



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2023 00572

(22) Data de depozit: 17/10/2023

<p>(41) Data publicării cererii: 29/03/2024 BOPI nr. 3/2024</p> <p>(71) Solicitant: • INSTITUTUL DE VIRUSOLOGIE ȘTEFAN S.NICOLAU, ȘOS.MIHAI BRAVU, NR.285, SECTOR 3, PO77, PO BOX 201, BUCUREȘTI, B, RO</p> <p>(72) Inventatori: • DIACONU CARMEN CRISTINA, STR. BABA NOVAC, NR.21, G11, 7/74, BUCUREȘTI, B, RO; • CONSTANTINESCU ȘTEFAN NICULAE, STR.PARIS, NR.7, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO; • PITICA IOANA- MĂDĂLINA, BD.CONSTANTIN BRÂNCOVEANU, NR.14, BL.B5, SC.1, ET.2, AP.10, BUCUREȘTI, B, RO; • BLEOTU CORALIA, ALEEA LUNCA BRADULUI NR. 2, BL. H5, SC. 6, AP. 2, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO; • MAMBET CRISTINA, STR. DR. IACOB FELIX, NR.95, BL.17A, AP.25, BUCUREȘTI, B, RO; • ECONOMESCU CHIVU MIHAELA, ȘOS.ȘTEFAN CEL MARE, NR.240, BL.59A, SC.4, AP.105, BUCUREȘTI, B, RO; • DRAGU LAURA- DENISA, SPLAIUL UNIRII, NR.49, BL.M19, SC.1, AP.33, BUCUREȘTI, B, RO;</p>	<ul style="list-style-type: none">• MATEI LILIA, STR.CIOCĂNEȘTI, NR.20, SC.C, ET.3, AP.28C, BUCUREȘTI, B, RO;• NECULA LAURA GEORGIANA, ȘOS. COLENTINA NR. 10, BL. 6, SC. D, ET. 8, AP. 167, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;• BOTEZATU ANCA, ALEEA CUMINȚENIA PĂMÂNTULUI, NR.10, BL.C1.14, SC.B, ET.4, AP.36, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;• IANCU IULIA VIRGINIA, STR.CONSTANTIN BRÂNCUȘI, NR.7, BL.D14, SC.1, ET.7, AP.32, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;• PANĂ LAVINIA- MIHAELA, NR.278, SAT TUTANA, COMUNA BĂICULEȘTI, AG, RO;• PĂIȘ ALEXANDRA- CRISTIANA, STR.SUBLOCOTENENT POPA, NR.1, BL.15, SC.2, ET.6, AP.91, SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO;• GHEORGHE GINA, STR.SUȘENI, NR.142, BOLINTIN VALE, GR, RO;• IONESCU VLAD- ALEXANDRU, STR.GRIGORE ROMNICEANU, NR.31, SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO;• GURBAN PETRUȚA, STR.MAȘINA DE PÂINE, NR.20, BL.OD37, SC.5, ET.9, AP.214, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;• GAMAN MIHNEA- ALEXANDRU, STR.DR.MIHAIL MIRINESCU, NR.12, ET.2, AP.7, SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO
---	--

(54) **METODĂ DE EVALUARE A POTENȚIALULUI INHIBITOR SPECIFIC ȘI SELECTIV PENTRU O ȚINTĂ MOLECULARĂ DEFINITĂ**

(57) Rezumat:

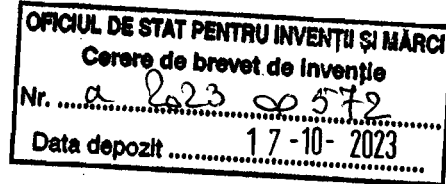
Invenția se referă la o metodă de evaluare a potențialului specific și selectiv pentru o țintă moleculară tirozinkinaza oncogenică JAK2 V617F implicată în patogeniza neoplasmelor mieloproliferative (NMP). Metoda, conform invenției, constă în etapele: obținerea unui set de linii celulare care exprimă stabil JAK2 V617F, respectiv, omologul fiziologic JAK2 WT și omologul mutant JAK1 V658F, determinarea efectului anti-proliferativ al compușilor cu potențial inhibitor testați prin monitorizarea în timp real a modificărilor celulare cu sistemul

IncuCyte, citotoxicitatea prin determinarea producției de ATP prin analiza luminometrică cu testul CTG Luminiscence, analiza modului de inducere a efectului anti-proliferativ (apoptoză sau necroză) și efectul asupra ciclului celular, prin citometrie în flux, în scopul identificării unor inhibitori cu specificitate înaltă și selectivitate pentru ținta JAK2 V617F.

Revendicări: 1
Figuri: 6

Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, solicitantului, protecția conferită potrivit dispozițiilor art.32 din Legea nr.64/1991, cu excepția cazurilor în care cererea de brevet de invenție a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de invenție este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).





12.2. DESCRIEREA BREVETULUI: METODA DE EVALUARE A POTENȚIALULUI INHIBITOR SPECIFIC ȘI SELECTIV PENTRU O ȚINTĂ MOLECULARĂ DEFINITĂ

Invenția se referă la o metodă de evaluare a potențialului inhibitor specific și selectiv pentru tirozinkinază oncogenică JAK2 V617F implicată în patogeneza neoplasmelor mieloproliferative (NMP), urmată de evaluarea concomitentă a impactului asupra omologului fiziologic JAK2 WT și analiza toxicității nespecifice pe omologul mutant JAK1 V658F, prin metode de luminiscentă, citometrie în flux și microscopie, scalabile pentru screening de biblioteci de compuși.

Metoda este caracterizată prin aceea că se obțin linii celulare care exprimă stabil tirozinkinaza oncogenică JAK2 V617F și respectiv, omologul fiziologic JAK2 WT și o altă tirozinkinază JAK1 V658F (mutație constitutiv activă, omoloagă mutației V617F în JAK2) cu ajutorul cărora se poate evalua concomitent efectul unor compuși atât asupra unor celule care exprimă proteina oncogenă țintă cât și pe celule care exprimă omologul fiziologic JAK2 WT. Efectul înalt specific și selectiv poate fi determinat analizând concomitent celule care exprimă o proteină apropiată din punct de vedere filogenetic și cu o mutație cu efect similar la nivel celular cu cel produs de oncogenă țintă pentru care se caută inhibitori selectivi, urmată de analiza toxicității nespecifice prin metode de luminiscentă, citometrie în flux și microscopie, scalabile pentru screening de biblioteci de compuși.

Metoda de screening a eficienței potențialilor inhibitori are la baza linia celulară hematopoietică Ba/F3 (dependentă de IL-3 pentru supraviețuire și proliferare) modificată prin transducție cu un vector de expresie pentru producția de JAK 2 WT, cu JAK2 cu mutația oncogenică V617F și respectiv JAK 1 cu mutația V658F, cu obținerea de linii celulare stabile, capabile să producă stabil proteinele a căror gene au fost transduse. Cele trei linii celulare transduse au fost sortate pentru cantități similare ale proteinelor de interes pe baza unui marker (green fluorescence protein –GFP) exprimat în cantități direct proporționale cu proteina de interes (Liu X., et al., 2000). Liniile celulare care exprimă oncogenele JAK2 V617F și JAK1 V658F au fost verificate și selectate pentru capacitatea de a prolifera în absența citokinelor. Pentru a putea testa efectul toxic nespecific pe celulele care exprimă proteina normală (WT) și respectiv, efectul toxic (de preferință inductor de apoptoză) în celulele care exprimă oncogenă JAK2 V617F sau o altă oncogenă apropiată din punct de vedere filogenetic (JAK1 V658F), celulele tratate au fost investigate în timp real cu sistemul IncuCyte, prin determinarea cantității de ATP produse de celulele metabolic active (end-point), analiza ciclului celular și a morții celulare prin apoptoză sau necroză prin citometrie în flux.

Neoplasmele mieloproliferative (NMP) sunt caracterizate de dominanta clonală și promovarea hematopoiezei maligne față de cea normală cu supraproducția uneia sau mai multor linii de celule mature mioeloide.

Genă *JAK2* codifică tirozin kinaza JAK2 care este asociată cu domeniul citosolic al unor receptori transmembranari pentru citokine și factori de creștere importanți pentru semnalizarea intracelulară. În urma activării JAK2 rezultă fosforilarea proteinelor STAT (signal transducers and activators of transcription), conducând în cele din urmă la creșterea și diferențierea celulară. În ansamblu, aproximativ două treimi din toate NMP (Baxter EJ, et al., 2005) prezintă mutația dobândită la nivelul unui singur nucleotid în JAK2, caracterizată ca c.G1849T; p. Val617Phe (V617F). Această mutație are o prevalență diferită în funcție de subtipul MPN. JAK2 V617F este prezent în 95% până la 98% dintre cazurile cu policitemia vera, 50% până la 60% dintre cazurile cu mielofibroza primară (PMF) și 50% până la 60% dintre cazurile cu trombocitemia esențială (ET). A fost descrisă și în alte neoplasme mioeloide (leucemia mielomonocitară cronică și sindromul mielodisplazic, etc) (Steensma DP, et al., 2005).

În prezent sunt bine caracterizate și alte mutații implicate în patogeneza NMP, cum sunt cele din gena receptorului pentru trombopoietina (*MPL sau TpoR*), găsite în 5%-10% din PMF și 3%-5% din ET sau cele din gena calreticulinei (*CALR*) găsite în 20%-30% din PMF și ET, *JAK2 V617F* este de departe cea mai frecventă mutație driver identificată în NMP.

Deși studiul inhibitorilor tirozin-kinazici pentru NMP a luat un avânt important în ultimele două decade, încă nu au fost identificați inhibitori înalt specifici și selectivi pentru oncoproteinele

identificate, în prezent utilizându-se în clinica inhibitori care țintesc atât JAK2 mutante cât și pe variantele normale (wild type – WT). Screeningul pentru compuși înalt specifici cu potențial de a inhiba selectiv tirozin-kinazele mutante și nu pe omologul lor fiziologic este un deziderat major al farmacologiei moleculare (Juan Gao et al., 2023).

Analiza invenției s-a făcut prin comparație cu Brevetul US10620188B2 care se refera la metoda de identificare a unor agenți biologic activi asupra unei cai stimulate de oncogena prin testarea în paralel a unui agent potențial activ și a unui control negativ, în prezența unui agent stimulator al căii oncogene. Modelul monitorizează impedanța celulelor substrat în cele două godeuri generând o curbă de impedanță sau de indici celulari calculați pentru fiecare godeu cu compararea gradului de similaritate între curbele obținute. Efectul agentului biologic activ asupra căii oncogenice investigate poate fi apreciat din apariția unor curbe de impedanță semnificativ diferite în godeul cu agentul de investigat și godeul cu controlul negativ. Modelul este utilizat pentru identificarea unor compuși cu efect asupra unor cai oncogenice.

Invenția de față se refera la o metoda de evaluare a eficienței unor compuși asupra celulelor cu expresie stabilă a oncogenei JAK2 V617F comparativ cu efectul asupra celulelor care exprimă varianta normală a proteinei JAK2 (JAK 2WT), concomitent cu analiza efectului asupra celulelor care exprimă o proteină apropiată din punct de vedere filogenetic și cu o mutație cu efect similar la nivel celular cu cel produs de oncogena țintă, și anume JAK1 V658F, urmata de determinarea efectului anti-proliferativ prin analiza în timp real a celulelor și determinarea producției de ATP și analiza modului de inducere a acestui efect anti-proliferativ (apoptoză sau necroză) și efectul asupra ciclului celular, prin citometrie în flux.

Problema pe care invenția actuală o rezolvă este stabilirea unei metode de evaluare a efectului anti-proliferativ al unor compuși cu potențial inhibitor pentru celule care exprimă JAK2V617F, concomitent cu efectul exercitat asupra celulelor care exprimă omologul fiziologic al JAK2 V617F și de asemenea, asupra unor celule ce exprimă o proteină din aceeași familie, cu o mutație omologă, și anume JAK1 V658F. În scopul obținerii acestui set de linii celulare spre a fi utilizate în sistemul celular de identificare a unor inhibitori cu specificitate înaltă și selectivitate pentru JAK2 V617F, s-a utilizat linia celulară Ba/F3 pentru transducția cu vectori retrovirali a zonelor de interes. Vectorii retrovirali au fost obținuți în celule de impachetare BOSC 23. JAK2 V617F și JAK2 V658F

Soluția pe care o propune prezenta invenție este stabilirea unei metode de evaluare a specificității și selectivității unor compuși prin metode scalabile spre a fi utilizabile în screeningul eficient al unor biblioteci de compuși chimici în vederea eliminării riscurilor de eșec în faze mai avansate de dezvoltare a unor astfel de inhibitori.

Metodele de analiză includ analiza live a celulelor cu sistemul IncuCyte și determinarea producției de ATP (determinarea luminescenței) și analiza modului de inducere a acestui efect anti-proliferativ (apoptoză sau necroză) și efectul asupra ciclului celular, prin citometrie în flux.

Avantajul soluției propuse de prezenta invenție este testarea efectului unor compuși printr-o strategie de screening bazată pe un set de linii celulare ce exprimă niveluri similare de JAK2 V617F, JAK2 WT și respectiv JAK1 V658F, cu analiza mecanismului prin care este indusă moartea celulară, cu scopul final de a putea selecta compuși înalt specifici și selectivi pentru oncogena cea mai frecvent identificată în neoplazmele mieloproliferative.

Pentru investigarea efectului compușilor cu potențial inhibitor a fost utilizat ruxolitinib și nolitinib ca și compuși model. Ruxolitinib vizează în mod specific enzimele JAK1 și JAK2, care sunt implicate în căile de semnalizare implicate în producția de celule sanguine. Prin inhibarea acestor enzime, ruxolitinib ajută la reducerea producției excesive de celule sanguine, ameliorarea simptomelor și îmbunătățirea calității generale a vieții pacienților. Ruxolitinib a demonstrat eficacitate în reducerea măririi splinei, ameliorarea simptomelor precum oboseala și pierderea în greutate și îmbunătățirea supraviețuirii generale la pacienții cu mielofibroză. De asemenea, a arătat eficacitate în controlul numărului de celule sanguine și reducerea complicațiilor legate de boala în policitemia vera. Totuși, acest compus este cunoscut pentru lipsa de selectivitate pentru variantele mutante și ca urmare are importante efecte secundare care pot include anemie, trombocitopenie, amețeală, dureri de cap, greață, diaree și un risc crescut de infecții. Nilotinib a fost selectat ca inhibitor

specific al proteinei BCR-ABL care a fost conceput ca inhibitor selectiv pentru aceasta proteina anormală responsabilă de proliferarea celulelor în leucemia mieloidă cronică (LMC). Prin inhibarea proteinei BCR-ABL, nilotinib inhibă căile de semnalizare care promovează creșterea și diviziunea necontrolată a celulelor leucemice în LMC, îmbunătățirea controlului bolii și creșterea ratei de supraviețuire la pacienții cu LMC.

Se prezintă în continuare 4 exemple ale invenției în legătură cu figurile (1-6) și tabele (1-2):

Figura 1. Liniile celulare cu genele JAK2wt, JAK2V617F and JAK1V658F clonate prin transducție cu retrovirusuri bicistronice și sortate prin FACS pentru niveluri de expresie proporționale pe baza fluorescenței (FL1) GFP

Figura 2. Diagrama Flux a testului de screening pentru citotoxicitate – tip “high-throughput”

Figura 3. Monitorizarea live cu sistemul IncuCyte; prezentarea unor imagini reprezentative achiziționate live (fluorescența verde) la diferite momente din perioada de monitorizare a setului de linii celulare care exprima GFP și proteinele exprimate ectopic după tratamentul cu ruxolitinib 100nM.

Figura 4. Raport cu date integrate de citotoxicitate (curbele de dependență de concentrație) - % inhibiție a proliferării față de proliferarea în godeurile control.

Figura 5. Curbele doza-răspuns obținute cu testul CellTiter-Glow (Promega) în tratamentul liniilor celulare transduse, sortate și/sau selectate apoi tratate 24 ore cu ruxolitinib (Figura 5a) și nilotinib (Figura 5b) în diferite concentrații. Reprezentarea grafică a procentelor proliferării celulare raportate la celulele tratate doar cu solventul pentru compusul de investigat (DMSO).

Figura 6. Analiza efectelor induse de tratamentul cu 5 μM nilotinib sau ruxolitinib asupra fazelor ciclului celular în liniile Ba/F3 JAK2 WT (a), Ba/F3 JAK2 V617F (b), și Ba/F3 JAK1 V658F (c).

Tabel 1. Rezultatele obținute în analiza ciclului celular și apoptozei prin marcarea cu PI (media a trei experimente independente).

Tabel 2. Rezultatele obținute în analiza % de apoptoză și necroză prin marcarea cu Annexin-V-PE/7-AAD determinate la tratamentul de 48h cu 5μM inhibitori (media a trei experimente independente).

Exemplul 1.

1. Obținerea liniilor celulare necesare pentru trusa de investigare a unor compuși specifici pentru o țintă moleculară definită cu impact controlat pe omologul său fiziologic și cu toxicitate non-specifică

Generarea de linii celulare stabile s-a realizat prin transducție cu retrovirusuri bicistronice care codifica genele de interes dar și proteine marker (GFP) în cantități proporționale (Liu, X., et al., Anal. Biochem. 280, 20–28). Vectorul bicistronic utilizat are o secvență Internal Ribosome Entry Site (IRES) ce permite translația simultană a două proteine (proteina de interes și proteina marker) în cantități controlate. Celulele cu niveluri controlate de expresie a proteinelor de interes au fost obținute prin sortarea pentru proteina marker.

Strategia noastră de screening de compuși are la baza pe un sistem de testare celular construit pe linia celulară hematopoietică Ba/F3. Linia celulară Ba/F3 este dependentă de IL-3 pentru supraviețuire și proliferare însă se poate transforma capotând abilitatea de a prolifera în lipsa acestei interleukine dacă i se introduce prin transducție virală o tirozinkinază mutantă cum este de exemplu, JAK2 V617F. Astfel, am creat un set de linii celulare cu genele cu mutația driver JAK2 V617F și respectiv, cu gena normală, WT, și de asemenea cu o gena apropiată din punct de vedere filogenetic și cu o mutație similară celei din JAK 2, și anume JAK1 V658F. Astfel, putem testa diferiți compuși în paralel și vom putea diferenția compușii fără efect toxic pe celulele care exprima genele normale dar citotoxici pentru celulele care exprima genele mutante.

Strategia noastră de obținere a liniilor celulare cu gene mutante s-a bazat pe transducția genelor modificate la nivelul plasmidului retroviral prin mutageneza in situ. Pentru obținerea de virusuri capabile să transduca stabil celule cu genele JAK2 și JAK2 V617F, s-a pornit de la cDNA inserat în plasmidul pMX-IRES-GFP. Plasmidul a fost modificat prin mutageneza in situ utilizând protocolul (QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit). Vectorul retroviral pMX-IRES-GFP se

bazează pe virusul Moloney murine leukemia (MMLV), furnizează un semnal de împachetare virală, elemente de transcripție și de procesare și MCS pentru clonarea genei de interes. Co-transfectat în celulele BOSC 23 cu plasmidul pCLeco, care exprimă niveluri ridicate de proteine gag, pol, și env, a făcut posibilă o producție mare de virus eficient pentru transducția celulelor murine BaF3. Virusurile obținute din „împachetarea” vectorilor virali în celule BOSC 23 transfectate au fost capabile să transducă genele de interes în celule Ba/F3 prin spininfecție. 500000 celule BaF3/punct experimental au fost puse în contact cu 1 ml virus produs anterior de celulele BOSC 23 și 16 micrograme polybrene. Aceste mix-uri de reacție (pentru fiecare genă de interes, mutant sau wt) au fost centrifugate 120 min la 37°C la 350g. Supernatantele au fost îndepărtate iar celulele infectate au fost resuspendate în 8 ml mediu RPMI cu 10% FBS și 10% supernatant provenit din cultura liniei celulare WEHI 3B (producătoare de 5-10 ng/mL IL-3). Culturile celulare au fost menținute în incubator la 37°C în atmosferă de 5% CO₂. Celulele au fost monitorizate zilnic, mediul de creștere fiind schimbat la 2-3 zile, iar pasajele au fost realizate în funcție de rata de creștere. Celulele stabil infectate au fost sortate pentru expresia proteinelor exprimate ectopic folosind în acest scop proteinele marker GFP exprimate în cantități proporționale cu proteinele de interes datorită particularităților vectorului bicistronic utilizat la transfecție (Figura 1.)

Celulele sortate, în care au fost transduse genele mutante, au fost verificate și în ceea ce privește capacitatea lor de a prolifera în absența IL-3.

Exemplul 2.

2. Testarea citotoxicității în array-uri de 96 de godeuri ("highthroughput")

Designul screening-ului (diagrama flux) pentru testarea citotoxicității în array-uri de 96 de godeuri ("highthroughput") este sumarizat în Figura 2.

Compușii de testat au fost stocați în placi de 96 godeuri (masterplates), prediluți pentru teste în format doză-răspuns (pe domeniul 100 microM până la 1 microM). Au fost menținute de asemenea și stocuri individuale de compuși pentru testat la concentrații de 10 mM.

Celulele pe care se realizează tratamentele sunt ținute în cultura (37°C, 5% CO₂) cel puțin 48 ore, multiplicată până la concentrația stoc necesară însămânțării numărului de placi de testare considerând o densitate, de 5000 celule/godeu/arie de 0,3 cm² în placile speciale de lucru cu fund plat optic transparent și pereți opaci care să nu permită interferența luminescenței între godeuri.

Compușii de testat sunt transferați din "master plates" în placi cu distribuție identică, "în registru" considerând diluții de 1:10. Experimentele s-au realizat în triplicate tehnice.

În continuare setul de linii celulare, tratate și netratate (sau tratate doar cu solventul utilizat pentru compușii de investigat) au fost monitorizate live cu sistemul IncuCyte iar după 72 ore prin determinarea citotoxicității prin măsurarea ATP produs de celulele viabile utilizând testul Cell Titer Glo (CTG) Luminescence (Promega).

1.1 Monitorizarea în timp real a celulelor cu sistemul IncuCyte și citotoxicitatea prin determinarea producției de ATP cu testul CTG Luminescence (Promega).

Sistemul IncuCyte este ideal pentru monitorizarea în timp real a modificărilor celulare de la momentul începerii tratamentului și până în momentul lizei pentru determinare viabilității.

Sistemul IncuCyte este ideal pentru monitorizarea în timp real a modificărilor celulare de la momentul începerii tratamentului și până în momentul lizei pentru determinare viabilității.

După o incubare de 72 ore, placile de cultura au fost analizate cu testul CTG Luminescence (Promega). Semnalul luminescent este produs în urma reacției de mono-oxigenare a luciferinei, reacție catalizată în prezența Mg, oxigenului molecular și al ATP produs doar în celulele viabile și metabolic active, de o luciferaza recombinantă. Astfel, semnalul luminescent este direct proporțional cu cantitatea de ATP produsă de celule și deci cu viabilitatea celulară. După analiza luminometrică a placilor, datele sunt exportate în Microsoft Excel în fișe de calcul create special, cu ajutorul cărora se va putea genera raportul cu date integrate (Figura 4).

*Testare a viabilității celulare prin măsurarea ATP produs de celulele viabile*_utilizand testul Cell Titer Glo a fost selectata datorita omogenității și a faptului ca implică adăugarea unui singur reagent (Reagent CellTiter-Glo®) direct celulelor cultivate în mediu fara a fi necesara spalarea celulelor ce ar putea induce erori de evaluare a citotoxicității. Sistemul poate detecta mai puțin de 15 celule și poate fi utilizat și în format HTS cu peste 96-godeuri. Formatul "adaugă-amestecă-măsoară" determina liza celulelor și generarea unui semnal luminescent proporțional cu cantitatea de ATP produsa de celulele metabolic-actice din cultura. CellTiter-Glo® generează un semnal luminescent, care are un timp de înjumătățire de aproximativ cinci ore pentru sistemul nostru celular. Acest timp de înjumătățire a semnalului oferă flexibilitate pentru procesarea continuă sau în mod batch a mai multor plăci. Metoda prezinta un interval dinamic și o reproductibilitate excelente cu o liniaritate între 0 și 100000 celule ($R^2 > 0.99$ în condițiile de lucru pentru liniile noastre celulare).

Testarea pe baza strategiei noastre a compușilor selectați ca model, a relevat faptul ca Ruxolitinib are, asa cum era de asteptat, un efect inhibitor important asupra JAK2 wt dar și asupra variantelor mutante, cu o toxicitate ceva mai redusă asupra Ba/F3 JAK1 V658F (Figura 5a). De asemenea, s-a putut observa că nilotinib, care este un compus fără efect inhibitor semnificativ asupra tirozinkinazelor JAK WT, are efect inhibitor, deși sub 50% chiar și la cea mai mare doză testată, asupra Ba/F3 care exprima variantele mutante de JAK1 și JAK2 (Figura 5b).

Exemplu 3

3. Procedura de analiză a ciclului celular prin citometrie în flux.

Procedura cuprinde marcarea celulelor fixate și permeabilizate (cu etanol rece) cu iodura de propidium (PI). PI este un fluorocrom standard pentru analiza ciclului celular legadu-se cu mare afinitate de acizii nucleici la care are acces în urma permeabilizării.

Analiza ciclului celular la 24 ore a relevat faptul că tratamentul cu 5μM nilotinib nu a afectat substantial numarul de celule aflate în diversele faze ale ciclului celular atat în linia Ba/F3 JAK2 WT cat și Ba/F3 JAK2 V617F, precum și Ba/F3 JAK1 V658F. În schimb, 5 μM ruxolitinib scade procentul de celule aflate în faza S în celulele Ba/F3 JAK2 WT de la 42,79% la 17,57%.

Mai mult, în celulele Ba/F3 JAK2 V617F scaderea procentului de celule aflate în faza S este mult mai pregnantă de la 42,43% la 9,1%. În acest caz se observa o diminuare dramatică și a fazei G2, de la 11,92% la 2,13%.

Asa cum se observă în tabelul 1, analiza ciclului celular la 24 ore de tratament cu 5 μM nilotinib a indus doar puțină apoptoza (peak-ul subG0/G1) în toate liniile celulare, dar în prezenta a 5μM ruxolitinib apoptoza a atins un procent de 22,47% în celulele wild type (Ba/F3 JAK2 WT) și chiar mai mult în ambele tipuri de celule cu tirozinkinazele mutante (~57%) (Tabelul 1).

Exemplul 4.

4. Procedura de analiză a proceselor de apoptoză și necroză prin citometria în flux.

Procedura determina procentul de apoptoză și necroză prin marcarea cu Annexin-V-PE/7-AAD. Annexin V este o proteina dependenta de calciu ce are afinitate mare pentru fosfolipidele expuse în timpul procesului de apoptoză; marcarea cu PE face ca fluorescanta celulelor apoptotice marcate sa nu interfere cu fluorescanta GFP prezenta în aceste celule. 7-Amino-Actinomycin (7-AAD) este un fluorocrom standard pentru analiza viabilității prin citometrie în flux care este exclus din celulele viabile dar penetreaza cu usurinta membrana celor necrotice.

Analiza prin citometrie în flux (Annexin-V/7-AAD) a setului de linii celulare tratate sau nu cu inhibitorii selectați, pentru 48 ore la concentrații de 5 μM este prezentata sintetic in tabelul 2.

Referințe

- Liu X., Constantinescu SN, Sun Y, Bogan JS, Hirsch D, Weinberg R A, Lodish HF., Generation of mammalian cells stably expressing multiple genes at predetermined levels. Anal. Biochem. (2000) Apr 10;280(1):20-8. doi: 10.1006/abio.2000.4478
- Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, et al: Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. Lancet 2005 March 16;365(9464):1054-1061; James C, Ugo V, Le Couedic JP, et al: A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signaling

causes polycythaemia vera. *Nature* 2005 April 28;434(7037):1144-1148; Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, et al: A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med* 2005;352:1779-1790

- Steensma DP, Dewald GW, Lasho TL, et al: The JAK2 V617F activating tyrosine kinase mutation is an infrequent event in both "atypical" myeloproliferative disorders and the myelodysplastic syndrome. *Blood* 2005;106:1207-1209
- Juan Gao, Jingyi Jian, Zhengjin Jiang, Ann Van Schepdael, Screening assays for tyrosine kinase inhibitors: A review, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, Vol 223, 115166, 2023, <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2022.115166>
- <https://patents.google.com/patent/US7459303B2/en>
- Levy Gabriel, Mambet Cristina, Pecquet Christian, Bailly Sarah, Havelange Violaine, Diaconu Carmen C., Constantinescu Stefan N., Targets in MPNs and potential therapeutics, *International Review of Cell and Molecular Biology*, vol 366, p 41-81, 2022: <https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2021.06.004>.
- Levy G., Guglielmelli P., Langmuir P, Constantinescu S, JAK inhibitors and COVID-19. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer* 2022;10:e002838. doi:10.1136/jitc-2021-002838

12.3. REVENDICARE : METODA DE EVALUARE A POTENȚIALULUI INHIBITOR SPECIFIC SI SELECTIV PENTRU O ȚINTĂ MOLECULARĂ DEFINITĂ

Invenția de față se referă la o metodă de evaluare a potențialului inhibitor specific și selectiv pentru o țintă moleculară definită caracterizată prin aceea că se obțin celulele cu expresie stabilă a oncogenei JAK2 V617F comparativ cu efectul asupra celulelor care exprimă varianta normală a proteinei JAK2 (JAK 2WT), celule care exprimă o proteină apropiată din punct de vedere filogenetic și cu o mutație cu efect similar la nivel celular cu cel produs de oncogena țintă, și anume JAK1 V658F, urmată de determinarea efectului anti-proliferativ prin analiza in timp real a celulelor, determinarea producției de ATP și analiza modului de inducere a acestui efect anti-proliferativ (apoptoză sau necroză) și efectul asupra ciclului celular, prin citometrie in flux.

12.4. DESENE

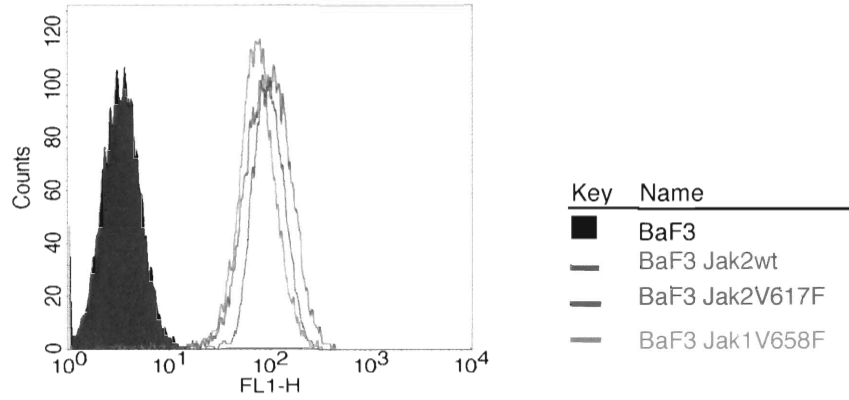


Figura. 1

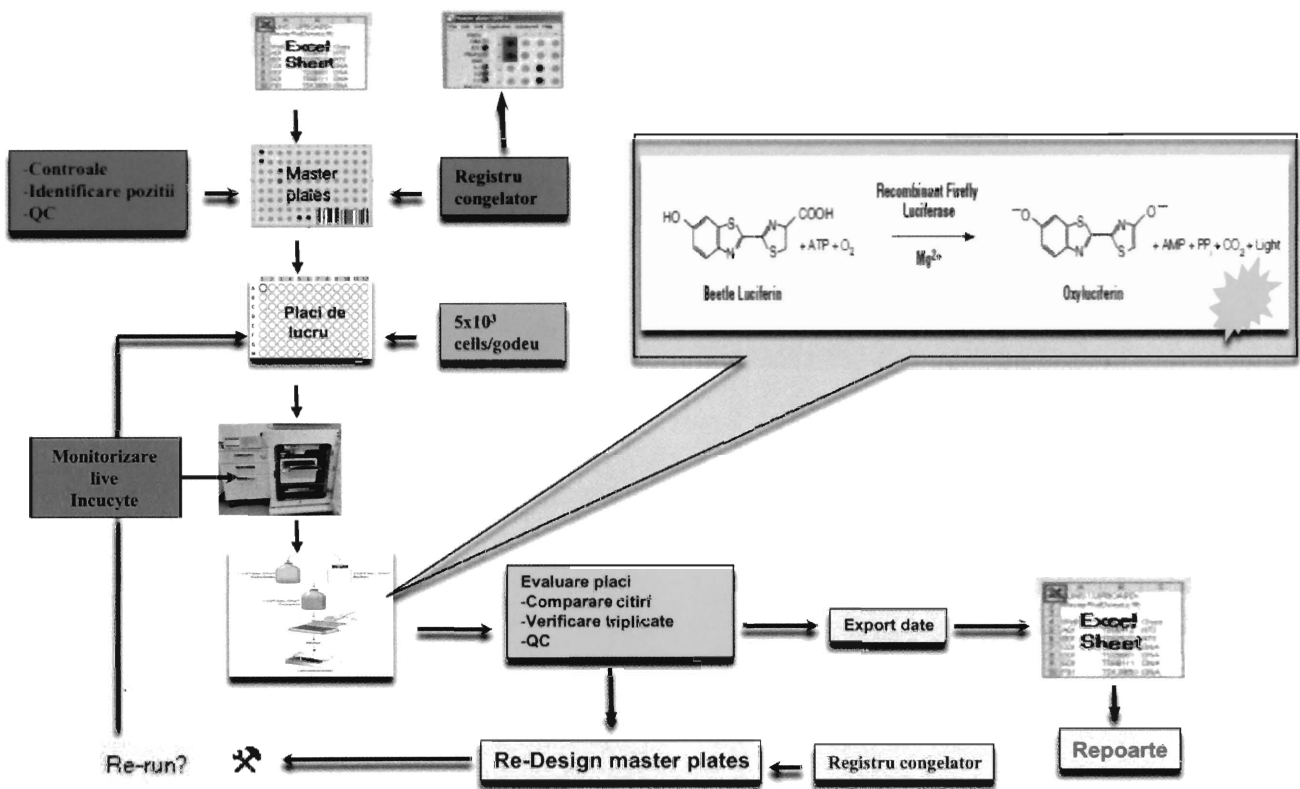


Figura 2.

Ruxolitinib 100 nM	0 ore	8 ore	18 ore
Ba/F3 JAK2 wt			
Ba/F3 JAK2 V617F			
Ba/F3 JAK1 V658F			

Figura 3.

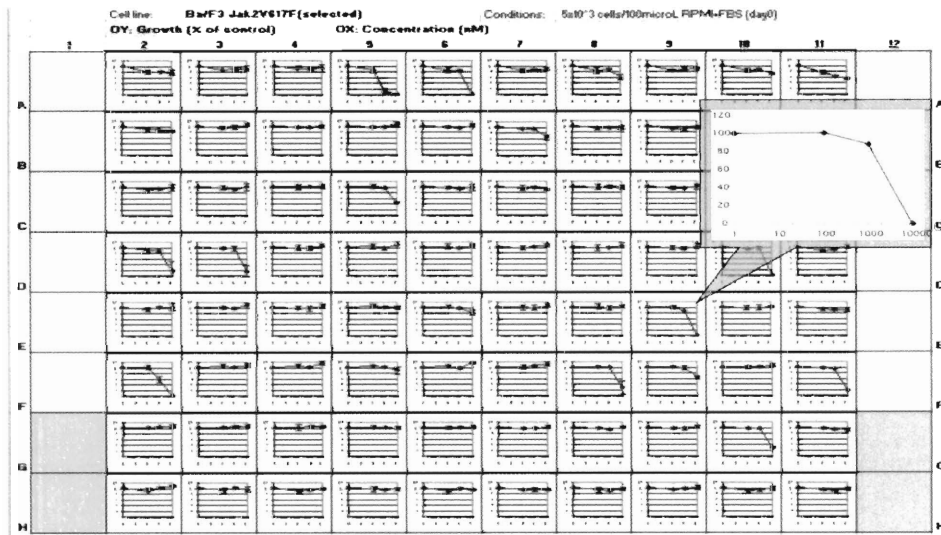


Figura 4.

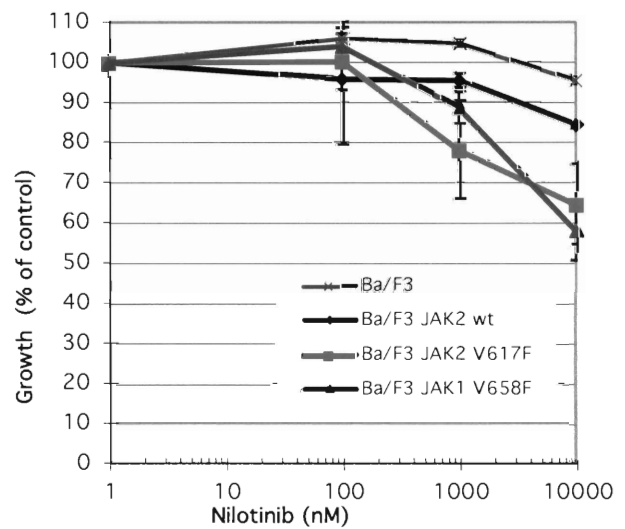
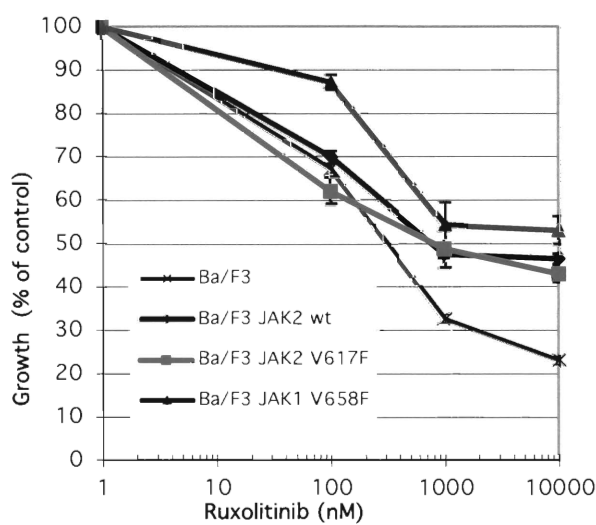


Figura 5.

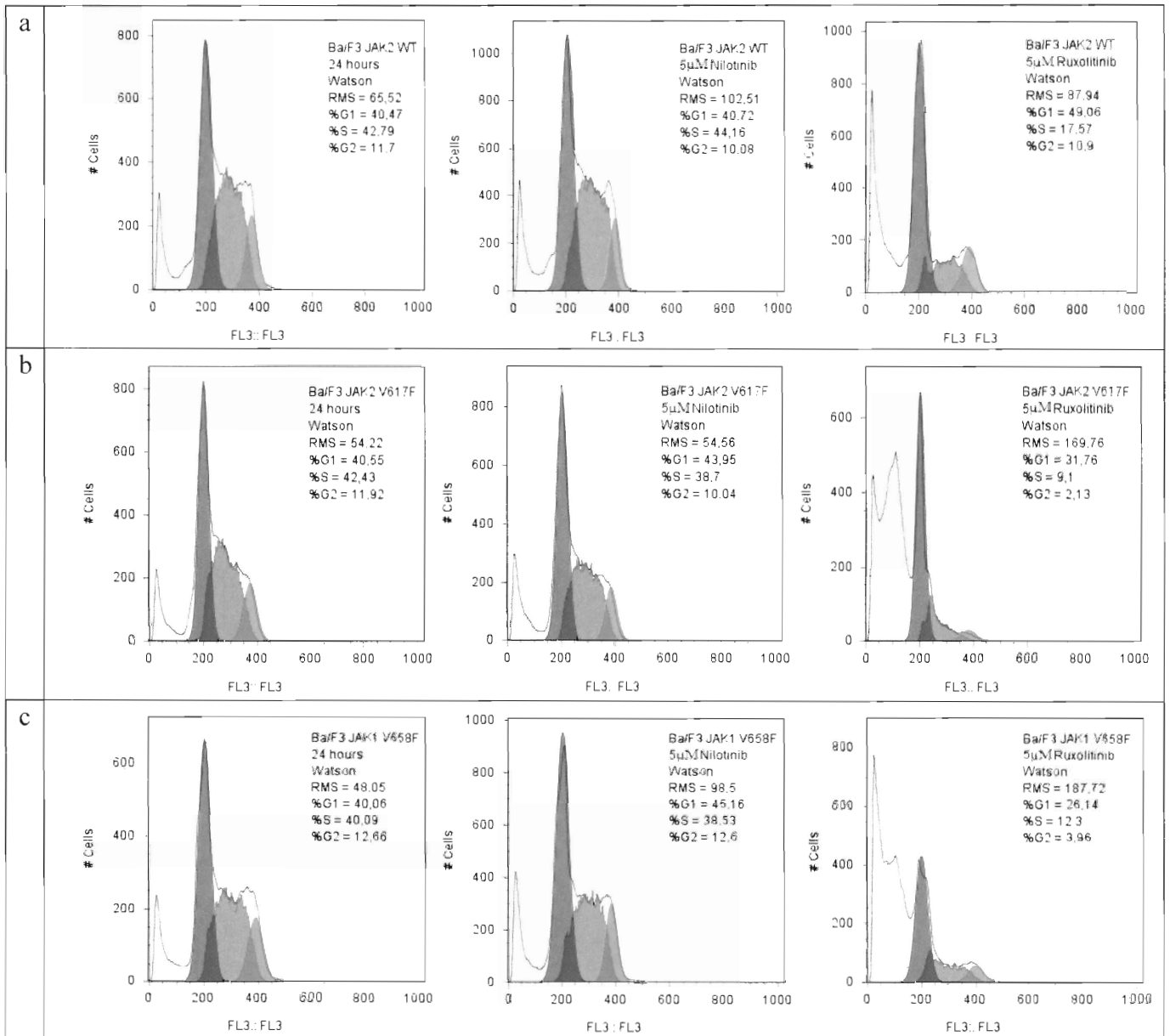


Figura 6.

Tabel 1.

	SubG0	G1	S	G2
Ba/F3 JAK2 WT	5,04	40,47	42,79	11,7
Ba/F3 JAK2 WT 5 μ M Nilotinib	5,04	40,72	44,16	10,08
Ba/F3 JAK2 WT 5 μ M Ruxolitinib	22,47	49,06	17,57	10,9
Ba/F3 JAK2 V617F	5,1	40,55	42,43	11,92
Ba/F3 JAK2 V617F 5 μ M Nilotinib	7,31	43,95	38,7	10,04
Ba/F3 JAK2 V617F 5 μ M Ruxolitinib	57,01	31,76	9,1	2,13
Ba/F3 JAK1 V658F	7,19	40,06	40,09	12,66
Ba/F3 JAK1 V658 5 μ M Nilotinib	3,71	45,16	38,53	12,6
Ba/F3 JAK1 V658 5 μ M Ruxolitinib	57,6	26,14	12,3	3,96

Tabel 2.

	A--	A+	A+-	A++
48h	Viabile	Necroza	Apotoza	Apoptoza secundara
Ba/F3 JAK2 WT	82,49	10,32	4,35	2,84
Ba/F3 JAK2 WT 5 μ M Nilotinib	63,31	22,44	3,68	10,58
Ba/F3 JAK2 WT 5 μ M Ruxolitinib	37,57	30,33	2,65	29,46
Ba/F3 JAK2 V617F	88,46	9,14	1,41	0,98
Ba/F3 JAK2 V617F 5 μ M Nilotinib	84,95	10,91	1,58	2,56
Ba/F3 JAK2 V617F 5 μ M Ruxolitinib	36,95	31,03	4,4	27,62
Ba/F3 JAK1 V658F	82,5	13,12	0,44	3,94
Ba/F3 JAK1 V658 5 μ M Nilotinib	79,65	14,16	0,78	5,41
Ba/F3 JAK1 V658 5 μ M Ruxolitinib	14,89	59,57	0,76	24,79