимодействия, для чего не требуется предварительной информации о соединениях, модулирующих взаимодействие или клеточные пути передачи сигнала, инициированного взаимодействием. Анализ может детектировать взаимодействия мембранных белков, например, образование гомодимеров или гетеродимеров. Анализ позволяет детектировать взаимодействия мембранного белка с цитоплазматическим белком.

Анализ может детектировать взаимодействия двух цитоплазматических белков. Анализ позволяет детектировать транслокацию белка во внутриклеточный отсек или в органеллу внутри клетки. Анализ может детектировать взаимодействие двух клеток или окружений, или частиц. Каждый из белков А или В может связывать лиганд, кофактор или другое соединение, молекулу или вещество, которые, возможно, могут быть важными или необходимыми для белок-белкового взаимодействия.

Термин «последовательность» имеет несколько применений в генетической инженерии, в области нуклеиновых кислот и белков, что известно специалистам в области, и может иметь различные значения в контекстах предложения, абзаца, концепции, идеи, формулировки и пр. Например, последовательность может представлять собой конкретный перечень аминокислотных остатков полипептида (первичную структуру) или оснований нуклеотидов полинуклеотида. В другом контексте термин «последовательность» может относиться к сложной молекуле в общем смысле, примером является полипептидная последовательность, которая относится ко всей молекуле, причем знание первичной аминокислотной структуры необязательно. Генетическая последовательность может быть синонимом гена и относиться к полинуклеотиду как таковому или в целом. Последовательности могут относиться к отдельным полипептидам или полинуклеотидам, или их фрагментам. Поэтому выражение «последовательности функционально связаны» означает, что отдельные гены, домены или единицы транскрипции могут быть связаны или соединены функциональным образом, с тем чтобы обеспечить экспрессию отдельного гена (генов), домена (доменов), единицы (единиц) транскрипции и пр., образующихся в результате соединения или связывания. Последовательности могут также представлять собой части конкретного экспрессированного гена или белка, например, домена (доменов) белка, который имеет множество функциональных элементов или доменов. Как известно специалистам в области, в качестве рассматриваемых полинуклеотидов могут выступать ДНК или РНК, или их смеси, и методы их приготовления и использования в практике настоящего изобретения также известны.

Например, на фиг. 4 приведены данные анализа модулированной активности ядерного рецептора гормонов. Транспорт ядерного рецептора гормонов к ядру вызывает или стимулирует сигнал посредством реорганизации белка, активирующего репортер, и, в одном из вариантов, молекулы, которая поддается детектированию и поэтому может выступать в качестве репортера, например, изменение или образование флуоресценции в результате ответа на активность активирующего белка, такого как люцифераза. Формирующийся сигнал может представлять собой любое детектируемое изменение, например, изменение в интенсивности или изменение параметров возбуждения/испускания. Другим общеизвестным репортерным сигналом является хемилюминесценция. Квалифицированный специалист в области оценит тот факт, что протеаза или пермутированный репортер могут быть сконструированы таким образом, чтобы иметь соответствующий ядерный или другой полипептид-

мишень. Такой полипептид-мишень может включать основные аминокислоты. Сигнал будет модулироваться при взаимодействии обоих в целевой области.

В случае GPCR настоящий метод анализа является специфичным, чувствительным и не требует предварительных данных о конкретном G-белке для связывания. На анализ не влияют эндогенные GPCR, и он может применяться для идентификации молекул, в том числе агонистов, антагонистов и обратных агонистов (для некоторых рецепторов). Метод анализа настоящего изобретения представляет собой более совершенную модификацию по сравнению с методом Lee et al., позволяющую обойтись без необходимого усиления за счет транскрипции. Настоящее изобретение обеспечивает более быстрый и прямой отсчет показаний.

В настоящем изобретении предлагается более простая и надежная система анализа по сравнению с приведенной в Lee et al., отчасти потому, что в данной системе не требуется транслокация реагента в ядро с последующей транскрипцией для усиления сигнала. Поэтому регистрация результатов может производиться сразу же после акта модулирования рецептора. В отличие от метода анализа Lee et al., в настоящем изобретении не требуется привлекать ядро. На самом деле, одним из приложений настоящего изобретения является детектирование секретируемых белков. Репортер или протеаза в цитоплазме могут активировать (или инактивировать) сигнал от секретируемого белка-партнера. Другой пример осуществления предусматривает использование безъядерных клеток или искусственных клеток, окружения или частиц.

Настоящее изобретение особенно удобно применять для идентификации молекул, модулирующих любые белок-белковые взаимодействия. Для метода анализа DiscoveRX™, который использует β -аррестин, требуются два взаимодействующих белковых компонента, которые для генерации сигнала должны все время оставаться связанными. Большинство ранее применявшихся методов анализа GPCR опирались на передачу сигнала G-белками, например, методы анализа FLIPR и цАМФ. Любые молекулы, влияющие на уровни Ca^{++} или цАМФ, склонны генерировать ложноположительные сигналы. С другой стороны, предлагаемый в настоящем изобретении метод анализа отличает скорость, надежность и дешевизна, при этом он не зависит от ассоциирования ферментативного компонента или сигнала G-белков, что может оказывать воздействие на чувствительность и специфичность.

В настоящем изобретении предлагаются способы проведения анализа или скрининга любого белок-белкового взаимодействия посредством слияния белка А (или белка В) с активирующим репортер белком (термины «белок/молекула, модулирующие репортер», или «белок/молекула, активирующие репортер», являются эквивалентами приведенного определения). Примером является пермутированный фермент, содержащий протеолитический сайт расщепления. Белок В сливается с протеазой. Взаимодействие белка А и белка В может быть конститутивным или индуцироваться третьей молекулой. Квалифицированный специалист в области может использовать метод анализа настоящего изобретения для идентификации молекул, которые усиливают или нарушают белок-белковые взаимодействия. В альтернативном варианте белок А может сливаться с протеазой, а белок В может сливаться с белком, активирующим репортер.

В настоящем изобретении в качестве активирующего репортер белка используется белок, который является латентным и активируемым при взаимодействии с протеазой второго белка. Рассматриваемый подход заключается в получении активирующего репортер белка, который представляет собой пермутированную молекулу, сконструированную таким образом, чтобы включать сайт расщепления протеазы.

При расщеплении части белка, активирующего репортер, могут ассоциировать, агрегировать и пр., так чтобы образовать активный полипептид или агрегат, активирующий репортер. Такой активный, например, ферментатически активный, белок, активирующий репортер, затем может воздействовать на подходящий субстрат, например, репортер, чтобы продуцировать детектируемый сигнал. Поэтому, например, если пермутированной инактивированной молекулой является люцифераза, то при ее расщеплении с образованием биологически активного фермента полученная люцифераза может воздействовать на подходящий субстрат, например, люциферин, с генерацией детектируемого сигнала, который в рассматриваемом случае представляет собой люминесценцию.

В другом примере осуществления белок, активирующий репортер, является репортером. Поэтому такой случай можно рассматривать как самоактивацию активирующим репортер белком при его расщеплении. Примером может быть GFP, который при расщеплении реорганизуется и обеспечивает генерацию детектируемого сигнала независимого от репортерной системы, например, как в случае реагента, который продуцирует люциферин, если активатором репортера является люцифераза.

Пермутированные гены, активирующие репортер, могут быть сконструированы в активной или в инактивированной форме. Например, при разработке приведенной технологии была сконструирована GPCR-инактивированная пермутированная слитая люцифераза с измененным порядком аминокислотной последовательности люциферазы. Исходный N-терминальный фрагмент был перемещен к C-терминальному концу, а исходный C-терминальный фрагмент был перемещен к N-терминальному концу, и сайт распознавания протеазы был использован для слияния двух фрагментов с измененным порядком. Взаимодействие GPCR-инактивированного пермутированного слитого белка люциферазы со слитым белком β -аррестин-2-TEV протеазы приводит к расщеплению инактивированной пермутированной люциферазы и генерации активности реконструированной люциферазы. В рамках альтернативной стратегии авторы настоящего изобретения представили конструкцию GPCR-активной пермутированной слитой люциферазы, где сайт распознавания протеазы вводится в исходную упорядоченную последовательность люциферазы, что не оказывает существенного воздействия на активность люциферазы. Взаимодействие GPCR-активного пермутированного слитого белка люциферазы со слитым белком β -аррестин-2-TEV протеазы приводит к расщеплению активной пермутированной люциферазы и продукции двух фрагментов инактивированной люциферазы, что вызывает потерю активности, а значит, уменьшение или исчезновение сигнала.

Белок, активирующий репортер, может выбираться из пермутированных репортеров на основе белков, например, люцифераза *Gaussia*; люцифераза *Renilla*; β -лактамаза; β -галактозидаза; а также флуоресцентных белков, например, один из зеленых флуоресцентных белков (GFP) или белков DsRed и пр., содержащих, например, протеолитический сайт расщепления, такой как сайт расщепления TEV. Несмотря на то, что термин «фермент» используется в качестве общего определения, активирующие репортер белки сами по себе не ограничиваются «ферментами», но к ним относятся любые активирующие репортер белки, которые в состоянии вызвать изменение сигнала. Например, связывание или удерживание флуоресцентного белка может приводить к заметному изменению сигнала без химической реакции, изменяющей молекулярную структуру.

Одной из особенностей настоящего изобретения является тот факт, что квалифицированные специалисты в области молекулярной биологии или химии белков

смогут сконструировать варианты пермутированной люциферазы с использованием различных точек разрыва и различных областей перекрытия, с тем чтобы уменьшить или увеличить протеазную активность, активность базальной люциферазы или активность реконструированной люциферазы. См. работу Rachel B. Kapust, et al.

5

Biochemical & Biophysical Research Communications, 294 (2002) 949-955.

Протеазы известны специалистам в области и могут происходить из различных источников, например, бактерий, дрожжей, грибов, растений, насекомых, млекопитающих и пр. Организмы нуждаются в протеазах для переработки пептидов, а потому в биологических системах присутствует множество различных протеаз, пригодных для использования в настоящем изобретении. Выбор подходящих сайтов расщепления для нужного фермента обычно можно сделать на основе данных научной литературы или каталогов продукции. Такие сайты расщепления протеаз представляют собой олигопептиды различной длины, например, из двух аминокислот, трех аминокислот, четырех, пяти, шести, семи, восьми, девяти, десяти или более аминокислот и т.д.

10

15

Пермутированный белок, активирующий репортер, можно также заменять альтернативными сайтами расщепления протеазы или связывать с одним или несколькими инактивированными пре- или проэнзимами, которые могут быть трансформированы в активные ферменты после расщепления. Например, сайты расщепления пре- или проэнзимов могут быть модифицированы, с тем чтобы быть чувствительными к ферменту, который распознает последовательность, отличающуюся от нативного типа. В альтернативном варианте сайт расщепления может быть модифицирован с учетом конкретного желаемого эффекта, например, большей специфичности, более высокой чувствительности к расщеплению и пр.

20

25

Анализ также может проводиться с использованием активного фермента с сайтом расщепления протеазы, который после расщепления трансформируется в инактивированный фермент. Такая особенность обеспечивает определенное упрощение, поскольку многие протеолитические ферменты с различным уровнем специфичности могут после этого воздействовать на активный фермент так, как требуется, с минимальными изменениями в конструкции или без них.

30

Клетки млекопитающих, например, HEK293, COS-7, NIH3T3 и пр., а также клетки дрожжей могут использоваться для обнаружения белок-белкового взаимодействия в методе анализа пермутированного белка, активирующего репортер. Могут также использоваться бесклеточные системы. К таким бесклеточным системам относятся лизаты, препараты мембран, вирусный материал, вирусоподобные частицы, липосомы, тромбоциты, препараты мембран, спиралевидные агрегаты, другие искусственные частицы на липидной основе или среды, которые модулируют биологические мембраны с образованием структуры, которая может захватывать, связывать, переносить, включать и пр. тот или иной биологический объект, например, трансмембранный белок. В рассматриваемом методе анализа могут использоваться живые организмы, например, трансгенные организмы, или же у них могут отбираться клетки или реагенты, которые могут применяться в рассматриваемом методе анализа.

35

40

45

В настоящем методе анализа также предлагается детектируемый репортер. Такой репортер является субстратом для рассматриваемого белка, активирующего репортер. Поэтому в случае пермутированной люциферазы подходящим репортером является люциферин, который при воздействии люциферазы продуцирует детектируемый сигнал люминесценции. Репортер может быть внутриклеточным, чтобы обеспечивать метод анализа, который позволяет обойтись без лизиса клеток. Например, GFP,

50

слитый с карбоксильным терминальным остатком связывающего мальтозу белка (МВР) не является флуоресцентным в присутствии сигнальной последовательности МВР. При удалении сигнального пептида МВР наблюдается флуоресценция. См. работу Feilmeier et al., J Bacteriol 182(14)4068-4076, 2000. Поэтому после сигнального пептида МВР можно ввести сайт расщепления протеазы, как предлагается в настоящем документе, с тем чтобы получить метод анализа, который может проводиться с использованием живых клеток.

Метод анализа может применяться для отслеживания субклеточного места расположения и транслокации комплекса взаимодействия белков за счет использования пермутированной люциферазы или флуоресцентных белков. На фиг. 4 приводится схематическое представление такого примера осуществления.

Настоящее изобретение относится к способам, позволяющим установить, модулирует ли рассматриваемое соединение взаимодействие i) первого белка, такого как интегрированный в мембрану белок, например, рецептора, такого как трансмембранный рецептор, со ii) вторым белком, например, внутриклеточной молекулой, другим трансмембранным белком и пр., например, относящимся к семейству аррестинов. Одна из методологий включает совместную трансформацию или трансфекцию клеток, которые могут быть прокариотами или эукариотами, с использованием двух конструкций. Первая конструкция включает первую нуклеиновую кислоту, кодирующую (а) первый белок, например, трансмембранный рецептор, и (b) сайт расщепления для протеазы, и (с) вторую нуклеиновую кислоту, кодирующую белок, который активирует репортер. Вторая конструкция включает (а) нуклеиновую кислоту, кодирующую второй белок, взаимодействие которого с первым белком измеряется и (или) определяется, и (b) нуклеиновую кислоту, кодирующую протеазу, часть протеазы или полипептид с протеазной активностью, которые действуют на сайт расщепления первой конструкции. В некоторых примерах осуществления одна или несколько таких конструкций могут стабильно интегрироваться в клетки.

Особенности примера осуществления изобретения наглядно отображены на фиг. 1. Коротко говоря, получают клетку, которая экспрессирует первый рассматриваемый белок. Рассматриваемый белок может содержать протеолитическую часть, или протеолитическая часть может ассоциироваться с комплексом при связывании или высвобождении связанного лиганда. Инактивированный фермент связывается с пептидной частью, которая ассоциируется с первым рассматриваемым белком в ответ на изменение связывания лиганда. Близость протеазы к инактивированному ферменту в данном примере осуществления позволяет восстановить активность фермента, например люциферазы. Восстановленная активность воздействует на передачу сигнала о таком белок-белковом взаимодействии.

В примере, приведенном на фиг. 1, описывается трансмембранный белок, фермент расщепления TEV, пермутированная люцифераза и субстрат люциферазы, например люциферин. В данном примере в качестве белка «А» может выступать аррестин. Первым рассматриваемым белком может быть GPCR. N- и C-терминальные окончания люциферазы можно реорганизовывать и связать с сайтом расщепления TEV протеазы, чтобы получить инактивированную, пермутированную люциферазу. Как показано на фигуре, пермутированная люцифераза сливается с β -аррестином-2.

Белок А может сливаться с протеазой. Белок В может сливаться с инактивированным пермутированным белком, активирующим репортер. Сайт распознавания и расщепления протеазы (который распознается протеазой, слитой с

белком А) вводят в пермутированный белок, активирующий репортер. Белок А и белок В сближают, например, третьей молекулой, которая модулирует взаимодействие белка А и белка В. Протеолиз пермутированного инактивированного белка, активирующего репортер, под действием находящейся поблизости слитой протеазы приводит к слиянию двух фрагментов пермутированного белка, активирующего репортер, с тем чтобы восстановить активность активного белка, активирующего репортер. Активность белка, активирующего репортер, может оцениваться с применением соответствующих реагентов и приборов в присутствии подходящего репортера, например люциферина, с помощью серийно выпускаемых реагентов и наборов.

GPCR в качестве белка А может сливаться с протеазой TEV. В альтернативном варианте GPCR может сливаться с пермутированным белком, активирующим репортер.

На фиг. 1 молекула, которая связывается с GPCR, вызывает взаимодействие β -аррестина с GPCR. Протеолиз сайта расщепления в структуре пермутированной люциферазы протеазой TEV, которая связана с белком А или находится поблизости от него, обеспечивает генерацию фрагментов белка люциферазы. Фрагменты восстанавливают активную люциферазу, которую детектируют или же о присутствии которой делают вывод на основании подходящего репортера активности люциферазы, например люциферина, в клетке или в лизате.

Данный способ может обеспечивать специфические сигналы для рецепторных белков, например, GPCR, которые могут взаимодействовать с G-белком или β -аррестином.

Общий способ, показанный на фиг. 1, применим, как правило, и к GPCR, поскольку участие бета-аррестина является распространенным явлением. Вместе с тем в практических приложениях настоящего изобретения может использоваться любая пара молекул, которые взаимодействуют, связываются, ассоциируются между собой и пр. или предположительно взаимодействуют, связываются, ассоциируются между собой и пр.

В рассматриваемом в примере способе используется путь передачи сигнала β -аррестина, который не требует никакой предварительной информации о специфическом связывании G-белка, поскольку используемый метод анализа неспецифичен по отношению к GPCR или к задействованному G-белку. Поэтому применение настоящего метода анализа желательно для сиротских GPCR, для которых неизвестен путь связывания с G-белком. Этот способ обеспечивает оперативные и физиологически значимые результаты без транскрипционной амплификации, как это предлагается в анализе, описанном в патенте США № 7049076 (Lee et al.).

Материалы и способы также позволяют проводить мониторинг явлений, независимых от G-белка. В этом случае β -аррестин можно пометить пермутированным белком, активирующим репортер. Молекула, которая предположительно или наверняка взаимодействует с β -аррестином, может быть помечена соответствующей протеазой, например, рецептором GPCR, который демонстрирует тенденцию к связыванию β -аррестина.

Настоящее изобретение обладает преимуществами по сравнению с методами анализа комплементации фрагментов фермента (такими как анализ β -аррестина DiscoverX PathHunterTM), в которых партнеры взаимодействия должны оставаться связанными или находиться поблизости, с тем чтобы обеспечивать комплементацию фрагментов фермента. С другой стороны, в рассматриваемом

методе анализа после завершения протеолиза вследствие близости реагентов образуется активный активатор репортера, и для надлежащей информативной пробы не требуется, чтобы белковые партнеры по взаимодействию оставались связанными.

5 В клетку-хозяина может вводиться нуклеиновая кислота, кодирующая такой первый слитый белок и другие пептидные компоненты. Такая инженерия клетки хорошо известна специалистам в области. Нуклеиновая кислота для различных пептидов может конструироваться в виде единичной молекулы или может вводиться последовательно или параллельно. Некоторые конструкции можно интегрировать в

10 хромосому хозяина, например, для обеспечения стабильной трансфекции, при этом используются материалы и способы, известные специалистам в области.

В альтернативной системе два рассматриваемых белка могут взаимодействовать в отсутствие лиганда или испытываемого соединения. Лиганд или испытываемое

15 соединение могут вызывать диссоциацию двух белков, изменение их конформации или каким-либо другим образом ослаблять или ингибировать их взаимодействие. В этом случае в присутствии положительно действующего испытываемого соединения уровень свободного, функционально активного протеолитического фермента в клетке падает, что приводит к снижению протеолиза и регистрируемому падению активности

20 белка, активирующего репортер.

В одном примере осуществления аррестин выступает в качестве второго белка, который связывает трансмембранный рецептор в присутствии агониста; однако следует понимать, что поскольку рецепторы представляют собой только один вид

25 белков, метод анализа не зависит от использования молекул рецептора, и связывание агониста не является единственным взаимодействием, которое может быть здесь задействовано. Любой белок, который взаимодействует со вторым белком, удовлетворяет требованиям, но особый интерес представляют трансмембранные белки благодаря их способности вызывать реакцию клетки, органа и ткани при

30 воздействии модулятора, который приводит интегрированный клеточный рецептор в активное состояние, на рецептор. Кроме того, связывание агониста с рецептором не является единственным видом связывания, который может анализироваться. В настоящем методе анализа также могут тестироваться обратные агонисты. Можно установить антагонистов как таковых, а также определить относительную

35 эффективность различных антагонистов и (или) агонистов в соответствии с настоящим изобретением.

Ниже описываются другие подробные сведения об изобретении, в том числе конкретные способы и технологии приготовления и использования его предмета.

40 Как и в случае способа, описанного в настоящем документе, продукты, которые являются отличительными характеристиками настоящего изобретения, поддаются простому описанию. Например, в «конструкции из трех частей», то есть конструкции, содержащей последовательности, которые кодируют i) белок, ii) сайт расщепления и iii) белок, активирующий репортер; белком может быть, например,

45 внутриклеточный белок или интегрированный в мембрану белок, такой как трансмембранный рецептор, например, член семейства GPCR. Сайт расщепления может представлять собой гидролизуемый сайт, гидролиз которого может осуществляться при воздействии протеазы белка партнера по белок-белковому

50 взаимодействию. Расщепление может напрямую приводить к формированию сигнала, или же расщепление может обеспечивать реорганизацию белка, активирующего репортер, с тем чтобы стимулировать сигнал от другой молекулы. Третьим компонентом может быть также протеаза или полипептид с протеазной активностью.

Эти последовательности могут быть модифицированы таким образом, чтобы С-терминальный конец белков, которые они кодируют, вступал в более эффективное и прочное взаимодействие со вторым белком. Такие модификации могут включать, например, замену последовательности, кодирующей С-терминальный конец белка, например, GPCR, областью, кодирующей С-терминальный конец AVPR2, AGRRLI, F2PLI, CCR4, CXCR2/IL-8 и пр. Последовательности генов можно перекодировать, так чтобы оптимизировать трансляцию рассматриваемых белков в рассматриваемой клетке-хозяине.

В качестве белка, активирующего репортер, может выступать белок, который действует в пределах цитоплазмы или органеллы, например ядра, или может быть молекула, которая приводит в действие каскад реакций, приводящий к реакциям другого белка. Квалифицированный специалист в области хорошо осведомлен о таких каскадах, поскольку они относятся к подробно изученным клеточным процессам. Например, в репортерный фермент могут быть включены сигналы транслокации, такие как последовательность ядерной транслокации. Специалистам в области известны последовательности локализации.

Вторая конструкция, как описано выше, включает область, которая кодирует белок, взаимодействующий с первым белком, следствием чего становится некоторое регистрируемое явление. Белок может быть активатором, конкурентом, ингибитором, может обеспечивать синергический ответ и пр., или, в более общем определении, быть «модулятором» первого белка. В качестве примеров используются члены семейства аррестинов, особенно если первым белком является GPCR, но могут применяться и другие последовательности, кодирующие белки, в частности, если первым белком не является GPCR. Вторая часть таких двухсоставных конструкций кодирует протеазу, часть протеазы или полипептид с протеазной активностью, которые призваны расщеплять активирующий репортер белок, кодируемый первой конструкцией, с тем чтобы получить активирующий репортер белок, способный прямо или косвенно индуцировать детектируемый сигнал.

При этом перечисленные примеры осуществления не ограничивают охват изобретения, как это обсуждается в приведенных ниже дополнительных примерах осуществления, например, в зависимости от поставленной цели протеаза может сливаться с белком А или белком В.

Клетка-хозяин

Используемые в настоящем документе термины «клетка», «линия клеток» и «клеточная культура» могут использоваться равнозначно. Термин «клетка-хозяин» может также относиться к исходной клетке, из которой можно получить лизат. Все эти термины также распространяются на их потомство, к которому относятся все без исключения последующие поколения. Следует понимать, что все потомство может быть неидентичным из-за намеренных или случайных мутаций, селекции или дифференциации. Клетка-хозяин может быть сконструирована таким образом, чтобы обеспечивать экспрессию поддающегося скринингу или селекции маркера или репортера, обеспечивающего генерацию сигнала при воздействии активирующего репортер белка первой конструкции, который расщепляется протеазой, образующей часть слитого белка второй конструкции. Для введения поддающегося скринингу маркера или репортера в клетку-хозяина или в систему для анализа могут использоваться любые способы.

Для использования в качестве клетки-хозяина существует множество клеточных линий и культур. Например, многие из них могут быть получены через Американскую

коллекцию типовых культур (АТСС) - организацию, выступающую в качестве архива живых культур и генетических материалов. Специалисты в области могут определить подходящего хозяина на основании структуры вектора и желаемого результата.

5 Например, для репликации многих векторов в прокариотическую клетку-хозяина может вводиться плаزمид или космид. К типам клеток, пригодным для репликации и (или) экспрессии вектора, среди прочих, относятся бактерии, такие как *E. coli* (например, *E. coli* штамм RR1, *E. coli* LE392, *E. coli* B, *E. coli* X 1776 (АТСС № 31537), *E. coli* W3110 (F⁻, лямбда⁻, прототрофные, АТСС № 273325), DH5α, JM109 и KC8),
10 бациллы, например, *Bacillus subtilis*; а также другие энтеробактерии, например, *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescens*, различные виды *Pseudomonas*, а также ряд доступных для приобретения бактериальных хозяев, например, компетентные клетки SURE[®] и клетки SOLOPACK[™] Gold (STRATAGENE[®], La Jolla). В некоторых
15 примерах осуществления в качестве клетки-хозяина для фагов могут использоваться бактериальные клетки, например, *E. coli* LE392.

Примерами эукариотических клеток-хозяев для репликации и (или) экспрессии вектора, среди прочих, являются HeLa, NIH3T3, Jurkat, 293 (HEK), COS, CHO, Saos и PC12. Также пригодны и другие клетки, такие как клетки дрожжей или клетки
20 насекомых, например, клетки Sf9. Квалифицированные специалисты в области вправе по своему усмотрению выбирать клетку-хозяина, которую они намерены использовать для предполагаемой цели. Квалифицированным специалистам в области доступно и известно множество клеток-хозяев среди различных типов клеток и видов
25 организмов.

Аналогичным образом, в сочетании с эукариотической или прокариотической клеткой-хозяином может использоваться вирусный вектор (в том числе фаг), в особенности с такой клеткой, которая допускает репликацию или экспрессию вектора. Клетка-хозяин необязательно относится к иммортализованной линии клеток. Клетка-
30 хозяин может быть взята от культуры стволовых клеток или культуры первичных клеток, например, гематопозитических стволовых клеток, сосудистых, эпителиальных клеток, клеток гладкой мускулатуры, селезенки, Т-клеток, В-клеток, моноцитов и пр. Клетка-хозяин может быть трансгенной, например, содержащей генетический
35 материал от другого организма. Клетки, которые нельзя использовать в методе Lee et al., пригодны для анализа в рамках настоящего изобретения, поскольку в данном случае отпадает потребность в активной транскрипции. Например, в настоящем изобретении могут использоваться безъядерные клетки, такие как эритроциты или тромбоциты.

40 В контексте рассматриваемого способа предполагается, что термин «клетка-хозяин» включает искусственное окружение и частицы, например, липосомы и вирусоподобные частицы. Подобные структуры часто имитируют или моделируют клетку или ее части посредством создания оболочки, окружающей пустое
45 пространство, которое полностью или частично отделено от внешней среды пленкой, мембраной или другой структурой. Как уже отмечалось, к такому искусственному окружению и частицам относятся липосомы, спиралевидные агрегаты, вирусоподобные частицы, вирусы и пр.

Белки

50 В настоящем изобретении предлагается использовать любые два белка, для которых известно или предполагается физическое взаимодействие. В некоторых примерах осуществления белки будут существовать или будут сконструированы в форме слитых белков, первый белок сливается с латентным или инактивированным

полипептидом, активирующим репортер, а второй белок сливается с протеазой, распознающей сайт расщепления в первом слитом белке, расщепление которого высвобождает активирующий репортер полипептид или обеспечивает его активность.

5 Что касается первого рассматриваемого белка, то первым белком может быть, например, встречающийся в природе интегрированный в мембрану белок или белок, сконструированный таким образом, чтобы обеспечивать его встраивание в мембрану. Например, первым белком может быть трансмембранный рецептор, такой как GPCR, или любой другой рассматриваемый трансмембранный рецептор, в том числе, среди
10 прочих, рецептор тирозинкиназ, рецептор серин/треониновых киназ, рецепторы цитокинов и т.д. Кроме того, поскольку хорошо известно, что части белков будут функционировать точно таким же образом, как и первый белок полной длины, такие активные части первого белка, например, внеклеточный домен и трансмембранный домен, включаются в охват определения белка в настоящем документе.

15 Как будет очевидно квалифицированному специалисту в области, настоящее изобретение может использоваться для анализа взаимодействия с любым белком, и его охват не ограничивается анализом интегрированных в мембрану рецепторов, таких как GPCR. Например, активность других классов трансмембранных рецепторов, в том числе, среди прочих, рецептора тирозинкиназ (RTK), например, IGF1R, например, рецептора эпидермального фактора роста (EGFR), ErbB2/HER2/Neu или
20 родственных RTK; рецептора серин/треониновых киназ, например, трансформирующего фактора роста- β (TGF β), активина или рецепторов костного морфогенетического белка (BMP); рецепторов цитокина, например, рецепторов семейства интерферонов для интерлейкина, эритропоэтина, G-CSF, GM-CSF или фактора некроза опухоли (TNF); рецепторов лептина; а также прочих рецепторов, которые необязательно интегрированы в мембрану в обычном состоянии, например, рецептора эстрогена-1 (ESR1) и рецептора эстрогена-2 (ESR2). В каждом случае
30 данный способ может предусматривать трансфекцию клетки модифицированным полинуклеотидом рецептора, который определяет экспрессию химерного или слитого белка, в том числе рассматриваемого рецептора, сайта расщепления протеазы и полипептида, активирующего репортер. Клетка может совместно трансфектироваться вторым полинуклеотидом, например, вектором, который определяет экспрессию
35 химерного или слитого белка, в том числе взаимодействующего белка, слитого с протеазой, которая распознает и расщепляет сайт расщепления первого белка. Первый и второй полинуклеотиды могут быть объединены в одной молекуле, тем самым можно избежать совместной трансфекции. В случае RTK, например, EGFR, такой взаимодействующий белок может состоять из SH2 (домена Src гомолога-2), содержащего полипептид, такой как фосфолипаза C (PLC), или домена Src гомолога-2, содержащего трансформирующий белок 1 (SHC1). В случае рецептора серин/треониновых киназ, например, рецепторов TGF β , активина и BMP, таким взаимодействующим полипептидом может быть белок Smad или его часть. В случае
45 рецепторов цитокинов, например, рецепторов интерферона α , интерферона β или интерферона γ , такой взаимодействующий белок может быть передатчиком сигнала и активатором транскрипции (STAT), например, среди прочих, Stat1 или Stat2; или белки янус-киназы (JAK), Jak1, Jak2 или Tyk2; или же их части и пр. Трансфектированная
50 клетка может содержать репортер, на который действует активирующий репортер белок. Затем проводят анализ, в ходе которого трансфектированные клетки обрабатывают испытываемым соединением в течение определенного периода времени, и по завершении периода тестирования измеряют активность репортера.

Если испытываемое соединение активирует рассматриваемый рецептор, происходит стимулирование взаимодействий между рассматриваемым рецептором и взаимодействующим белком, что приводит к расщеплению сайта протеазы и активации белка, активирующего репортер, что, в свою очередь, приводит к регистрируемому изменению или увеличению активности репортера.

К другим возможным парам белков относятся антитело-антиген, фермент-субстрат, димеризующиеся белки, компоненты каскадов передачи сигнала, компонент(-ы) сложной структуры, например, рибосомы или вируса, взаимодействующие на межклеточном уровне молекулы на различных клетках, например, на антиген-содержащей клетке и иммунной клетке для ответа, такой как Т-клетка, В-клетка, НК-клетка, дендритная клетка, моноцит, макрофаг и пр., а также другие пары белков, известные специалистам в области. Определения протеазы и белка с сайтом распознавания протеазы используются равнозначно по отношению к каждому из белков, например, А или В, с которым каждый из них связан или ассоциирован.

Репортеры

В качестве репортера может выступать любая молекула, которая меняет структуру или функции в ответ на воздействие активной молекулы, активирующей репортер, и позволяет получить детектируемый сигнал, или же может легко контролироваться для отслеживания таких изменений. Предполагается, что эти термины будут использоваться свободно. Белок, активирующий репортер, после его активации (или инактивации в некоторых возможных примерах осуществления) вызывает детектируемое изменение в молекуле репортера. Регистрация такого изменения используется, для того чтобы определить, например, модулировало ли испытываемое соединение белок-белковое взаимодействие. В случае появления детектируемого сигнала могут использоваться другие белки, активирующие репортер, не являющиеся ферментами. Поэтому могут использоваться известные белки, активирующие репортер, например, галактозидазы, пероксидазы, люциферазы и пр. Могут применяться известные репортеры, например, субстраты галактозидазы, субстраты пероксидазы, субстраты люциферазы, GFP и пр.

Протеазы и сайты расщепления

Протеазы относятся к хорошо охарактеризованным ферментам, которые расщепляют другие белки в конкретном сайте. Одно из семейств, семейство серин/треониновых протеаз, обеспечивает расщепление в месте расположения остатков серина и (или) треонина. К другим протеазам относятся цистеин- или тиол-протеазы, аспартат-протеазы, металлопротеиназы, аминопептидазы, ди- и трипептидазы, карбоксипептидазы и пептидилпептидазы. Выбор протеаз остается за квалифицированным специалистом в области, и этот выбор не должен ограничиваться молекулами, описанными в настоящем документе. Хорошо известно, что ферменты содержат каталитические домены, и такие домены могут использоваться вместо протеаз полной длины. Они также входят в сферу охвата настоящего изобретения. Одной конкретной реализацией является протеаза ядерного включения вируса гравировки табака А (TEV) или ее активная часть. Могут также использоваться другие специфичные сайты расщепления для протеаз, что будет очевидно для квалифицированного специалиста в области.

Модификация белков

В некоторых примерах осуществления настоящего метода анализа первый белок может быть модифицирован, с тем чтобы усилить его связывание с взаимодействующим белком. Например, известно, что некоторые GPCR связывают

аррестины более стабильным образом или с более высокой аффинностью при стимулировании лиганда, и такое более эффективное взаимодействие опосредовано отдельными доменами, например, кластерами остатков серина и треонина в С-терминальном конце (Oakley et al., *J. Biol. Chem.*, 274:32248-32257, 1999 и Oakley et al., *J. Biol. Chem.*, 276:19452-19460, 2001). С помощью данного примера становится очевидно, что сама по себе последовательность, кодирующая рецептор, может модифицироваться, с тем чтобы повысить аффинность интегрированного в мембрану белка, например рецептора, к белку, с которым он связывается. Примерами таких изменений являются модификации С-терминальной области интегрированного в мембрану белка, например, 7TMR, которые могут включать замену его части на соответствующую область другого рецептора, который обладает более высокой аффинностью к связываемому белку, но не оказывает воздействия на функцию связывания с рецептором.

В дополнение к этому или в качестве альтернативы второй белок может быть модифицирован, с тем чтобы увеличить взаимодействие с первым белком. Например, метод анализа может включать точечные мутации, результаты процессинга или другие варианты второго белка, например, аррестины, которые, как известно, более стабильно или независимо от фосфорилирования образом связывают занятые агонистом рецепторы GPCR (Kovoor et al., *J. Biol. Chem.*, 274:6831-6834, 1999). Такие изменения могут вноситься с использованием методов, известных специалистам в области.

Формат анализа

В нескольких примерах осуществления настоящего изобретения предлагается простой способ оценки взаимодействия двух белков при их экспрессии в одной и той же клетке, частице или реакционной смеси. Первая конструкция может включать последовательность, кодирующую первый полипептид, сцепленный с полинуклеотидом, кодирующим сайт расщепления протеазы, части протеазы или полипептида с активностью протеазы, который, в свою очередь, находится в конкатенации с полинуклеотидом, кодирующим репортерный фермент. Термин «конкатенация» описывает ситуацию, в которой указанные последовательности слиты таким образом, чтобы получить единую, интактную открытую рамку считывания, которая может транслироваться в единый полипептид, содержащий все элементы. Они могут, но необязательно, разделять добавочные нуклеотиды, которые могут кодировать или не кодировать другие белки или пептиды. Вторая конструкция, введенная в рекомбинантные клетки, может содержать полинуклеотид, кодирующий второй белок, и протеазу, часть протеазы или полипептид, кодирующий активность протеазы. Взятые вместе, эти элементы образуют базовый формат метода анализа в сочетании с потенциальным агентом, влияние которого на взаимодействие целевого белка исследуется в данном случае.

При этом изобретение может также применяться для анализа нескольких интегрированных в мембрану белков одновременно, например, рецепторов, с использованием различных репортеров, каждый из которых стимулируется активацией белка, например, белками из классов, описанных в настоящем документе. Например, это может достигаться посредством смешения клеток, трансфектированных различными конструкциями рецепторов и различными белками, активирующими репортер, или посредством слияния различных ферментов для каждого испытываемого рецептора и измерения активности каждого репортерного гена при обработке испытываемым соединением (соединениями). Например, может

быть желательно определить, активирует ли рассматриваемая молекула первый рецептор, а также установить, следует ли ожидать побочных эффектов в результате взаимодействия со вторым рецептором. В данном случае можно, например, использовать первую линию клеток, кодирующих первый рецептор и первый белок, активирующий репортер, например, lacZ, и вторую линию клеток, кодирующую второй белок, активирующий рецептор, и второй репортер, например, GFP. В данных обстоятельствах GFP может быть пермутирован в соответствии с практикой настоящего изобретения. Можно смешать две линии клеток, добавить рассматриваемое соединение и отслеживать положительный эффект для одного из них при отсутствии эффекта на другом.

Изобретение в альтернативных форматах относится к методам анализа, где изучается одна пара взаимодействующих белков, а также к случаям, которые в настоящем документе называют «мультиплексными» методами анализа. Такие методы анализа можно проводить разным образом, но во всех случаях одновременно испытывается более одной пары белков. Это может достигаться, например, за счет использования нескольких образцов клеток, каждая из которых была трансформирована или трансфектирована для испытаний каждой взаимодействующей пары белков. Различные трансформированные клетки можно комбинировать и испытывать одновременно в одном приемнике, или каждый из различных типов трансформанта можно помещать в различные лунки, а затем тестировать. В альтернативном варианте клеткой можно манипулировать, с тем чтобы работать со множеством меченых первых белков, например, трансмембранных белков, чтобы определить, в состоянии ли лиганд или потенциальная молекула активировать более одного рецептора.

Клетки, используемые в мультиплексных анализах, которые описаны в настоящем документе, могут быть одинаковыми, но необязательно. Аналогичным образом, репортерная система, используемая в каждом образце, может быть одной и той же, но необязательно. После того как образец или образцы помещают в приемники, например, в лунки микропланшета, можно проводить скрининг одного или нескольких соединений по отношению (если возможно) к множеству взаимодействующих пар белков, размещенных в приемниках.

На фиг. 10 приводится пример характерных результатов, получаемых в ходе данного анализа. При низких или высоких концентрациях (в зависимости от того, носит ли модуляция ингибирующий или активирующий характер) испытываемое соединение может не оказывать никакого эффекта. По мере уменьшения или увеличения концентрации модулирующий эффект может меняться. Для оценки модуляции может использоваться кривая ответа на дозу, показанная на фиг. 10. Можно также рассчитывать значения в отдельной точке. Например, отдельная точка может иметь заранее заданное значение, отличающееся от контрольного или фонового, которое часто определяется на статистической основе посредством накопления данных или анализа нескольких образцов от «нормальных» субъектов, с тем чтобы получить среднее значение по выборке образцов со стандартными ошибками и отклонениями. В качестве заранее заданного значения разницы может использоваться константа. Как правило, используется отношение, например, по крайней мере 10% от контрольного значения, но чаще применяют величины, кратные контрольному значению, например, около 1,5, 2, 2,5, 3, 4, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500, 1000 или более (или обратные им величины), помноженные на контрольное значение, которое может быть предварительно установлено в другом цикле анализа.

Заранее установленное предельное значение, указывающее на модулирование, рассчитывается квалифицированным специалистом по стандартной методике с учетом компенсации ошибок 1 и 2 типа в зависимости от возможностей или потребностей ситуации.

Наборы для анализа

Любые из составов, описанных в настоящем документе, и их сочетаний могут поставляться в форме набора для анализа. Такие наборы будут включать пригодную емкость (емкости), один или несколько компонентов, например, векторы или клетки настоящего изобретения, а также любые дополнительные агенты, которые могут использоваться в соответствии с настоящим изобретением.

Наборы могут включать один или несколько надлежащим образом отобранных аликвот составов настоящего изобретения. Компоненты наборов могут быть упакованы в форме водных растворов или в лиофилизованной форме, или же в виде концентрата в подходящем для растворенного вещества растворителе. Емкость (емкости) наборов обычно будет включать по крайней мере один флакон, пробирку, колбу, бутылку, шприц или иную емкость, в которую можно поместить компонент или в которой он помещен, предпочтительно, в надлежащим образом отобранной аликвоте. Если в наборе для анализа присутствует несколько компонентов, то такой набор, как правило, также будет включать вторую, третью и пр. емкости, в которые можно будет отдельно поместить дополнительные компоненты. При этом различные сочетания компонентов могут помещаться в одну емкость, например флакон. Кроме того, могут прилагаться подходящие разбавители. Наборы настоящего изобретения также будут, как правило, предусматривать средства, позволяющие обеспечить неподвижность емкостей с реагентами в упаковке для коммерческого сбыта. К таким средствам может относиться изготовленная выдувным формованием тара из пластика или из пенопласта, в которой хранятся флаконы вместе с печатными инструкциями.

Если компоненты набора поставляются в форме одного и (или) нескольких растворов жидкостей, таким раствором может быть водный раствор, например, наиболее часто используется стерильный водный раствор. Вместе с тем, компоненты набора для анализа могут поставляться в форме сухого порошка (порошков) или нанесенными на твердую подложку. Если реагенты и (или) компоненты поставляются в форме сухого порошка, такой порошок можно растворить, добавив пригодный растворитель. Предполагается, что растворители, например, стерильная вода или подходящий физиологический раствор или буфер, могут также поставляться в другой емкости.

ПРИМЕРЫ

Конкретные примеры осуществления, описывающие настоящее изобретение, приводятся ниже в приведенных примерах, но их не следует рассматривать как ограничивающие сферу охвата изобретения.

Пример 1

На фиг. 1 приводится пример осуществления, который включает пермутированную инактивированную люциферазу, активность которой восстанавливается при воздействии протеазы TEV на содержащийся в молекуле сайт распознавания протеазы TEV. Как показано, первый белок сливается с протеазой. Пример 1 предполагает возможность применить активность протеазы TEV для восстановления активности пермутированной люциферазы, выступающей в качестве второго белка. Второй белок, как показано, сливаются с инактивированным пермутированным белком,

активирующим репортер, люциферазой. Сайт распознавания и расщепления протеазы (который распознается протеазой, слитой с рассматриваемым белком) вводят в пермутированный белок, активирующий репортер. Первый и второй белки сближают посредством третьей молекулы, которая модулирует взаимодействие между первым и вторым белками. Протеолиз пермутированного инактивированного белка, активирующего репортер, под действием находящейся поблизости слитой протеазы приводит к расщеплению с формированием двух фрагментов пермутированного белка, активирующего репортер, с тем чтобы регенерировать активный белок, активирующий репортер. Активность белка, активирующего репортер, может оцениваться с применением соответствующих реагентов и приборов.

Пермутированную люциферазу сконструировали посредством реорганизации N-терминальных аминокислот с 2 по 233 люциферазы светлячка и C-терминальных аминокислот с 234 по 550 в обратном порядке, прерванных сайтом распознавания протеазы TEV, ENLYFQX (SEQ ID NO:3). Расщепление на этом сайте приводит к восстановлению активности пермутированной люциферазы. В положении X может находиться любая аминокислота, которая определяет аффинность распознавания TEV протеазы и эффективность расщепления. Было показано, что изменение X позволяет модулировать ферментативную кинетику TEV. Аналогичные замещения аминокислот в других сайтах последовательности распознавания могут также изменить кинетику. Модулирование кинетики удобно для оптимизации, например, времени инкубации в процессе скрининга и фоновой активности, которая влияет на отношение сигнал/шум. Пермутированную люциферазу (luc234X233, где X является конкретной аминокислотой в N-терминальном окончании гептапептидного сайта расщепления TEV, SEQ ID NO:3) сливали затем с C-терминальным окончанием GPCR, ADRB2, с тем чтобы получить GPCR-пермутированную люциферазу, ADRB2-luc234X233, плазмиду экспрессии.

Пример 2

Человеческую слитую плазмиду β -аррестин-2-TEV сконструировали посредством слияния протеазы А вируса гравировки табака с C-терминальным окончанием β -аррестина-2. Все фрагменты ДНК получали с помощью ПЦР с использованием соответствующих матриц. Слитые гены GPCR-luc234X233 субклонировали в pcDNA3.1(+) в присутствии маркера селекции неомицина (Invitrogen), и слитые гены Arr-TEV субклонировали в pcDNA3.1(+) с маркером селекции зеоцина (Invitrogen № кат. 43-0018).

Пример 3

Клетки CHO-K1 трансфектировали совместно с ADRB2-luc234R233 (пример 1) и плазмидами Arr-TEV (пример 2) с использованием соответствующих наборов для стандартной трансфекции. Через сорок восемь часов после трансфекции клетки в течение 2 часов обрабатывали в присутствии или в отсутствие 10 мкМ агониста ADRB2, изопротеренола, к клеткам добавляли Bright-GLO™ или Steady-GLO™ (Promega) и с помощью соответствующего планшета-ридера люминесценции регистрировали относительную люминесценцию лизатов. В присутствии изопротеренола наблюдалось более чем трехкратное увеличение интенсивности люминесценции.

На фиг. 5 приводятся данные для экспрессии GPCR/пермутированной люциферазы в присутствии и в отсутствие Arr2-TEVp. При регистрации данных, приведенных на графике, конструкции вводили в клетки, но трансфектированные клетки не подвергали воздействию какого-либо модулятора. Поэтому данные свидетельствуют

о том, что в случае, если сайт расщепления содержит серин, регистрируется определенная спонтанная активность, но, по существу, фонового шума не наблюдается, если X — R или V. Как отмечалось на фиг. 6, если клетки, экспрессирующие сайт расщепления с R или V, подвергали воздействию агониста, наблюдался ответ. На фиг. 7 представлен дозозависимый эффект люциферазной активности в клетках, которые промежуточно или стабильно экспрессируют GPCR-luc234V233 и (или) Arr-TEV.

Пример 4

На фиг. 8 приводятся свидетельства того, что 5-часового или 1-часового инкубационного периода оказывается достаточно для анализа белок-белкового взаимодействия. Дозозависимый эффект четко представлен.

Плазмиду экспрессии слитого гена ADRB2-TEV сконструировали слиянием протеазы А вируса гравировки табака с С-терминальным концом ADRB2 и введением слитого гена в pcDNA3.1(+) с маркером селекции зеоцина (Invitrogen № кат. 43-0018). Все фрагменты ДНК получали с помощью ПЦР с использованием соответствующих матриц, известных специалистам в области.

Плазмиду экспрессии слитого гена β -аррестин-2-пермутированной люциферазы (Arr-luc234X233) сконструировали посредством слияния пермутированной люциферазы luc234X233 с С-терминальным концом β -аррестина-2. Сайтом расщепления протеазы TEV является ENLYFQ/X, (Rachel B. Kapust, et al. *Biochemical & Biophysical Research Communications*, 294 (2002) 949-955), где E и Q обычно инвариантны и где X может быть любой аминокислотой, хотя чаще всего в этом сайте присутствуют аминокислоты G и S. Расщепление происходит между остатками Q и X. X может определять эффективность расщепления. В некоторых примерах осуществления сайт расщепления протеазы TEV включали в структуру пермутированной люциферазы. Фон и отношение сигнал/шум можно улучшить с помощью простых стандартных экспериментов. Например, было установлено, что использование валина вместо глицина в сайте гидролиза X для TEV в некоторых приложениях обеспечивает снижение фона. Составленный слитый ген клонировали в pcDNA3.1(+) с маркером селекции неомицина (Invitrogen).

Клетки HEK293 трансфектировали совместно с плазмидами ADRB2-TEV и Arr-luc234V233, где последовательностью распознавания TEV является ENLYFQV (SEQ ID NO:12), с использованием соответствующих стандартных наборов для трансфекции. Через сорок восемь часов после трансфекции клетки в течение 1 и 5 часов обрабатывали различными концентрациями агониста ADRB2, изопротеренола, к клеткам добавляли Bright-GLO™ (Promega) и с помощью EnVison II™ регистрировали относительную люминесценцию частиц. Через 1 и через 5 часов после инкубации с изопротеренолом наблюдали зависимость от дозы интенсивность люминесценции.

Пример 5

На фиг. 9 в левой панели представлена индуцированная лигандом активность люциферазы в клетках HEK293, стабильно экспрессирующих слитые белки Arr-luc234V233 и промежуточную экспрессирующую слитые белки ADRB2-TEV. На правой панели отображена стабильная экспрессия конструкции аррестин - белок, активирующий репортер, и промежуточная экспрессия слитой 7TMR-протеазы в клетках CHO.

Стабильные линии клеток, экспрессирующих GPCR-luc234R233 или Arr-TEV, получали для клеток HEK293 или CHO. Для трансфекции использовали двадцать нг/лунку каждой ДНК в 12-луночной планшете с липофектаминол (Invitrogen) для

клеток HEK293 и TranIT-СНО.

В анализе per-luc стандартно использовали 384-луночный формат планшетов. Другие форматы планшетов считались допустимыми форматами. Клетки СНО, стабильно экспрессирующие GPCR-luc234R233 или Agg-TEV, наносили по 10000 клеток на лунку на поверхность обработанного тканевыми культурами 384-луночного белого аналитического планшета (Becton Dickinson). На следующий день клетки обрабатывали агонистом в концентрациях от 10 мкМ до 0,7 пМ (в последовательных разбавлениях 3:1, проводимых в свободной от сыворотки клеточной среде). Для измерения активности люциферазы использовали систему анализа люциферазы Steady-Glo (Promega). После 2 часов обработки агонистом среду отсасывали и в каждую ячейку добавляли 25 мкл аналитического реагента люциферазы. Значение относительных единиц люминесценции (RLU) определяли с помощью EnVision, универсального считывателя производства Perkin Elmer. Данные отображали на графике и анализировали с помощью программного обеспечения PRISM.

Клетки HEK293, стабильно экспрессирующие Agg-luc234V233, готовили селекцией по устойчивости к неомицину. Устойчивый к неомицину ген представлен в векторе pcDNA3.1 плазмиды экспрессии Agg-luc234V233.

Пример 6

На правой панели фиг. 9 приводятся данные для дозозависимого эффекта изопротеренола в линии СНО.

Стабильные линии клеток, экспрессирующих GPCR-luc234R233 или Agg-TEV, получали в клетках СНО. Один мкг каждой ДНК отбирали для трансфекции на каждую лунку в 12-луночном планшете с использованием набора для трансфекции TransfectIT-СНО (Mirus Bio, Мэдисон, Висконсин). У трансфектантов собирали единичные колонии в ходе селекции с использованием неомицина или зеомицина.

Стабильно экспрессирующие Agg-luc234V233 клетки трансфектировали плазмидой ADRB2-TEV с использованием стандартных наборов для трансфекции. Промежуточно экспрессирующие ADRB2-TEV и стабильно экспрессирующие Agg-luc234V233 клетки инкубировали с изопротеренолом в течение двух часов, а затем к клеткам добавляли реагент люциферазы Bright-GLO™. Дозозависимый эффект люциферазы регистрировали с помощью EnVison II.

Пример 7

На фиг. 10 приведена оценка результатов анализа GPCR Per-Luc с агонистом, частичным агонистом, антагонистом, а также ответы неспецифического эндогенного рецептора.

Стабильно экспрессирующие Agg-luc234V233 клетки HEK293 трансфектировали плазмидой ADRB2-TEV с использованием реагента трансфекции липофектамина 2000 (Invitrogen). Через сорок восемь часов после трансфекции клетки инкубировали с различными концентрациями известного агониста, изопротеренола; частичного агониста BRL37344 (Sigma-Aldrich); антагониста ICI118551 (ICI); антагониста ICI118551 с 200 нМ изопротеренола; а также агониста S1P (сфингозин-1-фосфат) эндогенных рецепторов EDG для клеток HEK293 в течение двух часов, и к клеткам добавляли реагент люциферазы Bright-GLO™. Дозозависимую активность люциферазы регистрировали с помощью EnVison II, как показано на фиг. 10.

Значения EC50 и IC50, полученные в результате анализа, были близки по величине к величинам, наблюдавшимся в анализах FLIPR и цАМФ. Эндогенный рецептор EDG в клетках HEK293 и его лиганд S1P не оказывали влияния на активность люциферазы,

тогда как в других методах анализа, например, FLIPR и цАМФ, действительно регистрировались положительные сигналы. Агонист изопротеренол обеспечивал генерацию ответа. Для частичного агониста BRL37344 отмечали поэтапный ответ. Антагонист ICI18551 ингибировал изопротеренол, но сам по себе не проявлял активности. Поэтому предлагаемый метод анализа является специфичным и, как показано на фиг. 10 (вместе с другими данными для сопоставления), характеризуется более редкими и менее интенсивными ложноположительными сигналами.

Пример 8

На фиг. 14 приводится пример, в котором пермутированную люциферазу конструировали клонированием N-терминальных аминокислот с 2 по 456 люциферазы светлячка за C-терминальными аминокислотами с 234 по 550, с сайтом распознавания протеазы TEV, ENLYFQX, где вместо X использовали V. Пермутированную люциферазу (luc234V456) сливали с C-терминальным концом GPCR, ADRB2, с тем чтобы получить конструкцию GPCR-пермутированной люциферазы, плазмиду экспрессии ADRB2-luc234V456.

Все фрагменты ДНК были получены с помощью ПЦП с использованием соответствующих матриц. Слитые гены ADRB2-luc234V456 клонировали в pcDNA3.1(+) с маркером селекции неомицина (Invitrogen).

Клетки CHO-K1 трансфектировали совместно с ADRB2-luc234V456 и плазмидами Arr-TEV с использованием соответствующих наборов для стандартной трансфекции. Через сорок восемь часов после трансфекции клетки в течение 2 часов обрабатывали в присутствии или в отсутствие 10 мкМ агониста ADRB2, изопротеренола, к клеткам добавляли Bright-GLO™ или Steady-GLO™ (Promega) и с помощью соответствующего планшета-ридера люминесценции регистрировали относительную люминесценцию. Регистрировали восстановленную активность люциферазы в ответ на различные дозы изопротеренола.

Клетки HEK293, стабильно экспрессирующие Arr-luc234V233, приготавливали селекцией по устойчивости к неомицину. Устойчивый к неомицину ген представлен в векторе pcDNA3 плазмиды экспрессии Arr-luc234V233. Регистрировали активность люциферазы в ответ на воздействие агониста.

Пример 9

На фиг. 13 приведена зависимость от дозы для обратного агониста V2.

Для данного примера клетки HEK293, стабильно экспрессирующие Arr-luc234V233, трансфектировали плазмидой V2-TEV с использованием реагента трансфекции липофектамина 2000 (Invitrogen). Через сорок восемь часов после трансфекции клетки в течение двух часов инкубировали с различными концентрациями соединения SR121463 (Sanofi Recherche, Тулуза, Франция), которое считается антагонистом, с использованием стандартных методов анализа. К клеткам добавляли реагент люциферазы Bright-GLO™. Дозозависимую активность люциферазы регистрировали с помощью EnVison II. То есть возрастающие уровни интенсивности люминесценции наблюдались при возрастании количеств SR121463, которое можно более точно отнести к обратным агонистам.

В данном анализе обратный агонист вел себя как агонист, подобно другим обратным агонистам. Известно, что обратный агонист в состоянии блокировать путь передачи сигнала G-белка для V2, одновременно стимулируя β -аррестин-опосредованную активацию MAPK (Azzi et al., PNAS, 2003, 100:11406-11411). Поэтому метод анализа настоящего изобретения в состоянии указывать на отличительные активные конформации для рецепторов, связанных с G-белками.

Напротив, в классических системах анализа обратные агонисты GPCR ведут себя как антагонисты. Это связано с тем, что обратные агонисты, по-видимому, связываются с неактивными конформациями GPCR для передачи сигнала G-белка и стабилизируют их. Вместе с тем, некоторые обратные агонисты стабилизируют неактивную форму GPCR для передачи сигнала G-белка, а также способствуют захвату β -аррестина в GPCR для активации пути передачи сигнала через β -аррестин.

Пример 10

На фиг. 6 приведены данные по активности люциферазы, индуцированной агонистом.

В данном примере пермутированную люциферазу сконструировали посредством реорганизации N-терминальных аминокислот с 2 по 233 люциферазы светлячка и C-терминальных аминокислот с 234 по 550 в обратном порядке, прерванных сайтом распознавания протеазы TEV, ENLYFQX. В положении X может находиться любая аминокислота. Известно, что аминокислоты в данном положении определяют аффинность распознавания протеазы TEV и эффективность расщепления. Пермутированная люцифераза (luc234X233) затем была слита с C-терминальным концом GPCR, то есть ADRB2, чтобы получить GPCR-пермутированную люциферазу, то есть плазмиду экспрессии ADRB2-luc234X233.

Человеческую слитую плазмиду β -аррестин-2-TEV конструировали посредством слияния протеазы А вируса гравировки табака с C-терминальным окончанием β -аррестина-2. Фрагменты ДНК получали с помощью ПЦР с использованием соответствующих матриц. Слитые гены GPCR-luc234X233 субклонировали в pcDNA3.1(+) в присутствии маркера селекции неомицина (Invitrogen), и слитый ген Arg-TEV субклонировали в pcDNA3.1(+) с маркером селекции зеоцина (Invitrogen № кат. 43-0018).

Клетки CHO-K1 трансфектировали совместно с ADRB2-luc234R233 и плазмидами Arg-TEV с использованием наборов, подходящих для стандартной трансфекции. Через сорок восемь часов после трансфекции клетки в течение 2 часов обрабатывали в присутствии или в отсутствие 10 мкМ агониста ADRB2, изопротеренола, к клеткам добавляли Bright-GLO™ или Steady-GLO™ (Promega) и с помощью соответствующего планшета-ридера люминесценции регистрировали относительную люминесценцию. В присутствии изопротеренола наблюдалось более чем трехкратное увеличение интенсивности люминесценции.

Пример 11

На фиг. 12 приведены результаты анализа для агонистов, антагонистов и обратных агонистов с применением методов анализа настоящего изобретения (левая панель) и других методов анализа (правая панель). На двух графиках отображена дифференциация и эффекты противодействия агониста, антагониста и обратного агониста. Предлагаемый метод анализа обеспечивает высокую специфическую активность.

Пример 12

На фиг. 7 приводятся клетки CHO с ADRB2-пермутированной люциферазой и Arg-TEV.

Для данных в левой панели ADRB2-luc234V233 конструировали таким образом, чтобы содержать сайт распознавания TEV, ENLYFQV. Клетки CHO-K1 трансфектировали совместно с ADRB2-luc234V233 и плазмидами Arg-TEV с использованием соответствующих наборов для стандартной трансфекции. Через сорок восемь часов после трансфекции клетки в течение 2 часов обрабатывали различными

концентрациями агониста ADRB2, изопротеренола, к клеткам добавляли Bright-GLO™ или Steady-GLO™ (Promega) и с помощью соответствующего планшета-ридера люминесценции регистрировали относительную люминесценцию.

Пример 13

В правой панели на фиг. 7 приведены сводные данные с использованием стабильно трансфектированных клеток с различными сайтами расщепления. Эти результаты сходны с приведенными на левой панели результатами. Таким образом, две конструкции GPCR-люциферазы с различными сайтами расщепления реагировали на агониста.

Пример 14

На фиг. 6 приведены данные по индуцированной агонистом активности сигнала при сопоставлении X = R и X = V. Результаты аналогичны, что указывает на возможность свободного варьирования X.

В данном примере пермутированную люциферазу конструировали посредством реорганизации N-терминальных аминокислот с 2 по 233 люциферазы светлячка и C-терминальных аминокислот с 233 по 550 в обратном порядке прерванных сайтом распознавания протеазы TEV, ENLYFQ/X. В положении X может находиться любая аминокислота, которая определяет аффинность распознавания TEV протеазы и эффективность расщепления. Показаны V и R. Пермутированную люциферазу (luc234X233) затем слили с C-терминальным концом GPCR, то есть ADRB2, чтобы получить GPCR-пермутированную люциферазу, то есть плазмиду экспрессии ADRB2-luc234X233.

В данном примере человеческую слитую плазмиду β-аррестин-2-TEV конструировали посредством слияния протеазы А вируса гравировки табака с C-терминальным окончанием β-аррестина-2. Все фрагменты ДНК получали с помощью ПЦР с использованием соответствующих матриц. Слитые гены GPCR-luc234X233 субклонировали в pcDNA3.1(+) в присутствии маркера селекции неомицина (Invitrogen), и слитые гены Arg-TEV субклонировали в pcDNA3.1(+) с маркером селекции зеоцина (Invitrogen № кат. 43-0018).

Клетки CHO-K1 трансфектировали совместно с ADRB2-luc234R233 и плазмидами Arg-TEV с использованием соответствующих наборов для стандартной трансфекции. Через 48 часов после трансфекции клетки в течение 2 часов обрабатывали в присутствии или в отсутствие 10 мкМ агониста ADRB2, к клеткам добавляли Bright-GLO™ или Steady-GLO™ (Promega) и с помощью соответствующего планшета-ридера люминесценции регистрировали относительную люминесценцию частиц. В присутствии изопротеренола наблюдалось более чем трехкратное увеличение уровней интенсивности люминесценции.

Пример 15

На левой панели фиг. 11 приведены результаты для агониста 8-AVP в клетках, которые обеспечивают промежуточную экспрессию V2-TEV.

В данном примере клетки HEK293, стабильно экспрессирующие Arg-luc234V233, трансфектировали плазмидой V2-TEV с использованием реагента трансфекции липофектамина 2000 (Invitrogen). Через 48 часов клетки инкубировали в течение двух часов с различными концентрациями агониста 8-AVP (Arg⁸ вазопрессин, известный агонист рецепторов вазопрессина V2), и к клеткам добавляли реагент люциферазы Bright-GLO™. Дозозависимую активность люциферазы регистрировали с помощью EnVison II.

Пример 16

Клетки НЕК293, стабильно экспрессирующие Arr-luc234V233, трансфектировали плазмидой V2-TEV с использованием реагента трансфекции липофектамина 2000 (Invitrogen). Через 48 часов клетки инкубировали в течение двух часов с различными концентрациями обратного агониста, и к клеткам добавляли реагент люциферазы Bright-GLO™. Дозозависимую активность люциферазы регистрировали с помощью EnVison II.

В данном методе анализа обратный агонист вел себя как агонист. Известно, что некоторые обратные агонисты в состоянии блокировать путь передачи сигнала G-белка для V2, но стимулируют β -аррестин-опосредованную активацию MAPK (Azzi et al., *PNAS*, 2003, 100:11406-11411). Поэтому настоящий метод анализа в состоянии оценивать отличительные активные конформации для рецепторов, связанных с G-белками.

Пример 17

На правой панели фиг. 11 приводятся данные дозозависимой активности люциферазы в результате воздействия обратного агониста V2 посредством стимулирования взаимодействия β -аррестина с рецептором V2.

В данном примере клетки НЕК293, стабильно экспрессирующие Arr-luc234V233, трансфектировали плазмидой V2-TEV с использованием реагента трансфекции липофектамина 2000 (Invitrogen). Через 48 часов клетки инкубировали в течение двух часов с различными концентрациями обратного агониста, и к клеткам добавляли реагент люциферазы Bright-GLO™. Дозозависимую активность люциферазы регистрировали с помощью EnVison II.

Другие отличительные особенности настоящего изобретения будут очевидны квалифицированному специалисту и не нуждаются в повторении в настоящем документе. Квалифицированный специалист в области в состоянии внести различные модификации, не затрагивающие основной идеи и охвата настоящего изобретения.

Все ссылки, цитируемые в настоящем документе, в силу ссылки на них полностью включаются в настоящий документ.

Формула изобретения

1. Способ идентификации соединения, модулирующего белок-белковое взаимодействие между первым белком и вторым белком, который включает:

i) обеспечение первого белка, присоединенного к расщепленному и реорганизованному белку, активирующему репортер, где белок, активирующий репортер, содержит сайт расщепления протеазой, который расположен между двумя частями белка, активирующего репортер, где указанные две части белка, активирующего репортер, находятся в реорганизованном порядке;

ii) обеспечение второго белка, присоединенного к протеазе, где указанная протеаза способна осуществлять расщепление по сайту расщепления в указанном белке, активирующем репортер, что приводит к реорганизации указанных двух частей белка, активирующего репортер, чем активируется указанный белок, активирующий репортер; и где ассоциация первого белка со вторым белком приводит к расщеплению белка, активирующего репортер, протеазой;

iii) обеспечение репортера, сигнал которого изменяется активностью указанного белка, активирующего репортер;

iv) обеспечение тестируемого соединения;

v) обеспечение возможности расщепления указанного сайта расщепления указанной протеазой; и

vi) мониторинг сигнала;

причем изменение указанного сигнала свидетельствует о наличии указанного белок-белкового взаимодействия.

2. Способ по п.1, где, по меньшей мере, один из первого белка и второго белка представляет собой белок, связанный с мембраной.

3. Способ по п.1, где, по меньшей мере, один из первого белка и второго белка представляет собой цитоплазматический белок.

4. Способ по п.1, где, по меньшей мере, один из первого белка и второго белка модифицируют, с целью повышения его аффинности связывания к другому белку.

5. Способ по п.1, где первый белок выбран из группы, состоящей из: рецептора, связанного с G-белком, β -адренергического рецептора, рецептора аргинин-вазопрессина-2, рецептора серотонина-1a, мускаринового рецептора ацетилхолина m2, рецептора хемокина-5, рецептора дофамина-D2, каппа-опиоидного рецептора, α 1a-адренергического рецептора, рецептора инсулиноподобного фактора роста-1, рецептора эстрогена-1, рецептора эстрогена-2, рецептора frizzled, рецептора эпидермального фактора роста, рецептора тирозинкиназы, рецептора серин/треонинкиназы, рецептора трансформирующего фактора роста- β , активина, рецептора костного морфогенетического белка, рецептора цитокина, рецептора интерферона, рецептора интерлейкина, рецептора эритропоэтина, рецептора фактора некроза опухоли, рецептора лептина, рецептора фактора, стимулирующего гранулоцитарную колонию, и рецептора фактора, стимулирующего гранулоцитарную макрофагальную колонию.

6. Способ по п.1, где второй белок выбран из группы, состоящей из аррестина и связывающего белка Dishevelled.

7. Способ по п.1, где протеаза выбрана из группы, состоящей из: протеазы ядерного включения вируса гравировки табака А (TEV), энтерокиназы, протеазы фактора Ха, тромбина, протеазы PureAct™, протеазы Clean Cut™, протеазы PreScission™, серин/треониновой протеазы, тиол-протеазы, аспартат-протеазы, металлопротеиназы, аминоксипептидазы, дипептидазы, трипептидазы, карбоксипептидазы и пептидилпептидазы.

8. Способ по п.1, где белок, активирующий репортер, является самоактивирующимся.

9. Способ по п.1, где белок, активирующий репортер, представляет собой репортер.

10. Способ по п.1, где белок, активирующий репортер, представляет собой фермент.

11. Способ по п.1, где белок, активирующий репортер, представляет собой белок, который вызывает изменение флуоресценции репортера.

12. Способ по п.1, где флуоресцентный белок представляет собой репортер.

13. Способ по п.1, где белок, активирующий репортер, выбран из группы, состоящей из: люциферазы, люциферазы Gaussia, люциферазы Renilla, флуоресцентного белка, зеленого флуоресцентного белка, белка DsRed, пероксидазы, β -галактозидазы, β -лактамазы.

14. Способ по п.1, где первый белок образует слитый белок с белком, активирующим репортер.

15. Способ по п.1, где репортер выбран из группы, состоящей из: субстрата галактозидазы, субстрата пероксидазы, субстрата люциферазы и люциферина.

16. Способ по п.1, где сигнал от репортера выбран из группы, состоящей из люминесценции и изменения цвета.

17. Способ по п.1, где белок-белковое взаимодействие требует транслокации

первого белка или второго белка в клеточный компартмент или органеллу.

18. Способ по п.1, где способ дополнительно включает обеспечение молекулы, о которой известно, что она модулирует указанное белок-белковое взаимодействие, где тестируемое соединение модулирует взаимодействие указанной молекулы с указанным белок-белковым взаимодействием.

19. Система анализа, включающая:

i) первый белок, прикрепленный к разделенному и реорганизованному белку, активирующему репортер, где белок, активирующий репортер, содержит сайт расщепления протеазой, который расположен между двумя частями белка, активирующего репортер, где указанные две части белка, активирующего репортер, находятся в реорганизованном порядке;

ii) второй белок, присоединенный к протеазе, где указанная протеаза способна осуществлять расщепление по сайту расщепления в указанном белке, активирующем репортер, что приводит к реорганизации указанных двух частей белка, активирующего репортер, чем активируется указанный белок, активирующий репортер; и

iii) репортер, сигнал которого меняется за счет активности указанного белка, активирующего репортер;

где ассоциация указанного первого белка со вторым указанным белком приводит к расщеплению указанного белка, активирующего репортер, протеазой.

20. Система анализа по п.19, где, по меньшей мере, один из первого белка и второго белка представляет собой белок, связанный с мембраной.

21. Система анализа по п.19, где, по меньшей мере, один из первого белка и второго белка представляет собой цитоплазматический белок.

22. Система анализа по п.19, где, по меньшей мере, один из первого белка и второго белка модифицируют, с целью повышения его аффинности связывания к другому белку.

23. Система анализа по п.19, где первый белок выбран из группы, состоящей из: рецептора, связанного с G-белком, β -адренергического рецептора, рецептора аргинин-вазопрессина-2, рецептора серотонина-1a, мускаринового рецептора ацетилхолина m2, рецептора хемокина-5, рецептора дофамина-D2, каппа-опиоидного рецептора, α 1a-адренергического рецептора, рецептора инсулиноподобного фактора роста-1, рецептора эстрогена-1, рецептора эстрогена-2, рецептора frizzled, рецептора эпидермального фактора роста, рецептора тирозинкиназы, рецептора серин/треонинкиназы, рецептора трансформирующего фактора роста- β , активина, рецептора костного морфогенетического белка, рецептора цитокина, рецептора интерферона, рецептора интерлейкина, рецептора эритропоэтина, рецептора фактора некроза опухоли, рецептора лептина, рецептора фактора, стимулирующего гранулоцитарную колонию, и рецептора фактора, стимулирующего гранулоцитарную макрофагальную колонию.

24. Система анализа по п.19, где второй белок выбран из группы, состоящей из аррестина и связывающего белка Dishevelled.

25. Система анализа по п.19, где протеаза выбрана из группы, состоящей из: протеазы ядерного включения вируса гравировки табака А (TEV), энтерокиназы, протеазы фактора Ха, тромбина, протеазы PureAct™, протеазы Clean Cut™, протеазы PreScission™, серин/треониновой протеазы, тиол-протеазы, аспартат-протеазы, металлопротеиназы, аминопептидазы, дипептидазы, трипептидазы, карбоксипептидазы и пептидилпептидазы.

26. Система анализа по п.19, где белок, активирующий репортер, является самоактивирующимся.

27. Система анализа по п.19, где белок, активирующий репортер, представляет собой репортер.

5 28. Система анализа по п.19, где белок, активирующий репортер, представляет собой фермент.

29. Система анализа по п.19, где белок, активирующий репортер, представляет собой белок, который вызывает изменение флуоресценции репортера.

10 30. Система анализа по п.19, где флуоресцентный белок представляет собой репортер.

31. Система анализа по п.19, где белок, активирующий репортер, выбран из группы, состоящей из: люциферазы, люциферазы *Gaussia*, люциферазы *Renilla*, флуоресцентного белка, зеленого флуоресцентного белка, белка *DsRed*, пероксидазы, β -галактозидазы, β -лактамазы.

32. Система анализа по п.19, где первый белок образует слитый белок с белком, активирующим репортер.

33. Система анализа по п.19, где репортер выбран из группы, состоящей из: субстрата галактозидазы, субстрата пероксидазы, субстрата люциферазы и люциферина.

34. Система анализа по п.19, где сигнал выбран из группы, состоящей из люминесценции и изменения цвета.

25

30

35

40

45

50

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> Eishingdrelo, Haifeng
Cai, Jidong
Wright, Paul
Weissensee, Paul

<120> ИДЕНТИФИКАЦИЯ МОЛЕКУЛ, МОДУЛИРУЮЩИХ БЕЛОК-БЕЛКОВОЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ

<130> US2006/244

<160> 15

<170> PatentIn версия 3.3

<210> 1
<211> 27
<212> ДНК
<213> Вирус гравировки табака

<400> 1
ggatccgcag agttgatcat catagtc 27

<210> 2
<211> 31
<212> ДНК
<213> Вирус гравировки табака

<400> 2
gggccctat tgcgagtaca ccaattcatt c 31

<210> 3
<211> 7
<212> РРТ
<213> Вирус гравировки табака

<220>
<221> САЙТ
<222> (7)..(7)
<223> Пептиды, изменяющие распознавание протеазы TEV. X - S, R или V на фиг. 5.

<400> 3

Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Xaa
1 5

<210> 4
<211> 1237
<212> ДНК
<213> Человеческий аденовирус, тип 1

<400> 4
gggcaaccccg ggaacggcag cgccttcttg ctggcaccca atagaagcca tgcgccggac 60

cacgacgtca cgcagcaaag ggacgaggtg tgggtggtgg gcatgggcat cgtcatgtct 120
ctcatogtcc tggccatcgt gtttggcaat gtgctgggtca tcacagccat tgccaagttc 180
gagcgtctgc agacggtcac caactacttc atcacttcac tggcctgtgc tgatctggtc 240
atgggcctgg cagtggtgcc ctttggggcc gcccatatcc ttatgaaaat gtggactttt 300
ggcaacttct ggtgcgagtt ttggacttcc attgatgtgc tgtgctgcac ggccagcatt 360
gagaccctgt gcgtgatcgc agtggatcgc tacttttgcca ttacttcacc tttcaagtac 420
cagagcctgc tgaccaagaa taaggcccgg gtgatcattc tgatgggtgtg gattgtgtca 480
ggccttacct ccttcttgcc cattcagatg cactgggtacc gggccacca ccaggaagcc 540
atcaactgct atgccaatga gacctgctgt gacttcttca cgaaccaagc ctatgccatt 600
gcctcttcca tcgtgtcctt ctacgttccc ctgggtgatca tggctctcgt ctactccagg 660
gtctttcagg aggccaaaag gcagctccag aagattgaca aatctgaggg ccgcttccat 720
gtccagaacc ttagccaggt ggagcaggat gggcggacgg ggcatggact ccgcagatct 780
tccaagttct gcttgaagga gcacaaagcc ctcaagacgt taggcatcat catgggact 840
ttcaccctct gctggctgcc cttcttcatc gttaacattg tgcatgtgat ccaggataac 900
ctcatccgta aggaagtta catcctccta aattggatag gctatgtcaa ttctggtttc 960
aatcccctta tctactgccg gagcccagat ttcaggattg ccttccagga gcttctgtgc 1020
ctgctcaggt cttctttgaa ggcctatggg aatggctact ccagcaacgg caacacaggg 1080
gagcagagtg gatatcacgt ggaacaggag aaagaaaata aactgctgtg tgaagacctc 1140
ccaggcacgg aagactttgt gggccatcaa ggtactgtgc cttagcgataa cattgattca 1200
caagggagga attgtagtac aaatgactca ctgctgg 1237

<210> 5
<211> 1110
<212> ДНК
<213> homo sapiens

<400> 5
ctcatggcgt ccaccacttc cgctgtgcct gggcatccct ctctgcccag cctgcccagc 60
aacagcagcc aggagaggcc actggacacc cgggaccgc tgctagcccg ggcggagctg 120
gcgctgctct ccatagtctt tgtggctgtg gccctgagca atggcctggt gctggcggcc 180
ctagctcggc ggggccggcg gggccactgg gcaccatac acgtcttcat tggccacttg 240
tgcttgccg acctggcctg ggctctgttc caagtgtgc cccagctggc ctggaaggcc 300

accgaccgct tccgtgggcc agatgccctg tgctcgggccg tgaagtatct gcagatggtg 360
 ggcattgatg cctcctccta catgatcctg gccatgacgc tggaccgcca ccgtgccatc 420
 tgccgtccca tgctggcgta ccgccatgga agtggggctc actggaaccg gccggtgcta 480
 gtggcttggg ccttctcgct ccttctcagc ctgccccagc tcttcatctt cccccagcgc 540
 aacgtggaag gtggcagcgg ggtcactgac tgctgggcct gctttgcgga gccctggggc 600
 cgctgcacct atgtcacctg gattgccctg atgggtgttcg tggcacctac cctgggtatc 660
 gccgcctgcc aggtgctcat cttccgggag attcatgccca gtctggtgcc agggccatca 720
 gagaggcctg gggggcgccg caggggacgc cggacaggca gccccggtga gggagcccac 780
 gtgtcagcag ctgtggccaa gactgtgagg atgacgctag tgattgtggt cgtctatgtg 840
 ctgtgctggg cacccttctt cctggtgcag ctgtgggccg cgtgggaccg ggaggcacct 900
 ctggaagggg ccccccttgt gctactcatg ttgctggcca gcctcaacag ctgcaccaac 960
 ccctggatct atgcatctt cagcagcagc gtgtcctcag agctgcgaag cttgctctgc 1020
 tgtgcccggg gacgcacccc acccagcctg ggtccccaag atgagtcctg caccaccgcc 1080
 agctcctccc tggccaagga cacttcatcg 1110

<210> 6
 <211> 951
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> люцифераза

<400> 6
 gatactgcga ttttaagtgt tgttccattc catcacggtt ttggaatggt tactacactc 60
 ggatatttga tatgtggatt togagtcgtc ttaatgtata gatttgaaga agagctgttt 120
 ctgaggagcc ttcaggatta caagattcaa agtgcgctgc tggtgccaac cctattctcc 180
 ttcttcgcca aaagcactct gattgacaaa tacgatttat ctaatttaca cgaaattgct 240
 tctggtggcg ctccccctctc taaggaagtc ggggaagcgg ttgccaagag gttccatctg 300
 ccaggatca ggcaaggata tgggctcact gagactacat cagctattct gattacaccc 360
 gaggggatg ataaaccggg cgcggctcgg aaagttgttc cattttttga agcgaaggtt 420
 gtggatctgg ataccgggaa aacgctgggc gttaatcaaa gaggcgaact gtgtgtgaga 480
 ggtcctatga ttatgtccgg ttatgtaaac aatccggaag cgaccaacgc cttgattgac 540
 aaggatggat ggctacattc tggagacata gcttactggg acgaagacga acacttcttc 600

atcgttgacc gcctgaagtc tctgattaag tacaaaggct atcaggtggc toccogctgaa 660
 ttggaatcca tcttgctcca acaccccaac atcttcgacg caggtgtcgc aggttctccc 720
 gacgatgacg ccggtgaact tcccgccgcc gttgttgttt tggagcacgg aaagacgatg 780
 acggaaaaag agatcgtgga ttacgtcgcc agtcaagtaa caaccgcgaa aaagttgcgc 840
 ggaggagtgt tgtttgtgga cgaagtaccg aaaggtctta ccggaaaact cgacgcaaga 900
 aaaatcagag agatcctcat aaaggccaag aagggcggaa agatcgccgt g 951

<210> 7
 <211> 696
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> люцифераза

<400> 7
 gaagacgсса aaaacataaa gaaaggcccc gcgccattct atccgctgga agatggaacc 60
 gctggagagc aactgcataa ggctatgaag agatacgccc tggttcctgg aacaattgct 120
 tttacagatg cacatatcga ggtggacatc acttacgctg agtacttcga aatgtccggt 180
 cggttggcag aagctatgaa acgatatggg ctgaatacaa atcacagaat cgtcgtatgc 240
 agtgaaaact ctcttcaatt ctttatgccg gtgttggggc cgttatttat cggagttgca 300
 gttgcgcccc cgaacgacat ttataatgaa cgtgaattgc tcaacagtat gggcatttcg 360
 cagcctaccg tgggtgtcgt ttccaaaaag gggttgcaaa aaattttgaa cgtgcaaaaa 420
 aagctcccaa tcatccaaaa aattattatc atggattcta aaacggatta ccagggattt 480
 cagtcgatgt acacgttcgt cacatctcat ctacotcccg gttttaatga atacgatttt 540
 gtgccagagt ctttcgatag ggacaagaca attgcaactga tcatgaactc ctctggatct 600
 actggtctgc ctaaagggtg cgctctgcct catagaactg cctgcgtgag attctcgcac 660
 gccagagatc ctatTTTTGG caatcaaatc attccg 696

<210> 8
 <211> 1363
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> люцифераза

<400> 8
 gaagacgсса aaaacataaa gaaaggcccc gcgccattct atccgctgga agatggaacc 60

gctggagagc aactgcataa ggctatgaag agatacgcgc tggttcctgg aacaattgct 120
 tttacagatg cacatatcga ggtggacatc acttacgctg agtacttcga aatgtccggt 180
 cggttggcag aagctatgaa acgatatggg ctgaatacaa atcacagaat cgtcgtatgc 240
 agtgaaaact ctcttcaatt ctttatgccg gtggtggggc cgttatttat cggagttgca 300
 gttgcgcccc cgaacgacat ttataatgaa cgtgaattgc tcaacagtat gggcatttcg 360
 cagcctaccg tgggtttcgt ttccaaaaag gggttgcaaa aaattttgaa cgtgcaaaaa 420
 aagctcccaa tcatccaaaa aattattatc atggattcta aaacggatta ccagggattt 480
 cagtcgatgt acacgttcgt cacatctcat ctacctccg gttttaatga atacgatattt 540
 gtgccagagt ccttcgatag ggacaagaca attgcactga tcatgaactc ctctggatct 600
 actggtctgc ctaaagggtg cgctctgcct catagaactg cctgcgtgag attctcgcac 660
 gccagagatc ctatTTTTGG caatcaaatc attccggata ctgcgatattt aagtgttggt 720
 ccattccatc acggttttgg aatgtttact aactcggat atttgatag tggatttcga 780
 gtogtcttaa tgtatagatt tgaagaagag ctgtttctga ggagccttca ggattacaag 840
 attcaaagtg cgctgctggt gccaaccta ttctccttct tcgccaaaag cactctgatt 900
 gacaaatacg atttatctaa ttacacgaa attgcttctg gtggcgctcc cctctctaag 960
 gaagtcgggg aagcggttgc caagaggtc catctgccag gtatcaggca aggatatggg 1020
 ctactgaga ctacatcagc tattctgatt acaccgagg gggatgataa accgggcgcg 1080
 gtcggtaaag ttgtccatt ttttgaagcg aaggttggtg atctggatac cgggaaaacg 1140
 ctgggcgtta atcaaagagg cgaactgtgt gtgagaggtc ctatgattat gtccggttat 1200
 gtaaacaatc cggaagcgac caacgccttg attgacaagg atggatggct acattctgga 1260
 gacatagctt actgggacga agacgaacac ttcttcatcg ttgaccgcct gaagtctctg 1320
 attaagtaca aaggctatca ggtggctccc gctgaattgg aat 1363

<210> 9
 <211> 726
 <212> ДНК
 <213> вирус гравировки табака

<400> 9
 ggagaaagct tgtttaagg accacgtgat tacaaccga tatcgagcac catttgcac 60
 ttgacgaatg aatctgatgg gcacacaaca togttgatg gtattggatt tggcccttc 120
 atcattaca acaagcactt gtttagaaga aataatggaa cactgttggt ccaatcacta 180

catggtgtat tcaaggtcaa gaacaccacg actttgcaac aacacctcat tgatgggagg 240
gacatgataa ttattcgcat gcctaaggat ttcccacat ttcctcaaaa gctgaaattt 300
agagagccac aaaggaaga gcgcatatgt cttgtgacaa ccaacttcca aactaagagc 360
atgtctagca tgggtgcaga cactagttgc acattccctt catctgatgg catattctgg 420
aagcattgga ttcaaaccaa ggatgggcag tgtggcagtc cattagtatc aactagagat 480
gggttcattg ttggtataca ctgagcatcg aatttcacca acacaaaca ttatttcaca 540
agcgtgccga aaaacttcat ggaattgttg acaaatcagg aggcgcagca gtgggttagt 600
ggttggcgat taaatgctga ctgagtattg tgggggggccc ataaagtttt catgagcaaa 660
cctgaagagc cttttcagcc agttaaggaa gcgactcaac tcatgaatga attggtgtac 720
tcgcaa 726

<210> 10
<211> 7
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Сайт распознавания TEV

<400> 10

Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Ser
1 5

<210> 11
<211> 21
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Сайт распознавания для протеазы TEV

<400> 11
gagaacstgt acttccaag c 21

<210> 12
<211> 7
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Сайт распознавания для протеазы TEV

<400> 12

Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Val
 1 5

<210> 13
 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> ДНК для сайта расщепления /V

<400> 13
 gagaacstgt acttccaggt c

21

<210> 14
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Сайт распознавания

<400> 14

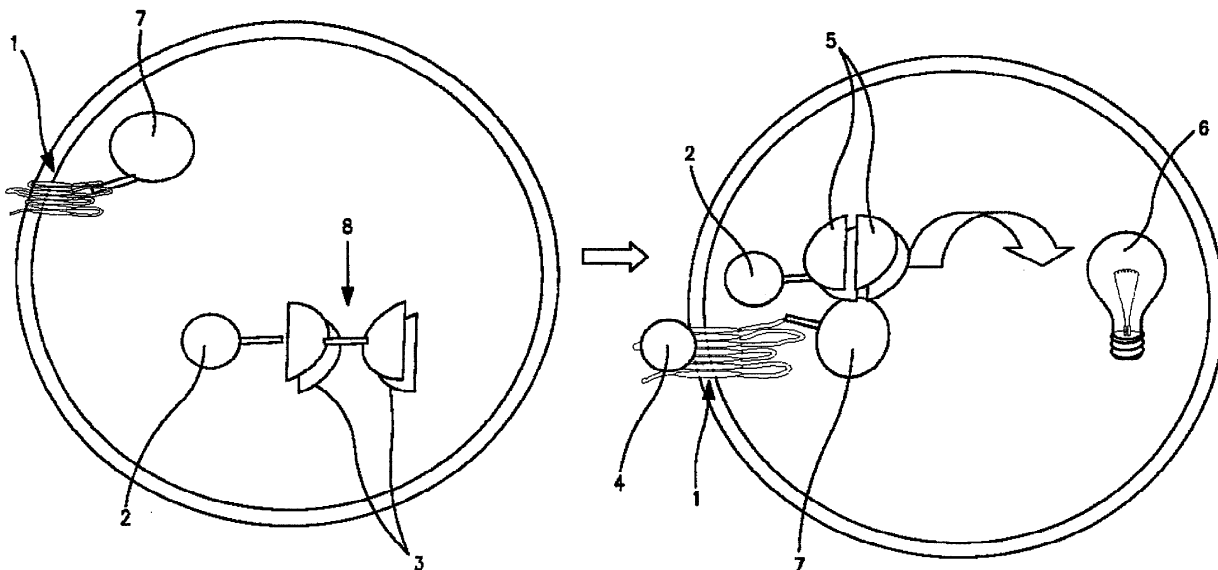
Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Arg
 1 5

<210> 15
 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

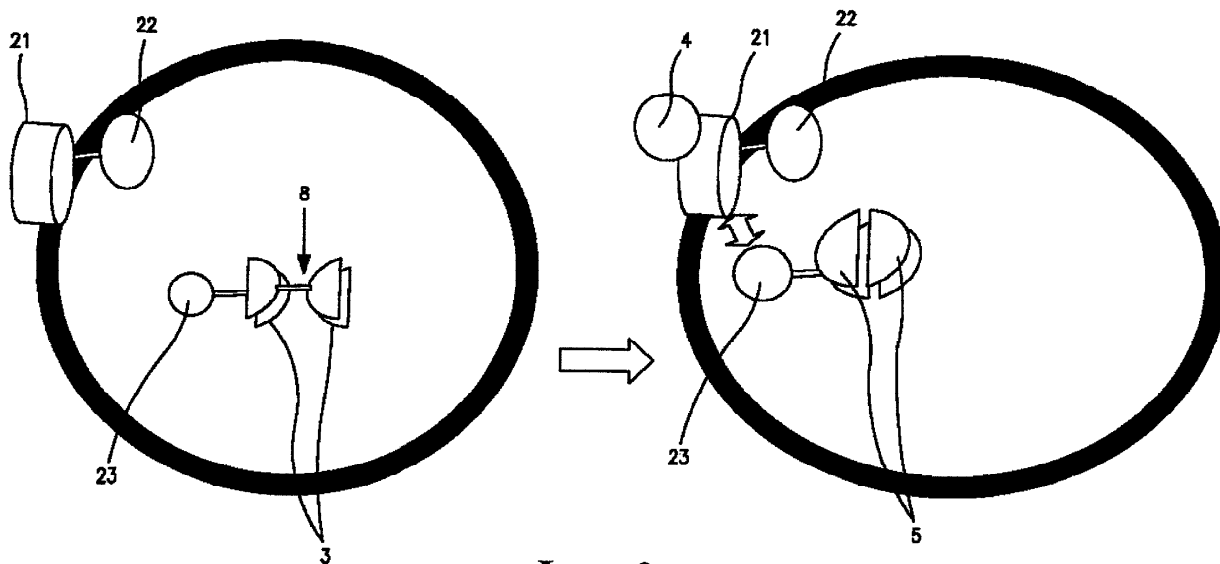
<220>
 <223> Сайт распознавания

<400> 15
 gagaacstgt acttccagcg c

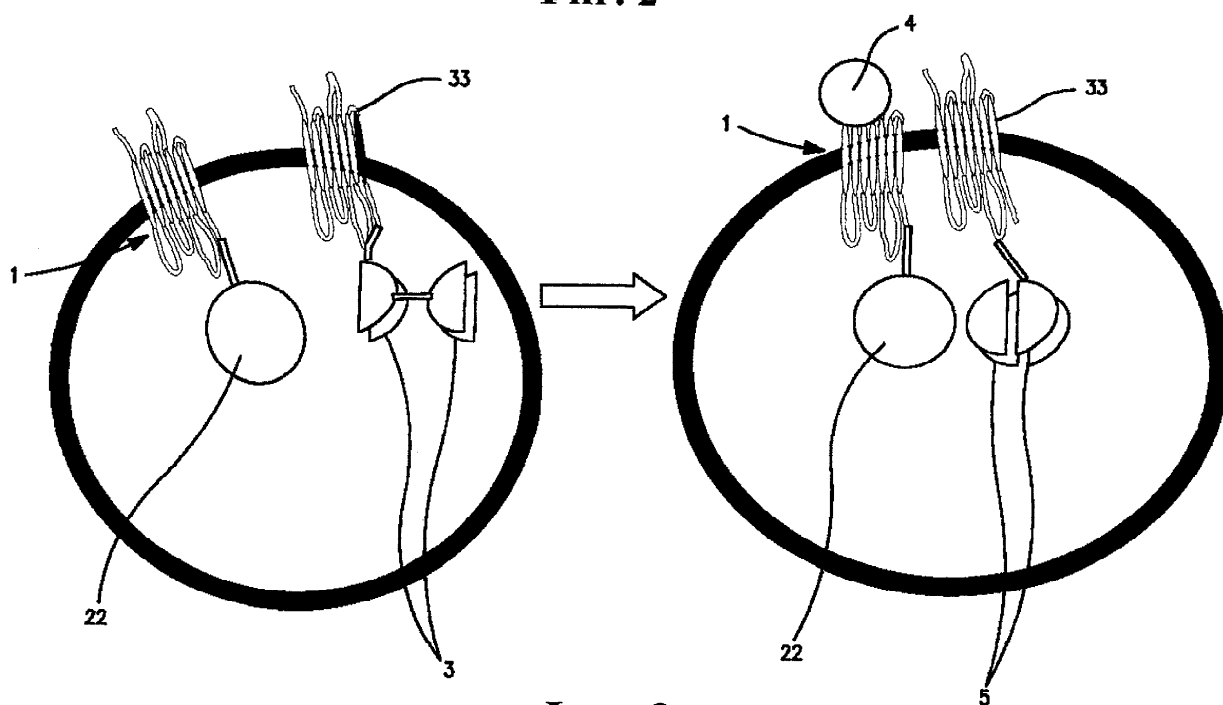
21



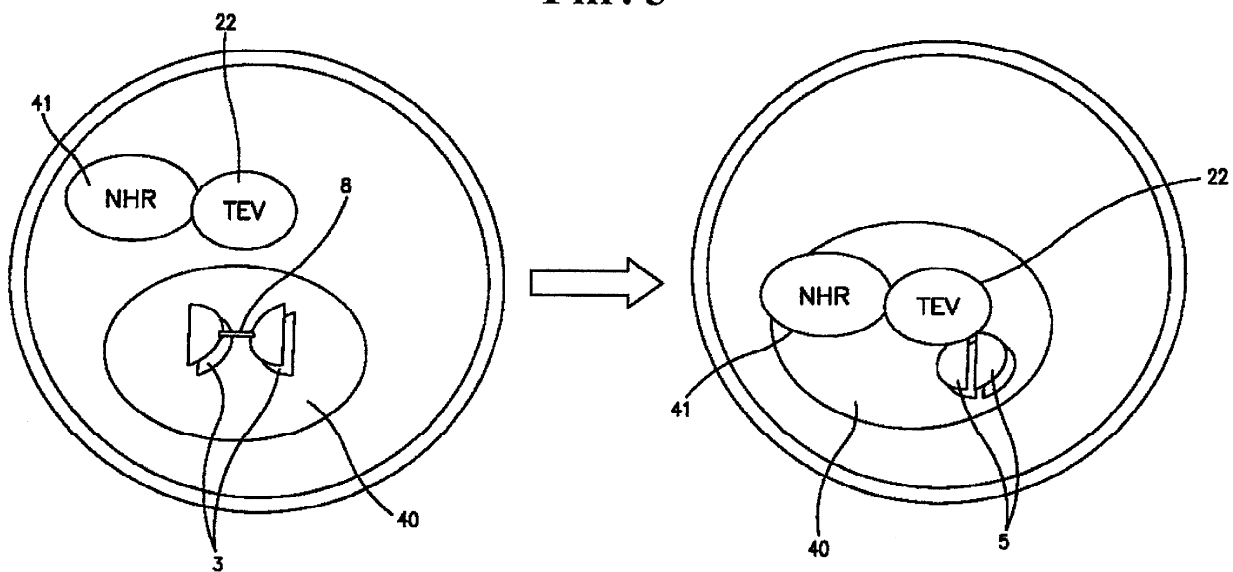
Фиг. 1



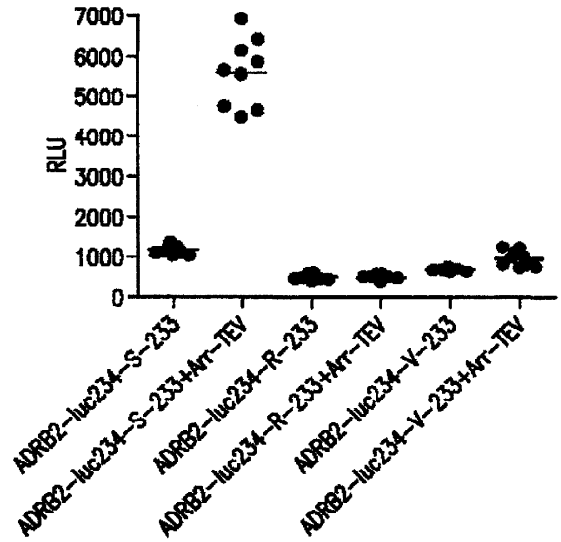
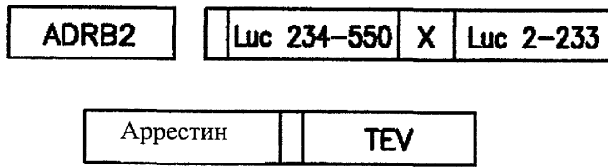
Фиг. 2



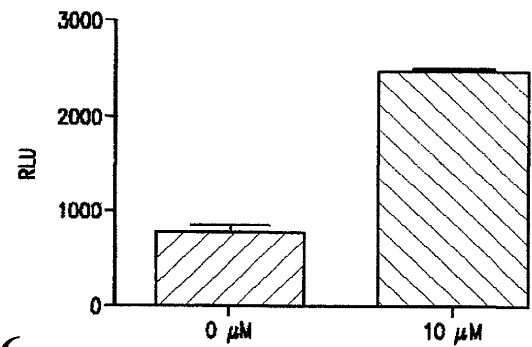
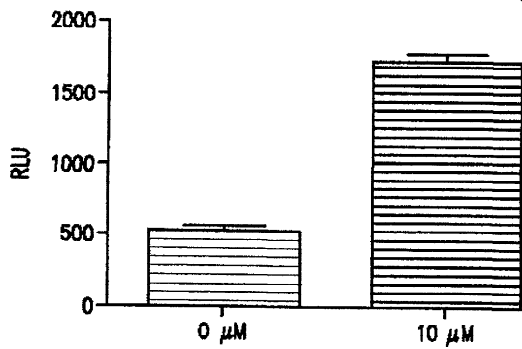
Фиг. 3



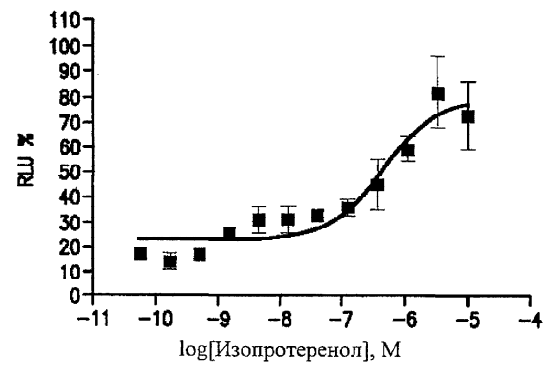
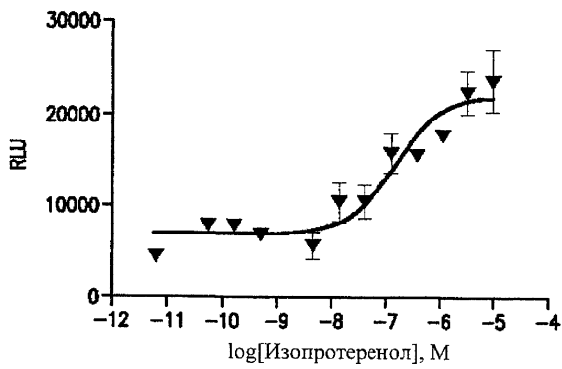
Фиг. 4



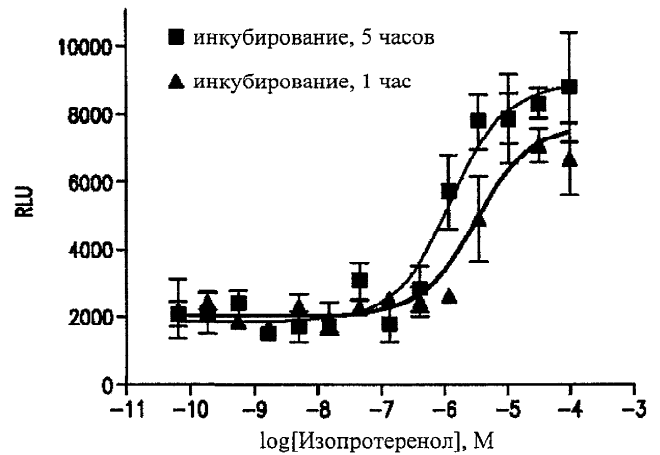
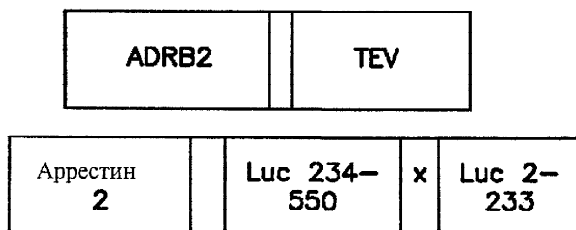
Фиг. 5



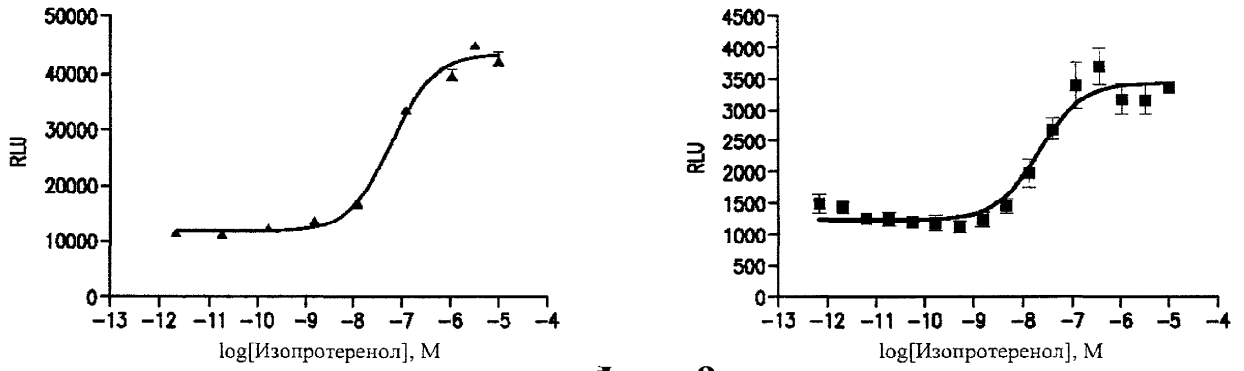
Фиг. 6



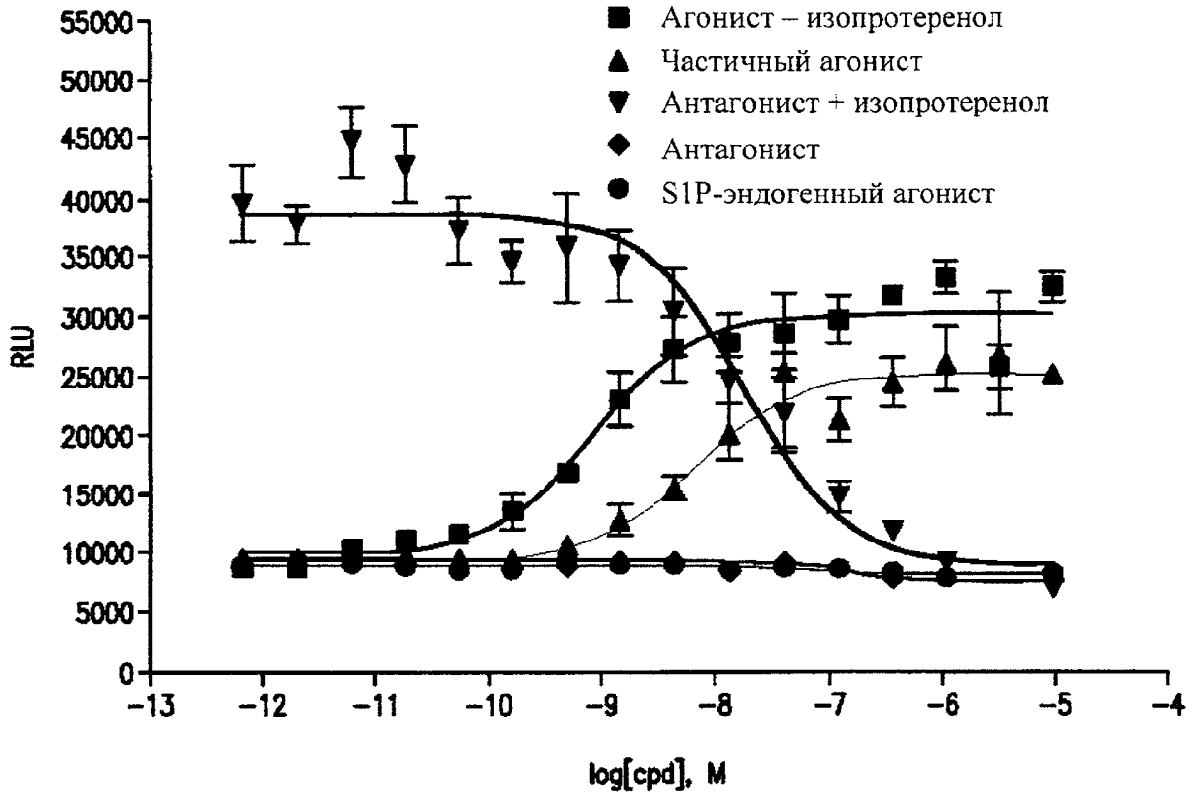
Фиг. 7



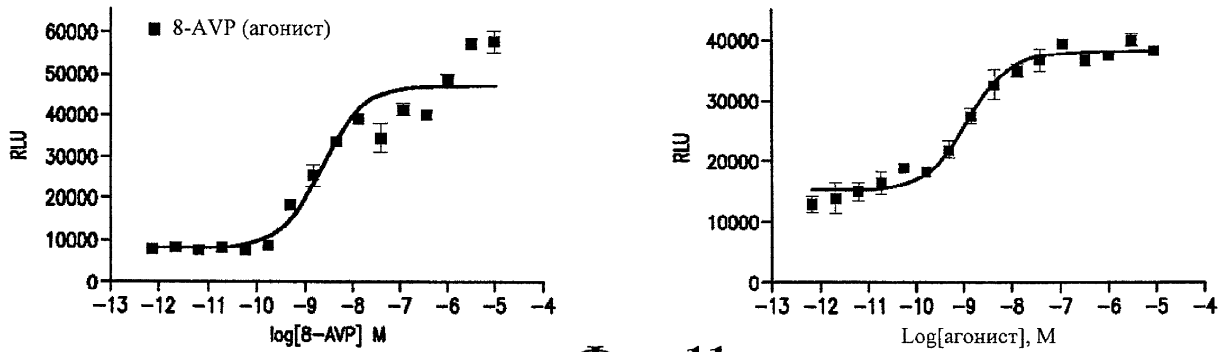
Фиг. 8



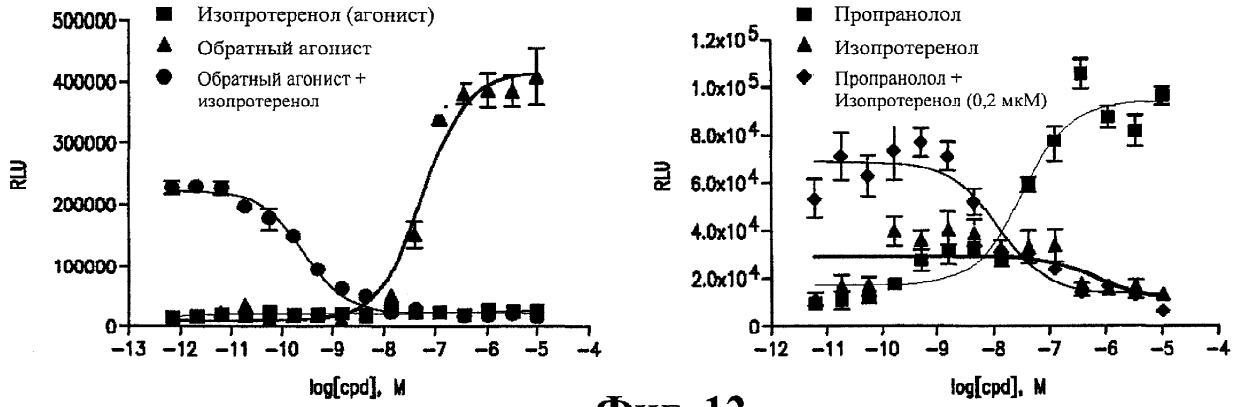
Фиг. 9



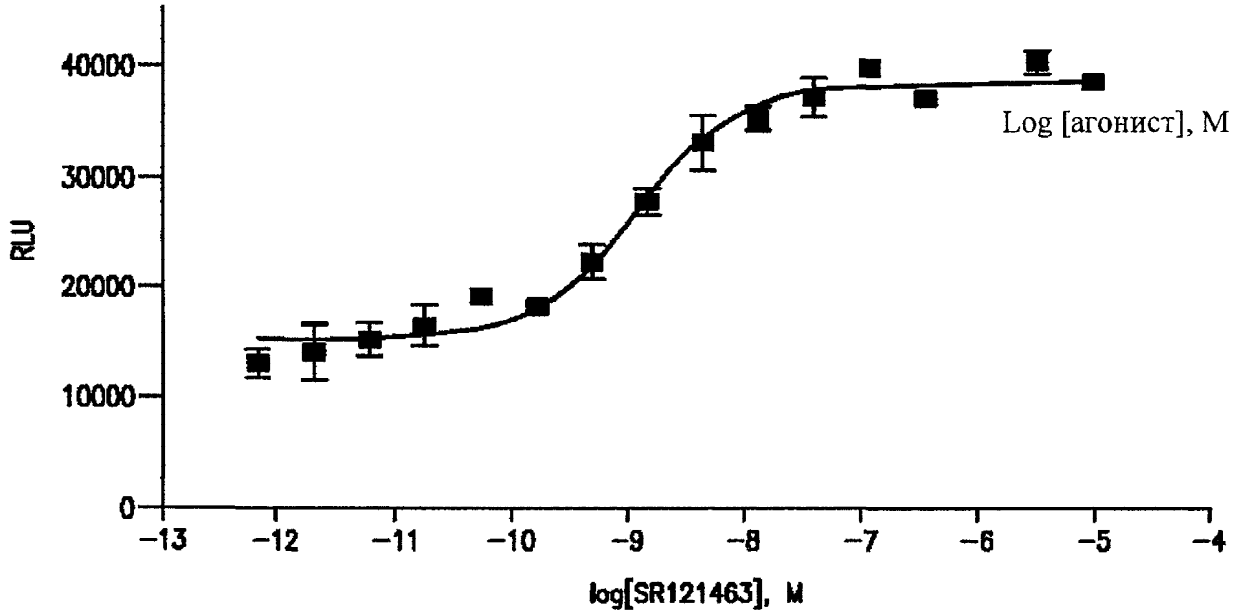
Фиг. 10



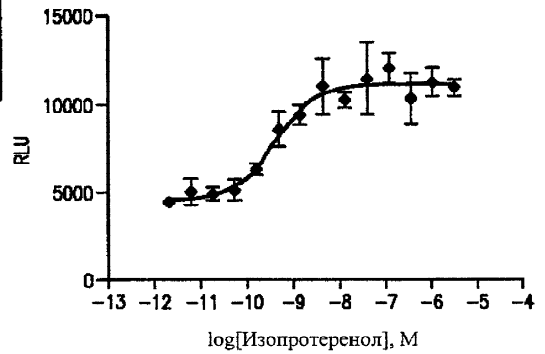
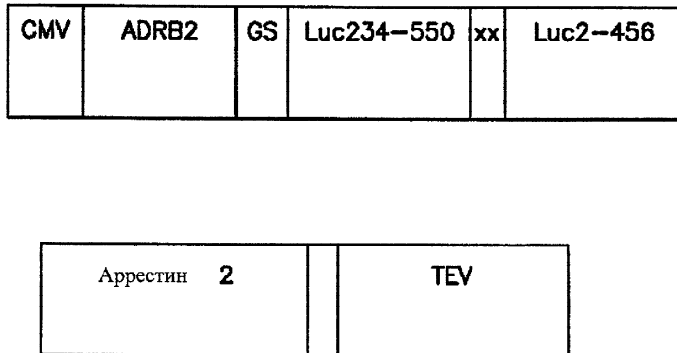
Фиг. 11



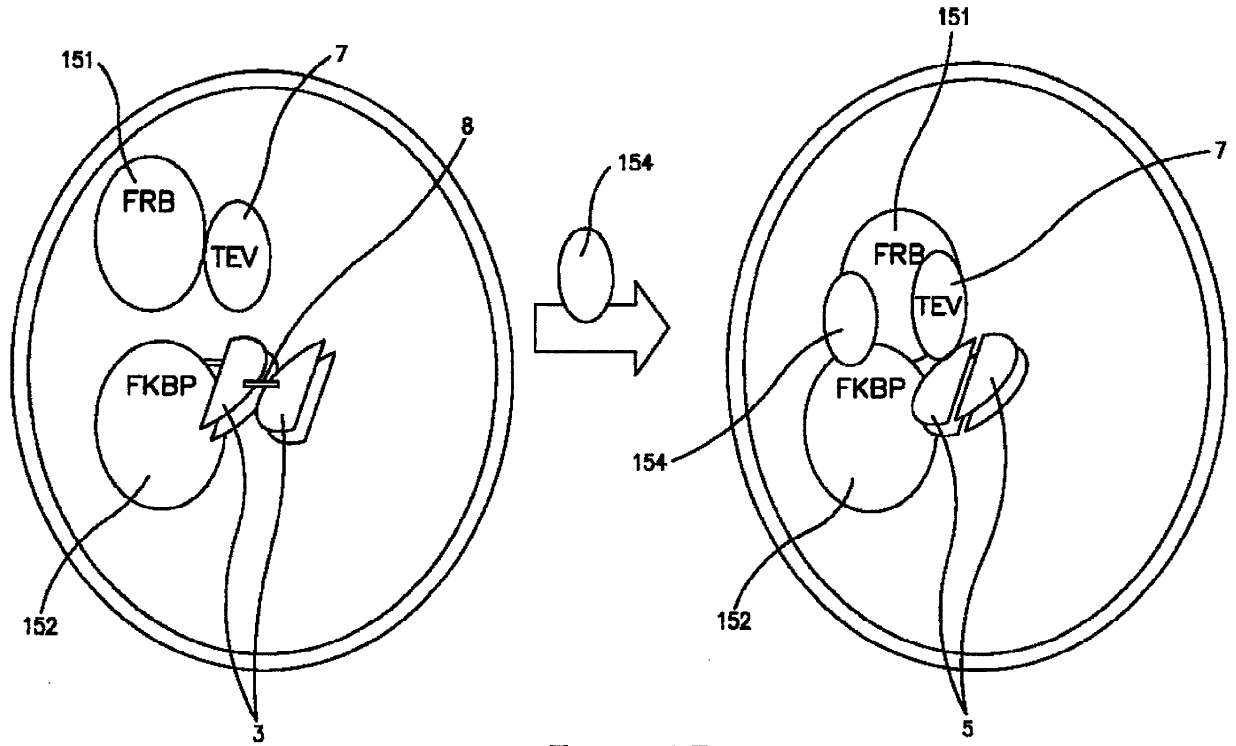
Фиг. 12



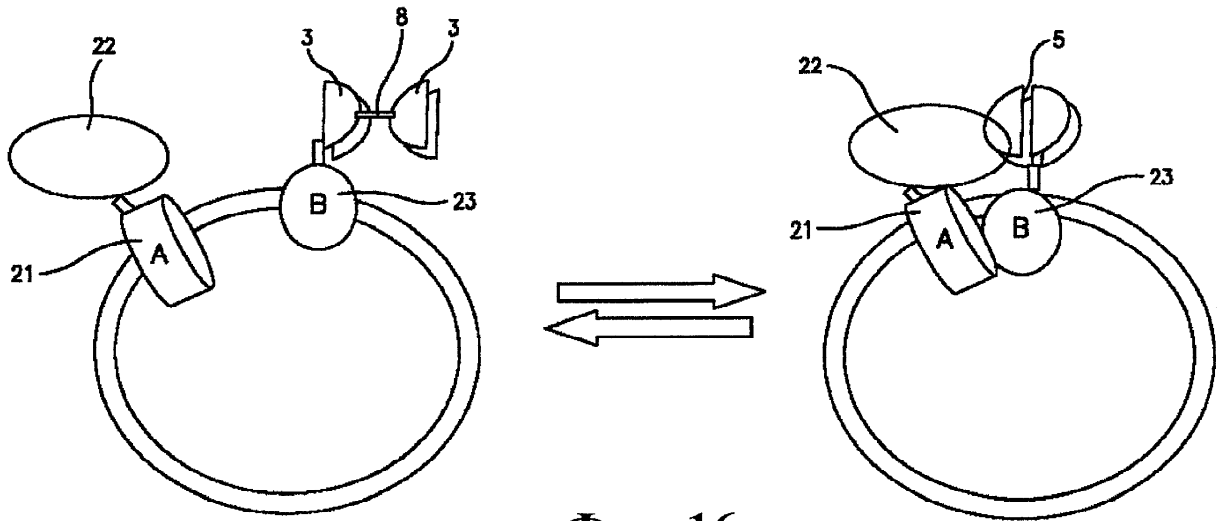
Фиг. 13



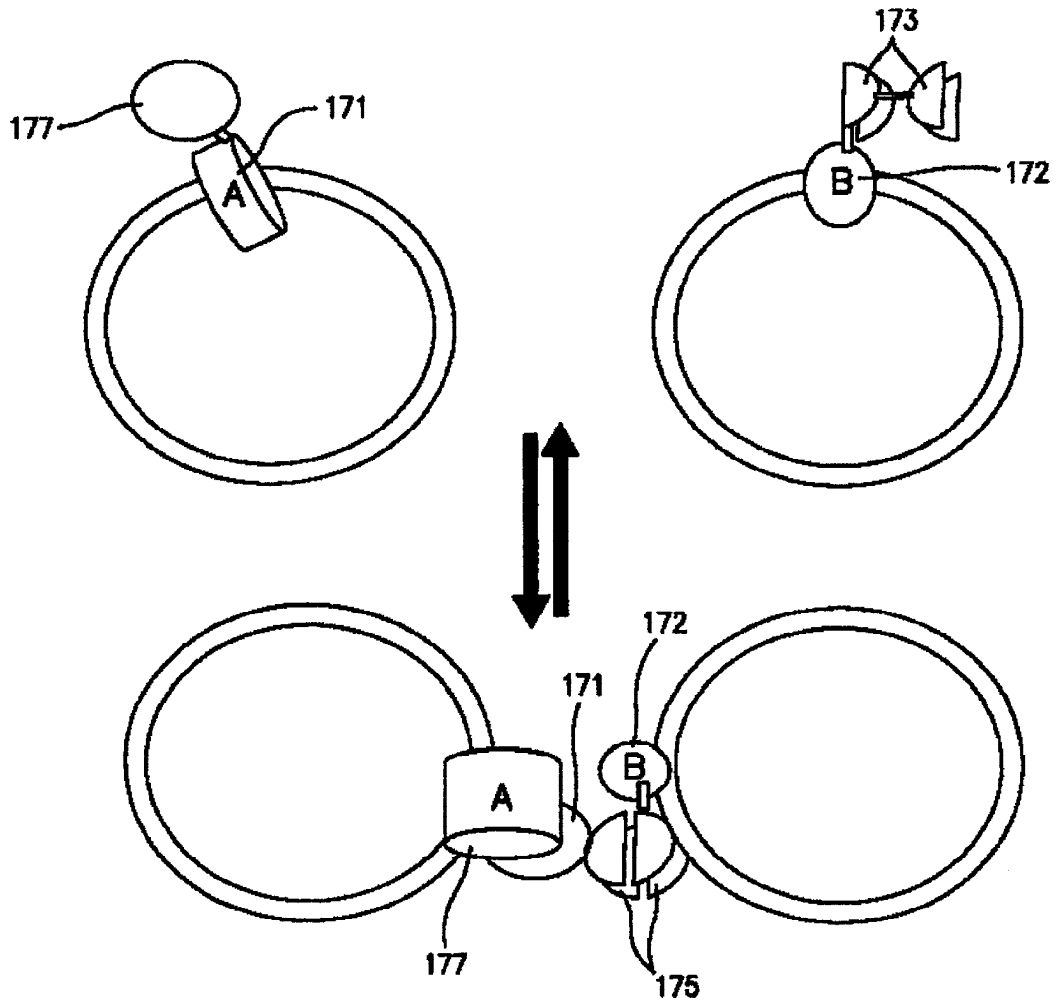
Фиг. 14



Фиг. 15



Фиг. 16



Фиг. 17