



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ Número de publicación: **2 240 957**

⑤① Int. Cl.7: **C12Q 1/68**

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑧⑥ Número de solicitud europea: **91914376 .8**

⑧⑥ Fecha de presentación : **07.08.1991**

⑧⑦ Número de publicación de la solicitud: **0542830**

⑧⑦ Fecha de publicación de la solicitud: **26.05.1993**

⑤④ Título: **Técnicas y composiciones de detección y evaluación de la transducción intracelular de una señal extracelular.**

③⑩ Prioridad: **07.08.1990 US 563751**

④⑤ Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.10.2005

④⑤ Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.10.2005

⑦③ Titular/es: **Merck & Co., Inc.**
1 Merck Drive, P.O. Box 100
White House Station, New Jersey 08889, US

⑦② Inventor/es: **Harpold, Michael, Miller y**
Brust, Paul

⑦④ Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 240 957 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Técnicas y composiciones de detección y evaluación de la transducción intracelular de una señal extracelular.

5 Esta invención se relaciona con métodos de identificación y evaluación de las propiedades farmacológicas de compuestos que modulan las actividades de las proteínas de la superficie celular, a saber, de los receptores copulados a proteína G. Esta invención se relaciona también con ensayos que valoran la transducción intracelular de una señal extracelular usando células recombinantes que se modifican por introducción de un gen informador bajo el control de un promotor regulable y que expresan proteínas de la superficie celular cuyas actividades están moduladas por la señal extracelular y cuyas actividades indirecta o directamente regulan la expresión del promotor.

10 En particular, esta invención se relaciona con métodos para detectar y valorar la capacidad de sustancias para actuar como agonistas o antagonistas de la actividad de receptores específicos localizados en la superficie celular, a saber, de receptores copulados a proteína G.

15 Los organismos eucarióticos están compuestos por una multitud de células, tejidos y órganos que deben reaccionar rápidamente y de un modo concertado a los estímulos ambientales, incluyendo estímulos externos e internos, y a los estímulos intercelulares e intracelulares. Para que los organismos eucarióticos lo hagan, se han desarrollado mecanismos y rutas bioquímicas para conseguir respuestas rápidas y concertadas. Las proteínas de la superficie celular que se extienden por la membrana celular proporcionan un medio para conseguir estas respuestas.

20 Las proteínas de la superficie celular permiten la transducción intracelular de señales extracelulares. Las proteínas de la superficie celular proporcionan a las células eucarióticas, así como a las procarióticas, un medio para detectar señales extracelulares y transducir dichas señales intracelularmente de un modo que da como resultado en último lugar una respuesta celular o una respuesta tisular u orgánica concertada. Las proteínas de la superficie celular, transmitiendo intracelularmente información concerniente al ambiente extracelular a través de rutas intracelulares específicas, inducen una respuesta apropiada a un estímulo particular. La respuesta puede ser inmediata y transitoria, lenta y mantenida, o alguna mezcla de éstas. En virtud de una serie de proteínas de superficie de membrana variadas, las células eucarióticas son exquisitamente sensibles a su ambiente.

30 Las moléculas de señales extracelulares, tales como las hormonas del crecimiento, los vasodilatadores y los neurotransmisores, ejercen sus efectos, al menos en parte, a través de la interacción con las proteínas de la superficie celular. Por ejemplo, algunas moléculas de señales extracelulares causan cambios en la transcripción de genes diana mediante cambios en los niveles de segundos mensajeros, tales como el AMPc. Otras señales alteran indirectamente la expresión génica activando la expresión de genes, tales como los genes inmediatos-precoces que codifican para proteínas reguladoras, que a su vez activan la expresión de otros genes que codifican para proteínas reguladoras de la transcripción. Por ejemplo, la expresión de genes neuronales está modulada por numerosas señales extracelulares, incluyendo los neurotransmisores y la actividad eléctrica de la membrana. Las señales trans-sinápticas causan respuestas rápidas en neuronas, que se producen a lo largo de un período de tiempo que varía entre milisegundos, tales como la apertura de canales abiertos por ligandos, y segundos y minutos, tales como los fenómenos mediados por segundos mensajeros. Los genes en células neurales que responden a la estimulación trans-sináptica y a la actividad eléctrica de la membrana incluyen genes, llamados genes inmediatos-precoces, cuya transcripción se activa rápidamente en cuestión de minutos y de forma transitoria (véase, por ejemplo, Sheng y col. (1990), *Neuron* 4: 477-485) y genes cuya expresión requiere síntesis de proteínas y cuya expresión es inducida o alterada en el transcurso de horas.

45 Los receptores y los canales iónicos de la superficie celular están entre las proteínas de la superficie celular que responden a señales extracelulares e inician los sucesos que conducen a esta variada expresión génica y respuesta. Los canales iónicos y los receptores localizados en la superficie celular son proteínas de la membrana de la superficie celular ubicuas y fisiológicamente importantes. Tienen un papel central en la regulación de los niveles intracelulares de diversos iones y agentes químicos, muchos de los cuales son importantes para la viabilidad y función de la célula.

Canales iónicos

55 Los canales iónicos, que aparecen en una amplia variedad de organismos, incluidos los hongos, las plantas y los animales, son proteínas que se extienden por la membrana y que permiten la entrada controlada de diversos iones en las células desde el fluido extracelular. Funcionan como poros con compuerta en la membrana celular y permiten el flujo de iones en gradientes eléctricos o químicos. Los canales iónicos se clasifican en base al ion que entra en la célula a través del canal.

Canales iónicos abiertos por voltaje

60 La modulación del transporte iónico de transmembrana es con frecuencia el fenómeno primario en el acoplamiento de las señales extracelulares a los fenómenos intracelulares. Los flujos iónicos tienen papeles esenciales en el estímulo-secreción, el estímulo-mitosis y el estímulo-contracción (véase Curran y col. (1986), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 8521-8524). Por ejemplo, la apertura por voltaje de los iones calcio media en el acoplamiento de los estímulos despolarizantes de la membrana a la activación transcripcional del gen *c-fos*. La elevación del calcio intracelular activa un sistema de calmodulina/calmodulina kinasa que induce la expresión de *c-fos*.

ES 2 240 957 T3

Canales de sodio

Los canales de sodio son responsables de la fase de elevación del potencial de acción en células excitables. Los canales de sodio sienten el campo eléctrico de transmembrana y responden abriendo un canal iónico de transmembrana con especificidad por el Na^+ .

Los canales de sodio han sido estudiados y están bien caracterizados. Se han clonado los genes codificantes del canal del sodio, que es una glicoproteína, a partir de numerosas fuentes y se han usado para expresar corrientes de sodio dependientes del voltaje cuando se inyectan en oocitos de *Xenopus* (véase Noda y col. (1986), *Nature* 322: 826-828).

Canales de calcio

Los canales de calcio son proteínas de múltiples subunidades que se extienden por la membrana y que permiten la entrada controlada de iones Ca^{+2} en las células desde el fluido extracelular. Todas las células a través de todo el reino animal, y al menos algunas células bacterianas, fúngicas y vegetales, poseen uno o más tipos de canales de calcio.

El tipo más común de canal de calcio es dependiente del voltaje. En un canal dependiente del voltaje, la “apertura” para permitir que se inicie un flujo de iones Ca^{+2} hacia el interior de las células requiere una despolarización a un cierto nivel de la diferencia de potencial entre el interior de la célula portadora del canal y el ambiente extracelular. La velocidad de flujo de Ca^{+2} hacia el interior celular depende de esta diferencia de potencial. Todas las células “excitables” de animales, tales como las neuronas del sistema nervioso central, las células de los nervios periféricos y las células musculares, incluyendo las de los músculos esqueléticos, las de los músculos cardíacos y las de los músculos lisos venosos y arteriales, tienen canales de calcio dependientes del voltaje. Se piensa que los canales de calcio dependientes del voltaje consisten en dos grandes subunidades, de entre aproximadamente 130 y aproximadamente 200 kilodaltons (“kD”) de peso molecular, y una serie (generalmente se piensa que de una a tres) de diferentes subunidades más pequeñas, de menos de aproximadamente 60 kD de peso molecular. Al menos una de las subunidades mayores y posiblemente algunas de las menores están glicosiladas. Algunas de las subunidades son capaces de fosforilarse.

Los canales de Ca^{2+} dependientes del voltaje regulan la función celular en células excitables en muchos tejidos, incluyendo el cerebro y las células musculares. En las células excitables, estos canales de calcio median en la despolarización dependiente de calcio y traducen los cambios en el potencial de membrana en una señal de calcio intracelular que inicia funciones celulares específicas.

Los antagonistas del calcio bloquean el flujo a través de los canales del calcio y se unen a distintos sitios, que se llaman el receptor de antagonistas del calcio. Los fármacos antagonistas del Ca^{2+} se unen específicamente a los canales del Ca^{2+} y se usan para tratar enfermedades cardiovasculares. Se sabe que una variedad de compuestos orgánicos, tales como los derivados de 1,4-dihidropiridina (DHP), modulan el flujo iónico a través de los canales de calcio lentos de tipo L. El canal de calcio de tipo L sensible a DHP es una ruta de entrada principal del Ca^{2+} extracelular.

Canales iónicos abiertos por ligandos

Entre los canales iónicos abiertos por ligandos, se incluyen los receptores nicotínicos de acetilcolina, los receptores del ácido gamma-aminobutírico (“GABA”) y los receptores de aminoácidos excitatorios.

Debido a las consecuencias para la salud de la nicotina derivada del tabaco, que es un análogo de neurotransmisores, el receptor nicotínico de acetilcolina, que se expresa en el sistema nervioso central, ha sido ampliamente estudiado. El receptor nicotínico de acetilcolina es un canal iónico abierto por ligando que se une al neurotransmisor, la acetilcolina (“ACh”) y media en la transmisión sináptica entre nervio y músculo (véase, por ejemplo, Claudio y col. (1987), *Science* 238: 1688-1694). El receptor contiene cuatro cadenas polipeptídicas, α , β , τ y δ , con una estequiometría $\alpha_2\beta\tau\delta$. Estudios de clonación han identificado varios genes que codifican para las diversas subunidades. Los genes tienen distintos patrones de expresión en diversos tejidos y, por lo tanto, forman una variedad de subtipos de receptores, que son farmacológica y funcionalmente diversos.

La línea celular PC12, que es una línea de células de feocromocitoma de rata, expresa tanto receptores de acetilcolina nicotínico como muscarínicos. El proto-oncogén *c-fos* y la actina son inducidos en cuestión de minutos tras la unión de agonistas nicotínicos a sus receptores en células PC12. El gen *c-fos* es también inducido por tratamiento de células PC12 con factor de crecimiento de los nervios (“NGF”). La inducción por nicotina y NGF, sin embargo, exhibe diferentes dependencias del flujo de Ca^{+2} extracelular hacia el interior de la célula. La inducción por nicotina se basa en el flujo de los canales de Ca^{+2} , mientras que la inducción por NGF es dependiente del Ca^{2+} extracelular.

Receptores de la superficie celular

Los receptores localizados en la superficie celular son proteínas que se extienden por la membrana y que se unen a moléculas de señalización extracelulares o detectan cambios en el ambiente extracelular y transmiten la señal a través de rutas de transducción de señal para producir una respuesta celular. Los receptores de la superficie celular se unen a polipéptidos de señal circulantes, tales como factores de crecimiento y hormonas, como etapa de iniciación en la inducción de numerosas rutas intracelulares. Los receptores se clasifican en base al tipo particular de ruta que

se induce. Se incluyen entre estas clases de receptores los que se unen a factores de crecimiento y tienen actividad intrínseca de tirosina kinasa, tales como los receptores del factor de crecimiento que se une a heparina (“HBGF”), y los que se copulan a proteínas efectoras a través de proteínas reguladoras que se unen a nucleótidos de guanina, a los que se hace referencia como receptores copulados a proteínas G y proteínas G, respectivamente.

Receptores copulados a G

Las rutas de señalización de transmembrana de proteínas G consisten en tres proteínas: receptores, proteínas G y efectores. Las proteínas G, que son los intermediarios en las rutas de señalización de transmembrana, son heterómeros y consisten en subunidades α , β y γ . Entre los miembros de una familia de proteínas G, las subunidades α difieren. Las funciones de las proteínas G se regulan por la asociación cíclica de GTP con la subunidad α , seguido de hidrólisis de GTP a GDP y disociación del GDP.

Los receptores copulados a proteínas G son una clase diversa de receptores que median en la transducción de señal uniéndose a proteínas G. La transducción de señal se inicia por unión de ligandos al receptor de la membrana celular, que estimula la unión del receptor a la proteína G. La interacción receptor-proteína G libera GDP, que se une específicamente a la proteína G y permite la unión de GTP, que activa la proteína G. La proteína G activada se disocia del receptor y activa la proteína efectora, que regula los niveles intracelulares de segundos mensajeros específicos. Como ejemplos de dichas proteínas efectoras, se incluyen la adenil ciclasa, la guanil ciclasa, la fosfolipasa C y otras.

Se sabe que los receptores, que son glicoproteínas, copulados a proteínas G, comparten cierta similitudes y homologías estructurales (véanse, por ejemplo, Gilman, A.G., *Ann. Rev. Biochem.* 56: 615-649 (1987); Strader, C.D. y col., *The FASEB Journal* 3: 1825-1832 (1989); Kobilka, B.K. y col., *Nature* 329: 75-79 (1985), y Young y col., *Cell* 45: 711-719 (1986)). Entre los receptores copulados a proteínas G que han sido identificados y clonados, están el receptor de la sustancia K, el receptor de angiotensina, los receptores α - y β -adrenérgicos y los receptores de serotonina. Los receptores copulados a proteínas G comparten una unidad estructural conservada. Las características estructurales generales y comunes de los receptores copulados a proteínas G son la existencia de siete tramos hidrofóbicos de aproximadamente 20-25 aminoácidos cada uno rodeados por siete regiones hidrofílicas de longitud variable. Se ha postulado que cada una de las siete regiones hidrofóbicas forma una α -hélice de transmembrana y que las regiones hidrofílicas intermedias forman bucles expuestos de forma alternante intracelular y extracelularmente. El tercer bucle citosólico entre los dominios de transmembrana cinco y seis es el dominio intracelular responsable de la interacción con las proteínas G.

Se sabe que los receptores copulados a proteínas G son inducibles. Esta inducibilidad fue originalmente descrita en eucariontes inferiores. Por ejemplo, el receptor de AMPc del moho del limo celular, *Dictyostelium*, es inducido durante la diferenciación (Klein y col., *Science* 241: 1467-1472 (1988)). Durante la ruta de diferenciación de *Dictyostelium discoideum*, el AMPc induce la expresión a alto nivel de su receptor copulado a proteínas G. Este receptor transduce la señal para inducir la expresión de otros genes implicados en la quimiotaxis, lo que permite que los agregados multicelulares se alineen, se organicen y formen tallos (véanse Firtel, R.A. y col., *Cell* 58: 235-239 (1989), y Devreotes, P., *Science* 245: 1054-1058 (1989)).

Factores de crecimiento y receptores de factores de crecimiento

Los factores de crecimiento polipeptídicos son modulares de la proliferación y diferenciación celular cuyas funciones biológicas están mediadas por la interacción del factor de crecimiento con receptores de la superficie celular y las posteriores alteraciones en la expresión génica. Los factores de crecimiento se unen a receptores específicos y parecen inducir la fosforilación de la tirosina y la síntesis de ARNm *c-fos*. Además, al menos algunos factores de crecimiento, tales como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (Yeh y col. (1987), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84: 2317) y el factor-2 de crecimiento que se une a la heparina o el factor de crecimiento de fibroblastos básico (véase Bouche y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84: 6770), se translocan al núcleo.

La activación de los receptores de factores de crecimiento por interacción con factores de crecimiento específicos o con agentes tales como el acetato métrico de forbol (“PMA”) activa la proteína kinasa C, que es una familia de proteína kinasas activadas por fosfolípidos y calcio. Esta activación da lugar a la transcripción de una variedad de genes codificantes de factores de transcripción proto-oncogénicos, incluyendo *c-fos*, *c-myc* y *c-jun*, proteasas, inhibidores de proteasas, incluyendo la colagenasa de tipo I y el inhibidor del activador del plasminógeno, y moléculas de adhesión, incluyendo la molécula I de adhesión intercelular. La activación de la proteína kinasa C antagoniza la actividad de los factores de crecimiento mediante la rápida fosforilación de los receptores de los factores de crecimiento, que reduce así la actividad de la tirosina kinasa.

La interacción del factor de crecimiento de los nervios (“NGF”) con su receptor es típica de la variedad de respuestas que una señal extracelular tal induce. El NGF es una hormona de crecimiento polipeptídica necesaria para la diferenciación y el crecimiento de la neurona sensorial derivada de las crestas neurales. El NGF se une a su receptor específico de la superficie celular y se transporta de un modo retrógrado al cuerpo celular (véase Changelian y col. (1989), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 377-381). Esto inicia una cascada de sucesos intracelulares, que culminan en un fenotipo diferenciado. Se usan células PC12, que son una línea de células de feocromocitoma de rata, como modelo para el estudio de la diferenciación mediada por NGF. Cuando se tratan con NGF, las células PC12 cambian de células de tipo cromafín adrenal replicante a células de tipo neurona simpática eléctricamente excitable.

ES 2 240 957 T3

Concomitantemente con los cambios fenotípicos, hay inducción y expresión de genes específicos. La unión de NGF a células PC12 induce la expresión inmediata y rápida de determinados genes, incluyendo los genes *c-fos*, NGF1-A y NGF1-B, a los que se hace referencia como genes precoces. Se piensa que dichos genes precoces codifican para reguladores transcripcionales. El producto del gen NGF1-A contiene dominios de “dedos de zinc” que se repiten en tándem y que son característicos de proteínas que se unen a ADN y la proteína NGF1-B es homóloga a miembros de la familia de receptores de glucocorticoides y, por lo tanto, pueden funcionar como un modulador dependiente de ligando de la transcripción. El producto del gen *c-fos*, FOS, parece funcionar como una molécula reguladora transcripcional.

El gen c-fos y genes relacionados

Como se ha discutido anteriormente, la inducción de la expresión del gen *c-fos* es un fenómeno común a una serie de rutas de respuesta que se inician por la actividad de una variedad de proteínas de la superficie celular.

El producto génico *c-fos*, FOS, se asocia con el activador de la transcripción JUN, que es el producto del gen *c-jun*, para formar un complejo que forma un complejo de activación de la transcripción, AP-1. La transcripción tanto de *c-fos* como de *c-jun* es inducida rápida y transitoriamente después de la estimulación. Los ARNm inducidos se acumulan durante 1-2 horas en el citoplasma, donde se traducen las proteínas FOS y JUN, que tienen una vida corta, y se translocan después al núcleo, para formar un complejo proteico heterodimérico que se une al elemento regulador del ADN, el sitio de unión a AP-1.

Los genes *c-fos* y *c-jun* son miembros de familias génicas que codifican para proteínas que participan en la formación de complejos heterodiméricos que interactúan con los sitios de unión a AP-1. El factor de transcripción AP-1 está compuesto por varios complejos proteicos cuyas concentraciones cambian con la estimulación celular. Estos complejos interactúan específicamente con unidad de secuencia nucleotídica núcleo de siete bases, que se sabe que es un constituyente relativamente común de elementos reguladores transcripcionales tanto positivos como negativos y que se requiere para niveles tanto basales como inducidos de expresión génica.

Los productos génicos, FOS y JUN, cooperan en la regulación de genes diana que subyacen a muchas respuestas celulares y adaptativas al ambiente. Están implicados en una serie de procesos neurofisiológicos. Por ejemplo, en células PC12, FOS y JUN son inducidos por estímulos farmacológicos, eléctricos, quirúrgicos y fisiológicos, factores neurotróficos, neurotransmisores, condiciones despolarizantes y otros agentes que causan un influxo de iones Ca^{2+} a través de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje. Estos estímulos o señales causan la inducción de *c-fos* por interacción con elementos reguladores localizados en las regiones flanqueantes 5' del gen. Algunos estímulos extracelulares también conducen a cambios en el grado y tipo de modificación post-traduccion, que implica fosforilación de la serina y de la treonina, de la proteína FOS.

Así, la inducción de *c-fos* implica distintas rutas de segundos mensajeros que actúan mediante elementos reguladores independientes y que modifican diferencialmente el producto génico resultante, FOS, que a su vez interactúa de diferentes maneras con proteína JUN diferencialmente modificada. Por lo tanto, una multitud de fenómenos extracelulares inducen la expresión de un pequeño número de proteínas inducibles que forman una variedad de complejos proteicos que pueden unirse diferencialmente a elementos reguladores de ADN que contienen sitios de unión a AP-1.

Por lo tanto, numerosas proteínas de la superficie celular pueden actuar por rutas de transducción solapantes y transducir señales extracelulares que en último lugar inducen una variedad de respuestas.

Proteínas de la superficie celular e implicaciones farmacológicas

Las proteínas de la superficie celular, por lo tanto, juegan un importante papel fisiológico. Existen muchos usos farmacológicos potenciales para compuestos que interactúan con, y modulan, la actividad de las proteínas de la superficie celular. Por ejemplo, los canales del calcio tienen un papel central en la regulación de los niveles intracelulares de Ca^{2+} , que influyen en la viabilidad y función celular. Las concentraciones de Ca^{2+} intracelulares están implicadas en una serie de procesos vitales en animales, tales como la liberación de neurotransmisores, la contracción muscular, la actividad marcapasos y la secreción de hormonas y otras sustancias. Otras moléculas de la superficie celular tienen también papeles fisiológicos vitales. Por ejemplo, el receptor nicotínico de acetilcolina abierto por ligandos puede mediar en los efectos perjudiciales de la nicotina derivada del tabaco. Se cree que los factores de crecimiento y otros mitógenos que inducen la proliferación celular y el crecimiento celular tienen un papel en el crecimiento de tumores, que frecuentemente llevan receptores de la superficie celular identificables específicos para factores de crecimiento y otras señales extracelulares.

Se piensa que una serie de compuestos útiles en el tratamiento de diversas enfermedades en animales, incluidos los humanos, ejercen sus efectos beneficiosos por sus interacciones con las proteínas de la superficie celular. Los vasodilatadores y otros fármacos cardiovasculares modulan las actividades de los canales de calcio dependientes de voltaje. Muchos de estos compuestos se unen a los canales del calcio y bloquean el influxo de Ca^{2+} a las células, o reducen su velocidad, en respuesta a la despolarización de la membrana celular. Se han usado factores de crecimiento para dirigir toxinas a células tumorales que expresan receptores de factores de crecimiento.

La comprensión de la farmacología de compuestos que interactúan con canales iónicos y/o receptores localizados en la superficie celular, y la capacidad de identificar racionalmente compuestos que interactúan específicamente con

canales iónicos y/o receptores localizados en la superficie celular para obtener efectos terapéuticos deseados, se han visto obstaculizadas por la falta de medios rápidos y efectivos para identificar aquellos compuestos que interactúan con canales iónicos específicos y/o receptores localizados en la superficie celular específicos.

5 La disponibilidad de medios rápidos y efectivos para identificar compuestos que modulan o interactúan con canales iónicos y/o receptores localizados en la superficie celular permitiría el rastreo rápido de un gran número de compuestos para identificar aquellos candidatos adecuados para posteriores estudios en profundidad de aplicaciones terapéuticas.

10 Stumpo y col. (J. Biol. Chem., 236, pp. 1611-14, 1988) y Chen y col. (Nature, 328, pp. 820-23, 1987) describen el uso de construcciones génicas informadoras para investigar los mecanismos de la actividad del receptor de la tirosina kinasa. WO 89/09834 describe el uso de dichas construcciones en el contexto de los canales iónicos abiertos por voltaje, específicamente de los canales del calcio.

15 Por lo tanto, es un objeto de esta invención proporcionar un ensayo para estudiar e identificar compuestos farmacéuticamente efectivos potenciales que interactúen específicamente con las proteínas de la superficie celular y modulen su actividad, particularmente con receptores copulados a proteínas G.

20 Es también un objeto de esta invención proporcionar células recombinantes que expresan receptores de la superficie celular específicos, receptores copulados a proteínas G, y que han sido modificadas para uso en ensayos que detectan compuestos que interactúan con estos receptores de la superficie celular o modulan sus actividades.

Resumen de la invención

25 Se describen, aunque no forman parte de la invención, células recombinantes que son útiles para estudiar compuestos en cuanto a su actividad agonista o antagonista con respecto a receptores copulados a proteínas G. Las células recombinantes son sometidas a ingeniería genética para expresar los receptores específicos localizados en la superficie celular y también contienen construcciones de ADN que incluyen un gen informador, una región promotora y otras secuencias reguladoras transcripcionales de nucleótidos que modulan el nivel de transcripción procedente del promotor. Las secuencias reguladoras transcripcionales y/o la región promotora seleccionadas están reguladas, directa o indirectamente, por señales intracelulares que resultan de la interacción de la proteína de la superficie celular con una señal extracelular. Se facilitan métodos de ensayo basados en la transcripción que usan células recombinantes para detectar señales extracelulares que actúan como agonistas o antagonistas de la actividad de estas proteínas de la superficie celular.

35 También se describen, aunque no forman parte de la invención, métodos para identificar señales extracelulares que modulan la transcripción mediada por proteínas de la superficie celular. Estos métodos comparan la diferencia en la cantidad de transcripción de un gen informador en células recombinantes en presencia de la señal con la cantidad de transcripción en ausencia de la señal o con la cantidad de transcripción en una célula control que no expresa la proteína de la superficie celular. Las células recombinantes usadas en estos métodos expresan la proteína de la superficie celular y contienen una construcción de gen informador en donde la transcripción del gen informador está bajo el control de una secuencia de control transcripcional promotora cuya actividad está regulada por la proteína de la superficie celular. Las células recombinantes pueden expresar endógenamente la proteína de la superficie celular o pueden expresar ADN heterólogo que codifique para la proteína de la superficie celular.

45 Las proteínas de la superficie celular son receptores copulados a proteínas G. Específicamente, la invención se relaciona con un método para estudiar compuestos de ensayo con objeto de determinar la actividad agonista o antagonista de cada uno de dichos compuestos con respecto a un receptor copulado a proteína G de la superficie celular, consistente en las siguientes etapas:

50 a) poner en contacto una célula eucariótica que contiene un receptor copulado a proteína G heterólogo expresado a partir de un gen heterólogo y una construcción de gen informador heterólogo con el compuesto,

55 donde la construcción del gen informador consiste en un gen informador bajo el control de al menos un elemento de control transcripcional que responde a una condición intracelular que se produce cuando dicho receptor interactúa con el compuesto, y

b) medir la cantidad de transcripción o traducción del gen informador.

60 En realizaciones más preferidas, las proteínas de la superficie celular son cualesquiera de los receptores muscarínicos, receptores adrenérgicos, receptores de dopamina y receptores de serotonina. La región promotora y las secuencias reguladoras de la transcripción son cualesquiera del promotor del gen *c-fos* y secuencias nucleotídicas reguladoras transcripcionales derivadas del gen *c-fos*, el promotor del gen del péptido intestinal vasoactivo ("VIP"), el promotor del gen de somatostatina, el promotor de la proencefalina, el promotor del gen de la fosfoenolpiruvato carboxikinasa y el promotor del gen del factor de crecimiento de los nervios 1 A. Los genes informadores son cualesquiera de los genes codificantes de la cloranfenicol acetiltransferasa bacteriana, de la luciferasa de luciérnaga, de la luciferasa bacteriana, de la β -galactosidasa y de la fosfatasa alcalina y otros elementos reguladores transcripcionales, incluyendo elementos

ES 2 240 957 T3

que responden al monofosfato cíclico de adenosina, y elementos que responden a los niveles intracelulares de iones calcio.

5 En la mayoría de las realizaciones preferidas, los receptores son receptores muscarínicos y el promotor y otras secuencias reguladoras derivan del gen c-fos, incluyendo la región promotora c-fos y el elemento regulador intragénico del gen c-fos (FIRE).

10 También se facilitan métodos rápidos, fiables y sensibles para determinar si las células están produciendo receptores localizados en la superficie funcionales específicos de célula, incluyendo subtipos de receptores específicos.

15 Los ensayos basados en la transcripción proporcionan medios rápidos, fiables y sensibles para identificar compuestos que interaccionan con los receptores específicos localizados en la superficie celular y afectan así a su función. En particular, los ensayos proporcionan medios para rastrear o detectar compuestos farmacéuticos potenciales. Dependiendo de la afinidad del compuesto por la proteína de la superficie celular o de la naturaleza de la interacción, los ensayos tendrían que poder detectar compuestos a concentraciones en el rango nanomolar y, posiblemente, inferior.

20 Al desarrollar ensayos con células recombinantes, se reconoció que un hilo común entre las respuestas tisulares concertadas y las respuestas y actividades celulares, tales como la contracción muscular, la vasodilatación y el crecimiento y la proliferación celular, que están mediadas por proteínas de la superficie de la membrana, es que la transcripción de genes específicos se inicia rápidamente, en cuestión de minutos desde la exposición de la proteína de la membrana de la superficie celular a una señal extracelular que induce dicha actividad. Así, la actividad de dichos promotores y la transcripción de genes controlada por los promotores refleja la actividad de la proteína de la superficie en virtud de la transducción de una señal intracelular.

25 La señal intracelular que se transduce se inicia generalmente gracias a la interacción de una señal extracelular, particularmente de un ligando, con un receptor copulado a proteínas G presente sobre la superficie celular. Esta interacción pone en marcha una cascada de sucesos intracelulares, cuya última consecuencia es un cambio rápido y detectable en la transcripción o traducción de un gen. Seleccionando promotores que responden a las señales intracelulares transducidas y uniendo operativamente los promotores seleccionados a genes informadores, cuya transcripción, traducción o actividad final es fácilmente detectable y mensurable, el ensayo basado en la transcripción proporciona una rápida indicación de si un receptor o canal iónico específico interacciona con un compuesto de ensayo de algún modo que influya en la transducción intracelular. La expresión del gen informador, por lo tanto, proporciona una valiosa herramienta de rastreo para el desarrollo de compuestos que actúan como agonistas o antagonistas de estos receptores celulares.

35 Los ensayos de esta invención miden la etapa final de la cascada de sucesos antes descrita, la expresión de un gen informador. Se consigue esto mediante el uso de una construcción de expresión de un gen informador que contiene un gen informador y un elemento de control transcripcional que responde a la condición intracelular que se produce cuando el receptor celular interacciona con un compuesto que tiene propiedades agonistas o antagonistas con respecto a dicho receptor. Se pone el gen informador en asociación operativa con el elemento de control transcripcional. La aparición del producto del gen informador sirve como indicación fácilmente observada de la transcripción.

Definiciones

45 A menos que se definan de algún otro modo, todos los términos técnicos y científicos tienen aquí el mismo significado que el que comúnmente entiende un experto en la técnica a la que esta invención pertenece.

50 Tal como se usan aquí, las células recombinantes incluyen cualquier célula que haya sido modificada por la introducción de ADN heterólogo. Las células control incluyen células que son substancialmente idénticas a las células recombinantes, pero que no expresan la una o más proteínas codificadas por el ADN heterólogo. Por ejemplo, se producen las células recombinantes a partir de células por introducción de ADN que codifica para una construcción de gen informador y eventualmente de un ADN heterólogo codificante de un receptor de la superficie celular. Las células control, con respecto a dichas células recombinantes, son células que, o bien no incluyen o expresan la construcción del gen informador, o bien no incluyen o expresan el receptor.

55 Tal como se usa aquí, ADN heterólogo incluye ADN que no aparece de forma natural como parte del genoma en el que está presente o que se encuentra en una localización o localizaciones del genoma que difieren de aquéllas en las que aparece en la naturaleza. El ADN heterólogo no es endógeno para la célula en la que se introduce, sino que se ha obtenido de otra célula. En general, aunque no necesariamente, dicho ADN codifica para ARN y proteínas que no son normalmente producidos por la célula en la que se expresa. También se puede hacer referencia al ADN heterólogo como ADN extraño. Cualquier ADN que un experto en la técnica reconocería o consideraría como heterólogo o extraño para la célula en la que se expresa es aquí incluido como ADN heterólogo. Como ejemplos de ADN heterólogo, se incluyen, aunque sin limitación, ADN que codifica para receptores, genes informadores, secuencias reguladoras de la transcripción y de la traducción y proteínas marcadoras seleccionables o rastreables, tales como una proteína que confiere resistencia a fármacos.

65 Tal como se usan aquí, las proteínas de la superficie celular incluyen moléculas que aparecen en la superficie de las células, que interaccionan con el ambiente extracelular y que transmiten o transducen la información concerniente

al ambiente intracelularmente, de un modo que finalmente modula la transcripción de promotores específicos, dando lugar a la transcripción de genes específicos.

5 Tal como se usan aquí, las señales extracelulares incluyen una molécula o un cambio en el ambiente que se transduce intracelularmente a través de las proteínas de la superficie celular que interactúan directamente o indirectamente con la señal. Una señal extracelular o una molécula efectora es cualquier compuesto o sustancia que de algún modo altera específicamente la actividad de una proteína de la superficie celular. Como ejemplos de dichas señales, se incluyen, aunque sin limitación, moléculas tales como acetilcolina, factores de crecimiento, hormonas y otras sustancias mitogénicas, tales como el acetato métrico de forbol ("PMA"), que se unen a los receptores de la superficie celular y modulan la actividad de dichos receptores. Por ejemplo, los antagonistas son señales extracelulares que bloquean o disminuyen la actividad de las proteínas de la superficie celular y los agonistas son ejemplos de señales extracelulares que potencian, inducen o aumentan de algún otro modo la actividad de las proteínas de la superficie celular.

15 Tal como se usan aquí, las señales extracelulares también incluyen sustancias hasta ahora no identificadas que modulan la actividad de la proteína de la superficie celular, afectando así a las funciones intracelulares, y que son agentes farmacológicos potenciales que pueden ser usados para tratar enfermedades específicas modulando la actividad de receptores copulados a proteínas G.

20 Tal como se usan aquí, los receptores que se estimulan mediante la acetilcolina son receptores nicotínicos y muscarínicos, que pueden distinguirse entre sí por métodos conocidos para los expertos en la técnica. Por ejemplo, se pueden distinguir los receptores nicotínicos y muscarínicos en base a su respuesta a los alcaloides nicotina y muscarina.

25 Tal como se usan aquí, los receptores muscarínicos se refieren colectivamente a cualquiera de las formas farmacológica o estructuralmente distinguibles de los receptores muscarínicos. Se hace referencia a cualquier forma particular mediante cualquier nomenclatura reconocida por los expertos en la técnica. Por ejemplo, se han representado los subtipos farmacológicamente definidos por una *M* mayúscula, es decir, M_1 , M_2 y M_3 , y se han representado las formas moleculares distinguibles por una *m* minúscula, es decir, m_1 , m_2 ... m_5 (véase, por ejemplo, Flier y col. (1989), *New Engl. J. Med.* 321: 1022-1029).

30 Tal como se usa aquí, una construcción de gen informador es una molécula de ADN que incluye un gen informador operativamente unido a secuencias para el control de la transcripción. La transcripción del gen informador es controlada por estas secuencias. La actividad de al menos una o más de estas secuencias control está directamente o indirectamente regulada por la proteína de la superficie celular. Las secuencias para el control de la transcripción incluyen el promotor y otras regiones reguladoras, tales como secuencias intensificadoras, que modulan la actividad del promotor, o secuencias control que modulan la actividad o eficiencia de la ARN polimerasa que reconoce el promotor, o secuencias control que son reconocidas por moléculas efectoras, incluyendo las que son específicamente inducidas por la interacción de una señal extracelular con una proteína de la superficie celular. Por ejemplo, se puede afectar a la modulación de la actividad del promotor alterando la unión de la ARN polimerasa a la región promotora o, alternativamente, interfiriendo con la iniciación de la transcripción o la elongación del ARNm. Dichas secuencias son aquí denominadas colectivamente elementos o secuencias para el control de la transcripción. Además, la construcción puede incluir secuencias de nucleótidos que alteren la traducción del ARNm resultante, alterando así la cantidad de producto del gen informador.

45 Tal como se utiliza aquí, el promotor se refiere a la región de ADN que está secuencia arriba con respecto a la dirección de la transcripción del sitio de iniciación de la transcripción. Incluye los sitios de unión a la ARN polimerasa y de imitación de la transcripción y cualesquiera otras regiones, incluyendo, aunque sin limitación, sitios de unión a proteínas represoras o activadoras, sitios que responden al calcio o al AMPc y cualesquiera secuencias tales de nucleótidos que los expertos en la técnica saben que alteran la cantidad de transcripción del promotor, ya sea directa o indirectamente.

50 Tal como se usa aquí, un promotor que está regulado o mediado por la actividad de una proteína de la superficie celular es un promotor cuya actividad cambia cuando se expone una célula a una señal extracelular particular en virtud de la presencia de proteínas de la superficie celular cuyas actividades están afectadas por la proteína extracelular. Por ejemplo, el promotor *c-fos*, que resulta específicamente activado con la interacción específica de determinadas señales extracelulares, tales como hormonas de crecimiento, con una proteína de la superficie celular, tal como un receptor de hormonas de crecimiento. En particular, la regulación de dichos promotores por la proteína de la superficie celular, aunque indirecta, se produce en cuestión de minutos de la interacción de la proteína de la superficie celular con la señal extracelular. Tal como se usa aquí, unión operativa se refiere a un fragmento de ADN, tal como una unión de un promotor a una molécula de ADN que se transcribe por la ARN polimerasa que se une al promotor, de tal forma que la región reguladora se sitúa apropiadamente para esta actividad. Así, un fragmento de ADN en unión operativa con un promotor está secuencia abajo, con respecto a la dirección de la transcripción, del promotor, está en el marco abierto de lectura correcto con respecto al sitio de iniciación de la transcripción y se inserta de tal forma que la elongación de la transcripción procede a través del fragmento de ADN.

65 *Ensayo basado en la transcripción*

Al llevar el ensayo a la práctica, se inserta una construcción de gen informador en una célula eucariótica para producir una célula recombinante que tiene presente en su superficie una proteína de superficie celular del tipo específico

ES 2 240 957 T3

antes descrito. El receptor de la superficie celular puede expresarse endógenamente o puede expresarse a partir de un gen heterólogo que se ha introducido en la célula. Los métodos para introducir ADN heterólogo en células eucarióticas son bien conocidos en la técnica y se puede usar cualquiera de tales métodos. Además, el ADN codificante de varias proteínas de la superficie celular es conocido para los expertos en la técnica o puede ser clonado por cualquier método conocido para los expertos en la técnica.

Se pone en contacto la célula recombinante con un compuesto de ensayo y se mide el nivel de expresión del gen informador. Se puede efectuar el contacto en cualquier vehículo y se pueden hacer las pruebas por cualquier medio usando cualquier protocolo, tal como la dilución seriada, para valorar interacciones moleculares específicas conocidas para los expertos en la técnica.

Después de poner en contacto la célula recombinante durante un tiempo suficiente como para efectuar cualquier interacción, se mide el nivel de expresión génica. Se puede determinar empíricamente la cantidad de tiempo necesaria para efectuar dichas interacciones, tal como desarrollando un curso temporal y midiendo el nivel de transcripción en función del tiempo.

La cantidad de transcripción puede ser determinada usando cualquier método conocido para los expertos en la técnica como adecuado. Por ejemplo, se puede detectar la expresión de ARNm específico usando Northern blots, o se puede identificar un producto proteico específico mediante una tinción característica.

Se compara entonces la cantidad de transcripción con la cantidad de transcripción en la misma célula en ausencia del compuesto de ensayo, o se puede comparar con la cantidad de transcripción en una célula substancialmente idéntica que carece de los receptores específicos. Una célula substancialmente idéntica puede derivar de las mismas células a partir de las cuales se preparó la célula recombinante, pero que no habían sido modificadas por introducción de ADN heterólogo. Alternativamente, puede tratarse de una célula en la que se eliminan los receptores específicos. Cualquier diferencia estadísticamente o de algún otro modo significativa en la cantidad de transcripción indica que el compuesto de ensayo ha alterado de alguna forma la actividad del receptor específico.

Si el compuesto de ensayo no parece aumentar, activar o inducir la actividad de la proteína de la superficie celular, se puede repetir el ensayo y modificarlo por introducción de una etapa en la cual se estudia primeramente la célula recombinante en cuanto a la capacidad de un agonista o activador conocido del receptor específico para activar la transcripción. Si se induce la transcripción, el compuesto de ensayo es entonces estudiado en cuanto a su capacidad para inhibir, bloquear o afectar de algún otro modo a la actividad del agonista.

El ensayo basado en la transcripción es útil para identificar compuestos que interaccionan con cualquier proteína de la superficie celular cuya actividad altere finalmente la expresión génica. En particular, se pueden utilizar los ensayos para estudiar interacciones funcionales ligando-receptor para receptores copulados a proteína G. Como ejemplos de éstos se incluyen:

Receptores copulados a proteína G: receptores adrenérgicos, receptores muscarínicos y similares.

Preparación de células recombinantes

Se puede usar cualquier célula transfectable que pueda expresar la proteína de la superficie celular deseada de una forma tal que la proteína funcione para transducir intracelularmente una señal extracelular. Las células pueden ser seleccionadas de tal forma que expresen endógenamente la proteína de la superficie celular, o pueden ser sometidas a ingeniería genética para hacerlo. Muchas de esas células son conocidas para los expertos en la técnica. Dichas células incluyen, aunque sin limitación, células Ltk⁻, células PC12 y células COS-7.

La preparación de células que expresen el receptor y una construcción de expresión de genes informadores y que sean útiles para estudiar compuestos con objeto de determinar sus actividades es ejemplificada en los Ejemplos que se facilitan aquí en relación a las líneas celulares Ltk⁻ y COS-7 de mamíferos, que expresan el receptor muscarínico humano de Tipo 1 (HM1) y que se transforman con una construcción de expresión génica de promotor *c-fos*-informador de CAT o con una construcción de expresión génica de promotor *c-fos*-informador de luciferasa.

Proteínas de la superficie celular

La proteína de la superficie celular puede expresarse endógenamente sobre la célula seleccionada o puede expresarse a partir de ADN clonado.

Como ejemplos de proteínas de la superficie celular, se incluyen, aunque sin limitación: receptores muscarínicos (por ejemplo, M2 humano (acceso del GenBank #M16404), M3 de rata (acceso del GenBank #M16407), M4 humano (acceso del GenBank #M16405), M5 humano (Bonner y col. (1988), *Neuron* 1: 403-410) y similares); receptores adrenérgicos (por ejemplo, β_1 humano (Frielle y col. (1987), *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84: 7920-7924), α_2 (Kobilka y col. (1987), *Science* 238: 650-656), β_2 de hámster (Dixon y col. (1986), *Nature* 321: 75-79) y similares); receptores de dopamina (por ejemplo, D2 humano (Stormann y col. (1990), *Molec. Pharm.* 37: 1-6), rata (Bunzow y col. (1988), *Nature* 336: 783-787) y similares, y receptores de serotonina (por ejemplo, 5HT_{1a} humano (Kobilka y col. (1987),

ES 2 240 957 T3

Nature 329: 75-79), 5HT2 de rata (Julius y col. (1990), *PNAS* 87: 928-932), 5HT1c de rata (Julius y col. (1988), *Science* 241: 558-564) y similares).

Construcciones de genes informadores

5 Se preparan construcciones de genes informadores uniendo operativamente un gen informador con al menos un elemento regulador de la transcripción. Si sólo se incluye un elemento regulador de la transcripción, debe ser un promotor regulable. Al menos uno de los elementos reguladores de la transcripción seleccionados debe ser regulado indirecta o directamente por la actividad del receptor de la superficie celular seleccionado, por lo cual se puede monitorizar la actividad del receptor por la transcripción de los genes informadores.

10 La construcción puede contener elementos reguladores de la transcripción adicionales, tales como una secuencia FIRE u otra secuencia que no está necesariamente regulada por la proteína de la superficie celular, pero que es seleccionada en cuanto a su capacidad para reducir la transcripción del nivel de fondo o para amplificar la señal transducida y aumentar así la sensibilidad y fiabilidad del ensayo.

Muchos genes informadores y elementos reguladores de la transcripción son conocidos para los expertos en la técnica y otros pueden ser identificados o sintetizados por métodos conocidos para los expertos en la técnica.

20 Genes informadores

Un gen informador incluye cualquier gen que exprese un producto génico detectable, que puede ser ARN o proteína. Son genes informadores preferidos los que son fácilmente detectables. El gen informador puede estar también incluido en la construcción en forma de un gen de fusión con un gen que incluye secuencias reguladoras de la transcripción deseadas o que exhibe otras propiedades deseadas.

30 Como ejemplos de genes informadores, se incluyen, aunque sin limitación, CAT (cloranfenicol acetil transferasa) (Alton y Vapnek (1979), *Nature* 282: 864-869), luciferasa y otros sistemas de detección enzimáticos, tales como la beta-galactosidasa, la luciferasa de luciérnaga (deWet y col. (1987), *Mol. Cell. Biol.* 7: 725-737), la luciferasa bacteriana (Engbrecht y Silverman (1984), *PNAS* 1: 4154-4158; Baldwin y col. (1984), *Biochemistry* 23: 3663-3667), la fosfatasa alcalina (Toh y col. (1989), *Eur. J. Biochem.* 182: 231-238; Hall y col. (1983), *J. Mol. Appl. Gen.* 2: 101).

35 Elementos de control de la transcripción

Como elementos de control de la transcripción, se incluyen, aunque sin limitación, promotores, intensificadores y sitios de unión a represores y activadores. Elementos reguladores de la transcripción adecuados pueden derivar de las regiones reguladoras de la transcripción de genes cuya expresión es rápidamente inducida, generalmente en cuestión de minutos desde el contacto entre la proteína de la superficie celular y la proteína efectora que modula la actividad de la proteína de la superficie celular. Como ejemplos de tales genes, se incluyen, aunque sin limitación, los genes inmediatos-precoces (véase Sheng y col. (1990), *Neuron* 4: 477-485), tales como *c-fos*. Los genes inmediatos-precoces son genes que se inducen rápidamente al unirse un ligando a una proteína de la superficie celular. Los elementos de control de la transcripción que se prefieren para uso en las construcciones génicas, incluyen elementos de control de la transcripción de genes inmediatos-precoces, elementos derivados de otros genes que exhiben alguna o todas de las características de los genes inmediatos-precoces o elementos sintéticos que se construyen de tal forma que los genes en unión operativa con ellos exhiben dichas características. Las características de genes preferidos de los que derivan los elementos de control de la transcripción incluyen, aunque sin limitación, expresión baja o indetectable en células quiescentes, inducción rápida a nivel transcripcional en cuestión de minutos de la simulación extracelular e inducción que es transitoria e independiente de nueva síntesis de proteínas; la desactivación posterior de la transcripción requiere nueva síntesis de proteína y los ARNm transcritos a partir de estos genes tienen una corta vida media. No es necesario que estén presentes todas estas propiedades.

En las construcciones más preferidas, los elementos reguladores de la transcripción derivan del gen *c-fos*.

55 El proto-oncogén *c-fos* es el homólogo celular del gen transformante del virus del osteosarcoma FBJ. Codifica para una proteína nuclear que está muy probablemente implicada en el crecimiento y la diferenciación celulares normales. La transcripción de *c-fos* es transitoria y rápidamente activada por factores de crecimiento y por otros inductores de otras proteínas de la superficie celular, incluyendo hormonas, agentes específicos de la diferenciación, estrés, mitógenos y otros inductores conocidos de las proteínas de la superficie celular. La activación es independiente de la síntesis de proteína. Los elementos reguladores *c-fos* incluyen (véase Verma y col. (1987), *Cell* 51): una caja TATA necesaria para la iniciación de la transcripción, dos elementos secuencia arriba para la transcripción basal y un intensificador, que incluye un elemento con simetría de diada y que se requiere para la inducción por TPA, suero, EGF y PMA.

65 El elemento intensificador de la transcripción de 20 pb localizado entre -317 y -298 pb secuencia arriba del sitio de remate de ARNm *c-fos* es esencial para la inducción con suero en células NIH 3T3 privadas de suero. Uno de los dos elementos secuencia arriba se localiza en -63 - -57 y se parece a la secuencia consenso para la regulación del AMPc.

Otros promotores y elementos de control de la transcripción, además de los descritos anteriormente, incluyen el

ES 2 240 957 T3

promotor del gen del péptido intestinal vasoactivo (“VIP”) (que responde a AMPc, Fink y col. (1988), *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85: 6662-6666), el promotor del gen de la somatostatina (que responde a AMPc, Montminy y col. (1986), *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83: 6682-6686), el promotor de la proencefalina (que responde a AMPc, agonistas nicotínicos y ésteres de forbol; Comb y col. (1986), *Nature* 323: 353-356), el promotor de la fosfo-enolpiruvato carboxikinasa (que responde a AMPc, Short y col. (1986), *J. Biol. Chem.* 261: 9721-9726), el promotor del gen NGFI-A (que responde a NGF, AMPc y suero; Changelian y col. (1989), *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86: 377-381) y otros que pueden ser conocidos o preparados por los expertos en la técnica.

Los siguientes ejemplos son incluidos con fines meramente ilustrativos y no pretenden limitar el alcance de la invención.

Ejemplo 1

Preparación de líneas celulares de mamíferos estables y transitoriamente cotransfectadas que expresan receptores HM1 y que contienen ADN codificante de un gen informador bajo el control de un promotor cuya actividad es modulada, directa o indirectamente, por efectores HM1

Se prepararon líneas celulares estables y líneas celulares de células transitoriamente transfectadas para uso en el ensayo basado en la transcripción. Se cotransfectaron células Ltk⁻, que son una línea celular de fibroblastos de ratón deficientes en timidina kinasa, con un plásmido que contenía ADN que codifica para HM1, un plásmido de selección que contenía el gen de la timidina kinasa de tipo salvaje o mutilado y una construcción de expresión de genes informadores. Se cotransfectaron transitoriamente células COS-7 (células de riñón de mono verde Africano) con una construcción de gen informador y un plásmido de expresión de la β -galactosidasa, pCH110 (Hall y col. (1983), *J. Mol. Appl. Gen.* 2: 101), que contiene ADN codificante del receptor HM1.

A. Preparación de líneas celulares de mamífero que han sido modificadas para uso en el ensayo basado en la transcripción

Se usaron las siguientes líneas celulares como células huésped: HEK 293, que puede ser adquirida de la ATCC (acceso #CRL 1573); células Ltk⁻, que pueden ser adquiridas de la ATCC (acceso #CCL1.3); células COS-7, que pueden ser adquiridas de la ATCC (acceso #CRL 1651), y células DG44 (véase, por ejemplo, L. Chasin (1986), *Cell. Molec. Genet.* 12: 555).

B. Se clonó ADN que codifica para el receptor M1 y se insertó en un plásmido de expresión M1

Se describe la secuencia del fragmento de ADN codificante de HM1 en Allard y col. (1987), *Nucl. Acids Res.* 15: 10604. Se puede preparar sintetizando el ADN, preparado como describen Allard y col., o se puede aislar por rastreo de una librería de ADN genómico humano parcial. Se ha aislado por rastreo de una librería genómica humana parcial que contiene fragmentos EcoRI de 2,5-4,5 kb de tamaño en el vector λ gt11 con un oligonucleótido homólogo a los nucleótidos 250-279 de la secuencia del gen HM1. Las condiciones de rastreo empleadas eran las siguientes:

Hibridación: formamida desionizada al 20%, 5X Denhardt, 6X SSPE, SDS al 0,2%, 200 μ g/ml de ADN de esperma de arenque sonicado, 42°C.

Lavado: 0,2X SSPE, SDS al 0,2%, 50°C.

Se identificó un clon positivo y se confirmó que codificaba para el receptor HM1 por secuenciación de ADN. Se aisló la inserción EcoRI de ese clon y se insertó en el sitio EcoRI de pIBI24 (International Biotechnologies, Inc., New Haven, CT), obteniéndose el clon pIBI24/HM1.

Se modificó el fragmento codificante de HM1 de pIBI24/HM1 por inserción en el plásmido basado en el promotor SV40 pSV2dhfr (véase Subramani y col. (1981), *Mol. Cell. Biol.* 1: 854-864). Se ligaron 50 ng del fragmento BamHI de 1,97 kb de pIBI24/HM1 con 50 ng de M13mp18 digerido con BamHI. Se transformó la ligación en la cepa de *E. coli* JM103 y se seleccionaron las colonias Amp^R. Se identificó el plásmido correcto por la presencia de un fragmento de digestión KpnI de 1,45. Se preparó una plantilla a partir de este plásmido para introducir un sitio EcoRI inmediatamente antes del codon de iniciación de la región codificante de HM1 humana. Se hizo esto por mutagénesis estándar usando un oligonucleótido que tiene la secuencia ATG CCCCAGCCCC ACCTTGAATT CATGAACACT TCAGCC (SEC. ID. N° 1).

Los productos de la mutagénesis fueron transformados en JM103 y rastreados en levantamientos de placa con un oligonucleótido de 18 bases (SEC. ID. N° 4). Cuatro de los clones positivos fueron sometidos a secuenciación didesoxi y todos resultaron tener la secuencia correcta, es decir, un sitio EcoRI añadido inmediatamente 5' del ATG 5'. Uno de los clones de secuencia positiva, mHM1AChR103, fue seleccionado y se introdujo un segundo sitio EcoRI usando mutagénesis dirigida a oligonucleótidos después del codon de finalización del HM1 humano usando un oligonucleótido de 37 nucleótidos (SEC. ID. N° 2).

Se transformaron los productos de mutagénesis en JM103 y se rastrearón en levantamientos de placa con un oligonucleótido de 17 bases (SEC. ID. N° 3). Se identificaron los clones positivos y cuatro fueron secuenciados para

ES 2 240 957 T3

confirmar que se había introducido el sitio EcoRI y que el resto de la secuencia permanecía inalterada. Los cuatro clones secuenciados tenían la secuencia correcta.

Uno de los clones secuenciados, M3HM1AR04, fue digerido con EcoRI y se purificó el fragmento de 1,4 kb que representaba la región codificante del M1 humano y se eluyó usando papel DE-81. Se ligaron 60 ng del fragmento de 1,4 kb con 20 ng de pUC19 digerido con EcoRI. Se identificaron los clones correctos por la presencia de un fragmento KpnI de 1,2 kb. Se escogió uno de éstos y se le denominó pHM1RO2. Se extrajo el fragmento EcoRI de 1,4 kb de pHM1RO2 y se insertó (38,5 ng) en 50 ng de pSV2dhfr digerido con EcoRI. Se transformó el producto resultante en células DH5 α (Sambrook y col., *Molecular Cloning*, 2^a ed., Cold Spring Harbor Lab., 1989, p. 10) y se seleccionaron las colonias Amp^R. De las colonias seleccionadas, aquéllas que, tras el aislamiento y la digestión del ADN plasmídico con EcoRI, dieron fragmentos de 1,4 y 5,0 kb y, tras la digestión con PvuII, dieron fragmentos de 250, 1.150 y 5.000 pares de bases, tenían los plásmidos esperados o deseados. Se llamó al vector de expresión de HM1 final HM1pSV2dHFR.

15 C. Preparación de plásmidos de selección de TK⁺ (timidina kinasa)

Se cotransfectó pThx59 (Zipser y col. (1981), *Proc. Natl. Acad. Sci.* 78: 6276-6280), que codifica para el gen TK de tipo salvaje, o pThx24 (ídem), que codifica para un gen TK mutilado, en células Ltk⁻ junto con los plásmidos de expresión de receptores muscarínicos para preparar células Ltk establemente transfectadas que expresan el receptor HM1 clonado sobre sus superficies celulares.

D. Preparación de construcciones de genes informadores y plásmidos de expresión que contienen las construcciones

25 1. Se usó el plásmido pFC4 para preparar construcciones de genes informadores que incluyen la región promotora de c-fos

Se usó el plásmido de expresión de genes informadores, pFC4 (Deschamps y col. (1985), *Science* 230: 1174-1177), que contiene el gen CAT bajo el control del promotor del gen c-fos, como fuente del promotor c-fos y del gen informador CAT y se introdujo también en células Ltk⁻ por cotransfección con ADN codificante de receptores. Para explicarlo brevemente, Deschamps y col. describe la preparación de una serie de plásmidos que contienen el promotor c-fos y cantidades variables de secuencias corriente arriba. Se introdujo un fragmento EcoRI-NaeI de 2,25 kb (FC1) del gen c-fos humano (van Straaten y col. (1983), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 3183), que contiene el promotor c-fos y la secuencia corriente arriba, en el vector, pSV2CAT (Gorman y col. (1982), *Mol. Cell Biol.* 2: 1044) el lugar del fragmento AceI-HindIII en pSV2CAT usando ligantes HindIII. El plásmido resultante era pFC1. Se preparó un segundo plásmido, pFC2, aislando el fragmento NaeI de 1,4 kb (FC2) de la región secuencia arriba del gen c-fos humano e insertándolo usando ligantes HindIII en pSV2CAT como se ha descrito para FC1. Se generó una serie de plásmidos adicionales suprimiendo porciones de la secuencia corriente arriba de FC2. Las deleciones de SmaI a XhoI y SstII a SstII en FC2 dieron FC3 y FC4, respectivamente. Después de digerir los fragmentos suprimidos que corresponden a las secuencias flanqueantes residuales y el promotor c-fos con HindIII y de separarlos por electroforesis en gel, éstos fueron clonados en el ADN digerido con SmaI-HindIII en lugar del fragmento de 1,3 kb original. Deschamps y col. también describen la preparación de construcciones FC5-11, -10, -20, -30 y -40 y de los correspondientes plásmidos.

En las construcciones descritas a continuación, a menos que se indique en contrario, se obtiene la región promotora c-fos como el fragmento de 400 pb de pFC4, que incluye una inserción de 500 pb del promotor c-fos. La porción 5' de 100 pares de bases deriva de una región secuencia arriba distal no contigua.

2. Las construcciones génicas promotor c-fos-informador de la luciferasa y los plásmidos

Se prepararon plásmidos, pFC4XP1 y pFC4XP2, insertando el fragmento FC4 de pFC4 (Deschamps y col. (1985), *Science* 230: 1174-1177) en pXP1 y pXP2, que contienen construcciones de genes informadores de luciferasa de luciérnaga (véase Nordeen S.K. (1988), *Biotechniques* 6(5): 454-457). Los plásmidos pFC4XP1 y pFC4XP2 incluyen dos secuencias tándem de finalización de la transcripción/traducción en el extremo 5' del fragmento promotor c-fos. Las dos construcciones difieren en la situación del promotor c-fos en relación al gen de la luciferasa. En el plásmido pFC4XP1, se inserta el promotor c-fos próximo al extremo 3' del poliligante, con sólo una secuencia de 66 pb separándolo del gen de la luciferasa. En el plásmido pFC4XP2, el promotor c-fos se sitúa próximo al extremo 5' del poliligante y hay una secuencia de 36 pb que lo separa del gen de la luciferasa. Los plásmidos de expresión que contienen el gen de informador de la luciferasa resultantes, pFC4XP1 y pFC4XP2, son intercambiables y se utilizaron para transfectar células PC12 y COS-7.

3. Se prepararon otras construcciones génicas de promotor-informador c-fos y plásmidos que contienen diversas porciones de la región promotora c-fos y otros elementos reguladores de la transcripción

Se alteró el tamaño del segmento promotor c-fos en el gen informador como medio de maximización del nivel de inducción de expresión del gen informador en células que expresan receptores transfectadas con la construcción génica promotor-informador c-fos. El segmento promotor c-fos usado en las construcciones génicas promotor c-fos-informador de luciferasa, pFC4XP1 y pFC4XP2, antes descritas, que se emplearon en las transfecciones de células PC12 y COS-7 es el fragmento FC4 del promotor c-fos del plásmido pFC4. Aunque se ha demostrado en una variedad

de aplicaciones que esta porción del promotor *c-fos* es capaz de activar la transcripción del gen *c-fos* en respuesta a niveles elevados de AMPc y/o calcio, no se sabía si porciones mayores o menores del promotor *c-fos* son más, menos o igualmente efectivas en la estimulación de la expresión de genes informadores en líneas celulares que expresan receptores particulares. Para investigar esta posibilidad, se juntaron construcciones génicas promotor *c-fos*-informador de luciferasa que contenían fragmentos mayores (2.200 pb) y menores (350 pb) del promotor *c-fos* (obtenido de los plásmidos pFC1 y pFC7, respectivamente) y se usaron para transfectar células PC12 que expresan receptores endógenos de acetilcolina de rata (nAChRs). Se estudiaron entonces las células transfectadas en cuanto a las actividades luciferasa inducidas por carbacol.

Además de los dos plásmidos y de las construcciones anteriores, se preparó un tercer plásmido que contenía una construcción génica promotor *c-fos*-informador de luciferasa y que contiene el fragmento del promotor *c-fos* FC4 de 500 pb obtenido de pFC4, la secuencia codificante del gen de la luciferasa y el elemento regulador intragénico del gen *c-fos* (FIRE), que es un palíndromo 14-mérico TCCCCGG seguido de CCGGGGA (véase Lamb y col. (1990), *Cell* 61: 485-496; véase también Bonnieu y col. (1989), *Oncogene* 4: 881-888, y Blanchard y col. (1988), *Biochimie* 70: 877-884). Los plásmidos que contienen estas construcciones, pFC4XP1FIRE y pFC4XP2FIRE, difieren de pFC4XP1 y pFC4XP2 sólo en que la secuencia FIRE ha sido insertada corriente debajo de la construcción génica promotor del *c-fos*-informador de la luciferasa.

Como la secuencia FIRE reduce la expresión de *c-fos* en células no inducidas, la inclusión de esta secuencia en las construcciones usadas en el ensayo basado en la transcripción debería reducir el nivel de ruido de fondo y aumentar así la sensibilidad y fiabilidad del ensayo.

Se construyen otros plásmidos en los que se inserta la secuencia FIRE en algún otro lugar en las construcciones de genes informadores para optimizar la reducción del nivel de ruido obtenida incluyendo esta secuencia. Como la secuencia FIRE se localiza al final del primer exón en el gen *c-fos* y parece actuar promoviendo la finalización prematura de los transcritos *c-fos* en células no inducidas, se construyen construcciones que contienen fusiones del gen informador y diversas porciones del gen *c-fos*. Estas fusiones incluyen el primer exón y la secuencia FIRE del gen *c-fos* y cantidades crecientes de la región intragénica. La cantidad de región intragénica es optimizada preparando las construcciones y estudiándolas en cuanto a la expresión de *c-fos* en ausencia de inductor. Aquéllas que exhiban los niveles más bajos de expresión en ausencia de inductor y el nivel más alto de expresión inducida, es decir, la mayor razón de señal a ruido, son seleccionadas para uso en el ensayo basado en la transcripción. Las construcciones pueden ser introducidas en células PC12, COS-7 y otras células adecuadas que expresan receptores y células control.

4. Preparación de construcciones de genes informadores y de plásmidos que contienen la región promotora de la somatostatina

a. Construcciones génicas promotor de somatostatina-informador de CAT

Se preparó el plásmido de expresión del gen informador, p Δ (-71), que contiene el gen CAT regulado por el promotor del gen de la somatostatina (véase Montminy, M.R. y col. (1986), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 6682-6686), y se introdujo en células COS-7.

b. Plásmido con promotor de la somatostatina-gen informador de la luciferasa

Se usó el plásmido p Δ (-71)XP1, que contiene una construcción de gen informador de la luciferasa de luciérnaga bajo el control del elemento promotor de la somatostatina p Δ (-71) (véase Montminy, M.R. y col. (1986), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 6682-6686), para transfectar células COS-7.

E. Preparación de líneas celulares estables y transitorias por cotransfección de células huésped de mamíferos con plásmidos que contienen ADN codificante de HM1 y de las construcciones de genes informadores y ADN codificante de un marcador selectivo

1. Preparación de células Ltk⁻ establemente transfectadas

Se prepararon líneas celulares estables que expresaban HM1 usando transfección con fosfato de calcio para introducir el ADN plasmídico (véase Wigler y col. (1979), *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76: 1373-1376). Para explicarlo brevemente, se cultivaron células Ltk⁻ en medio no selectivo, D + 10, que contiene medio de Eagle modificado de Dulbecco + 10% de suero de ternera, 100 U/ml de penicilina y 100 μ g/ml de estreptomycin, en una placa de 10 cm de tamaño hasta un 20% de confluencia. Se coprecipitaron los tres plásmidos circulares, el plásmido TK⁺, el plásmido que contenía HM1 y el plásmido pFC4 con CaPO₄ y se añadieron a la monocapa celular. Las concentraciones de vectores eran las siguientes:

Thx24:HM1:pFC4	2 μ g:2 μ g:2 μ g/ml.
Thx59:HM1:pFC4	0,25 μ g:2 μ g:2 μ g/ml.

Se ajustó la concentración final de ADN a 20 a 40 μ g/ml añadiendo ADN de Ltk⁻ o PVC. Se cultivaron las células transfectadas durante dos días en medio no selectivo. Después de dos días, se pasaron las células, se substituyó el

ES 2 240 957 T3

medio no selectivo con medio HAT (D + 10 + 15 $\mu\text{g/ml}$ de hipoxantina + 1 $\mu\text{g/ml}$ de aminopterina + 5 $\mu\text{g/ml}$ de timidina) y se cultivaron las células durante 10-15 días, durante cuyo tiempo se “alimentó” a las células con medio selectivo (HAT) fresco cada 3-4 días. Después de 10-15 días, aparecieron colonias o clones que indicaban la aceptación y la expresión de al menos el plásmido portador del gen TK. Se transfirieron las colonias a pocillos por separado de una placa de 24 pocillos y se cultivaron en medio selectivo durante siete días. Se transfirieron entonces los clones individuales a placas de 6 pocillos y se cultivaron durante otros siete días en medio selectivo. Para obtener células para la congelación y los posteriores análisis de receptores moleculares y funcionales, se pasaron los clones individuales de las placas de 6 pocillos a placas de 100 ml. Se denominó a dos de las líneas celulares resultantes LM1FC4-8 y LM1FC4-15.

2. Cotransfección transitoria de células COS-7

Se empleó el procedimiento de transfección con CaPO_4 en la transfección transitoria de células COS-7. El protocolo empleado fue el descrito en “Current Protocols in Molecular Biology”, 1, Suplemento 14, Sección I, Unidad 9.1.1-3.1.3, Wiley Interscience Publish (1990).

Se cultivaron células COS-7 (aproximadamente $1-2 \times 10^6$ células) a una confluencia del 20% en medio de Eagle modificado de Dulbecco (Gibco #320-1965 AJ) con un 10% de suero bovino fetal (Gibco #200-6140 AJ), Pen./Estrep. 1x (Gibco #600-5140 AG) y aminoácidos no esenciales MEM 1x (Gibco #320-1140 AG). Se coprecipitaron los tres plásmidos circulares que contenían el receptor HM1, el gen TK y el gen informador con CaPO_4 y se añadieron a la monocapa de células. Las concentraciones de plásmidos eran las siguientes:

pCH110:HM1pSV2dHFR:pFC4XP1	5 μg :5 μg :0,5 $\mu\text{g/ml}$.
pCH110:HM1pSV2dHFR:p Δ (-71)	5 μg :5 μg :1 $\mu\text{g/ml}$.
pCH110:HM1pSV2dHFR:p Δ (-71)XP2	5 μg :5 μg :0,5 $\mu\text{g/ml}$.

Después de la transfección, se incubaron las células durante 24-48 horas en el anterior medio modificado de Dulbecco y se estudiaron luego en cuanto a la expresión del gen informador usando el ensayo basado en la transcripción y en cuanto a la expresión de la β -galactosidasa como se describe en el Ejemplo 3.D. a continuación.

Ejemplo 2

Preparación de líneas celulares para uso como controles en el ensayo basado en la transcripción

Se prepararon líneas celulares control con las que comparar los niveles de transcripción en células que expresan la proteína de la superficie celular y que incluyen un gen informador. Se prepararon dos series de líneas celulares control usando los protocolos de transfección y de cultivo descritos en el Ejemplo 1.

Se preparó la primera serie de células control cotransfectando células Ltk^- con plásmidos que contenían ADN codificante de HM1 y TK^+ usando los métodos y el ADN HM1 y TK descritos en el Ejemplo 1. La primera serie de líneas celulares, incluidas las líneas celulares LM159-10 y LM124-3, contienen genes *c-fos* endógenos y fueron sometidas a ingeniería y seleccionadas para expresar receptores HM1 clonados. Se preparó esta primera serie para uso como control positivo y negativo en los ensayos basados en la transcripción. Se usó como control positivo por demostrar que se expresaba el receptor HM1 y que la activación del receptor HM1 expresado conduce a un aumento en el ARN *c-fos* endógeno. Estas líneas celulares sirvieron también como controles negativos, ya que no incluyen la construcción del gen informador pFC4 y, por lo tanto, se usaron para mostrar que no se detectaba ARNm CAT o actividad enzimática en ausencia de la construcción informadora pFC4.

La segunda serie de líneas celulares control fue preparada transfectando transitoriamente células COS-7 con pFC4XP1 y cotransfectando células Ltk^- con ADN pFC4 y TK^+ y seleccionando los clones TK^+ . Las células Ltk^- , LFC4-3, LFC4-5, LFC4-7, LFC4-8 y LFC4-10 estaban entre los clones positivos seleccionados.

Esta serie de líneas celulares basadas en Ltk , incluyendo LCF4-3, LCF4-5, LCF4-7, LCF4-8 y LCF4-11, y las células COS-7 cotransfectadas no expresan receptores HM1, pero contienen la construcción del gen informador. Han sido usadas, por lo tanto, con controles positivos para mostrar el ARNm CAT y la actividad enzimática en respuesta a compuestos que activan el promotor *c-fos* de la construcción pFC4. Esta segunda serie de líneas celulares sirvió también como control negativo en los ensayos basados en la transcripción, ya que no se alteraron el ARNm CAT o las actividades luciferasa cuando estas células fueron puestas en contacto con agonistas o antagonistas de HM1.

Se usaron células Ltk^- no transfectadas y células Ltk^- transfectadas con pTHx59 (células 59-0) como controles negativos adicionales para mostrar que los antagonistas y agonistas de HM1 no alteran la expresión de *c-fos* en ausencia de receptores HM1. También se usaron células PC12 (ATCC CRL1721 y Michel y col. (1989), *Br. J. Pharmacol.* 97: 914-920) y células SH-SY5Y (véase Lambert y col. (1989), *Eur. J. Pharmacol.* 165: 71-77, y Serra y col. (1988), *Neurochem.* 50: 1513-1521), que expresan receptores endógenos de la superficie celular, como líneas celulares de control positivo en los ensayos basados en la transcripción.

ES 2 240 957 T3

Ejemplo 3

Se analizaron las líneas celulares, preparadas como se ha descrito en el Ejemplo 1, que contienen ADN codificante del receptor HM1 y de una construcción de gen informador, para valorar la capacidad del ensayo basado en la transcripción para detectar agonistas y antagonistas de HM1

Se analizaron células Ltk⁻ establemente cotransfectadas por hibridación Northern blot, ensayos de unión y ensayos de hidrólisis del fosfatidilinositol, así como por el ensayo basado en la transcripción.

10 A. Detección y análisis de transcritos de ARNm del ADN que codifica para HM1, *c-fos* y CAT

Se analizaron primeramente las líneas celulares en cuanto a la expresión de ARN codificante de HM1. Se aisló el ARN total de 1x10⁷ células y se separaron 10-15 µg de cada ARN en un gel de agarosa al 1%-formaldehído, seguido de transferencia sobre nitrocelulosa. Se sondó por separado el Northern blot con una o más de las siguientes sondas: 15 fragmento *Eco*RI de 1,2 ó 1,4 kb cebado aleatoriamente del plásmido pSV2HM1, para detectar la expresión del gen HM1; fragmento *Taq*I de 788 pb cebado aleatoriamente del plásmido pCaMVCN (Alton y col. (1979), *Nature* 282: 864), para detectar la expresión del gen CAT, y fragmento *Pst*I de 1,1 kb cebado aleatoriamente del plásmido p-*fos*1 (Curran y col. (1982), *J. Virol.* 44: 674-682), para detectar la expresión de *c-fos*.

20 Se hibridaron los filtros a las sondas en formamida desionizada al 50%, Denhardt 5X, SSPE 5X y 100 µg/ml de ADN de esperma de arenque sonificado a 42°C y se lavaron en SSPE 0,2X/SDS al 0,2% a 65°C.

Los tamaños esperados de las bandas de hibridación sobre las manchas deberían ser de aproximadamente 3 kb para HM1, de aproximadamente 2 kb para CAT y de aproximadamente 2,2 kb para *c-fos*.

25 B. Los ensayos de unión competitiva al receptor M1 detectaron la unión de agonistas y antagonistas de HM1 a los receptores de la superficie celular HM1 en las líneas celulares experimentales y en las líneas celulares de control positivo, PC12 y SH-SY5Y (véase el Ejemplo 1)

30 Se incubaron aproximadamente 1x10⁶ células con 1,4 nM del antagonista [³H]-N-metilescopolamina (“NMS”) durante 1 h a 37°C en ausencia o presencia de diversas concentraciones de agonistas, incluyendo atropina, pirenzepina, carbamilcolina y escopolamina. Se separó el ligando marcado no unido del marcaje unido a células por filtración de la mezcla de ensayo a través de filtros Whatman GF/C, que habían sido pretratados con polietilenimina. Se lavaron los filtros con 4 ml de tampón de ensayo helado (NaCl 144 mM, KCl 4,7 mM, KH₂PO₄ 1,7 mM, CaCl₂·2H₂O 2,5 35 mM, MgCl₂ 1,1 mM, glucosa 10 mM, Tris/HCl 10 mM), se secaron y se analizaron en un contador de centelleo para detectar la cantidad de ³H-NMS unida. Se restaron las cuentas unidas en presencia de atropina de las cuentas unidas en ausencia de atropina para determinar el alcance de la unión específica.

Los resultados de estos experimentos de unión competitiva dieron valores de CI₅₀ para el desplazamiento de ³H-NMS específicamente unida como se indica a continuación:

TABLA I

Línea celular	Pirenzepina	Carbamilcolina	Atropina	Escopolamina
PC12	900 nM	200 µM	7,0 nM	5 nM
SH-SY5Y	300 nM	17 µM	4,0 nM	4 nM
LM159-10	200 nM	1 mM	4,5 nM	2 nM
LM124-3	200 nM	> 1 mM	1,5 nM	2 nM
LM1FC4-8	40 nM	100 µM	5,0 nM	2 nM
LM1FC4-15	60 nM	170 µM	4,0 nM	3 nM

55 Estos resultados guardan una estrecha concordancia con los publicados por Michel y col. ((1989) *Br. J. Pharmacol.* 97: 914-920) con respecto a la farmacología muscarínica de las células PC12. Además, las líneas celulares que fueron preparadas por transfección con ADN codificante de HM1, LM159-10 y LM124-3 o con ADN codificante de HM1 y de las construcciones de ADN *c-fos*-CAT expresaban receptores HM1 que exhibían las propiedades farmacológicas 60 esperadas.

C. Ensayo de hidrólisis del fosfatidilinositol (“PI”)

65 El protocolo seguido era una modificación del descrito por Sevva y col. (1986), *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 140: 160-166, y Peralta y col. (1988), *Nature* 334: 434-437. Resumiendo, como la activación del receptor muscarínico M1 por un agonista da lugar a la activación de la cascada de hidrólisis del fosfatidilinositol (PI), el ensayo funcional conlleva el marcaje de células con ³H-mioinositol durante 48 h o más. Se tratan las células marcadas con el agonista muscarínico, la carbamilcolina (CCh), en presencia y ausencia del antagonista muscarínico, la atropina, durante una

ES 2 240 957 T3

hora. Se lisan las células tratadas y se extraen en cloroformo-metanol-agua, después de lo cual se separan los fosfatos de inositol por cromatografía de intercambio iónico y se cuantifican por conteo de centelleo.

Se plaquearon células de control positivo, células SH-SY5Y y PC12, células de control negativo, la línea celular 59-0 y las células experimentales recombinantes, LM159-10, LM124-3, LM1FC4-8 y LM1FC4-15, en placas de 12 pocillos (Costar) a una densidad de 5×10^5 células /pocillo y se marcaron con ^3H -mioinositol ($3 \mu\text{Ci/pocillo}$) durante 65-70 h. Se decantó el medio y se lavaron los pocillos con 1 ml de tampón de ensayo PI 2X (Hepes 10 mM, CaCl_2 0,5 mM, MgCl_2 1 mM y LiCl 10 mM en 500 ml de DMEM). Se incubaron las células en presencia de diversas concentraciones de agonistas o se incubaron con agonista en presencia o ausencia de diversas concentraciones de antagonistas durante 60 minutos a 37°C . Después de la incubación, se lisaron las células y se extrajo la suspensión con 3 ml de $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (1:1). Tras la centrifugación (3.200 rpm durante 5 minutos), se separó la fase acuosa superior y se diluyó con 2 ml de H_2O y se centrifugó de nuevo. Se cargaron los sobrenadantes en columnas que contenían 1 ml de resina Dowex® 1X8 AG previamente equilibradas con mioinositol 5 mM y lavadas con 9 ml de mioinositol 5 mM, seguido de 8 ml de formiato de sodio 60 mM y borato de sodio 5 mM. Todos los fosfatos de inositol (IP1, IP2 e IP3) eluyeron juntos con 6 ml de ácido fórmico 0,1 M y formiato de amonio 1 M. Se retiraron 3 ml de los eluatos y se contaron con 20 ml de fluido de centelleo para análisis.

Se determinaron las veces de aumento de la estimulación calculando la razón de cpm en presencia de agonista a cpm en presencia de control de tampón.

Se determinaron los valores de la CE_{50} para la estimulación por agonistas de la hidrólisis del PI midiendo la hidrólisis del PI a varias concentraciones de agonista. Se restaron las cpm medidas en presencia sólo de tampón de las cpm medidas en presencia de agonista para obtener la cantidad de hidrólisis de PI resultante de la unión del agonista. Se determinó la cantidad máxima de PI hidrolizado, la respuesta máxima, para cada agonista y se representó el porcentaje de respuesta máxima frente a la concentración del agonista y se determinó el valor de la CE_{50} por el gráfico.

Se determinaron los valores de la CI_{50} para la inhibición por antagonistas de la estimulación por agonistas de la hidrólisis del PI midiendo el valor específico de hidrólisis del PI en presencia de una concentración constante de agonista y varias concentraciones de antagonista. Para cada concentración de antagonista, se representó el porcentaje de la respuesta máxima en ausencia de antagonista en función de la concentración de antagonista a partir de la cual se determinaron los valores de la CI_{50} .

Como en los ensayos de unión a receptores, se usaron células SH-SY5Y (Serra y col. (1988), *Neurochem.* 50: 1513-1521) y PC12 (Horowitz, J., *J. Neurochem.* 53: 197-204 (1989)) como sistemas de control positivo para la activación de la ruta de hidrólisis del PI por agonistas muscarínicos y la inhibición de la estimulación por antagonistas muscarínicos. En la línea celular de control positivo SH-SY5Y, el tratamiento con carbamilcolina 1 mM dio como resultado una estimulación aproximadamente 50 veces mayor de la acumulación de fosfato de inositol, que se bloqueaba con atropina 100 nM. En las células PC12, el tratamiento con carbamilcolina 1 mM dio lugar a una activación 27 veces mayor. La línea celular de control negativo, las células 59-0, no respondían al tratamiento con carbamilcolina, mientras que las células transfectadas con el ADNc M1 exhibían niveles variables de estimulación por carbamilcolina. La estimulación observada con carbamilcolina 1 mM es resumida a continuación para las líneas celulares de control positivo y las líneas celulares transfectadas.

TABLA II

Línea celular	Veces de aumento de la estimulación	DE_{50} , μM
PC12	27	7
SH-SY5Y	48	18
LM159-10	9	90
LM124-3	28	48
LM1FC4-8	30	61
LM1FC4-15	4	48

Las propiedades farmacológicas de las líneas celulares transfectadas, células LM124-3, LM159-10, LM1FC4-8 y LM1FC4-15, así como de las células SH-SY5Y y PC12, fueron caracterizadas estudiando la inhibición dosis-dependiente de la acumulación de fosfato de inositol estimulada por carbamilcolina por los antagonistas muscarínicos atropina, pirenzepina y escopolamina. A continuación, se dan los valores de la CI_{50} obtenidos para los antagonistas:

ES 2 240 957 T3

TABLA III

Línea celular	Pirenzepina	Atropina	Escopolamina
PC12	900 μ M	> 100 nM	ND
SH-SY5Y	3,3 μ M	47 nM	36 nM
LM159-10	0,5 μ M	13 nM	31 nM
LM124-3	0,2 μ M	15 nM	15 nM
LM1FC4-8	0,3 μ M	21 nM	18 nM
LM1FC4-15	ND	10 nM	ND

ND = No determinado.

D. Ensayo basado en la transcripción

1. Las células Ltk⁻ que fueron establemente cotransfectadas con ADN codificante del receptor HM1 y la construcción génica promotor *c-fos*-informador CAT expresaban receptores HM1 y ARNm del gen CAT y actividad CAT detectables cuando se trataron con el agonista M1, carbacol, a 100 μ M

Se cultivaron las células Ltk⁻ establemente cotransfectadas y las células control hasta un 70-80% de confluencia en medio que contenía un 0,5% de suero durante dos días antes del ensayo. Esta etapa de privación de suero reduce los niveles de fondo de transcripción del promotor *c-fos*. Para cada tipo de célula que había de ser estudiado, se trataron grupos de tres placas de células de forma similar. Los diversos tratamientos incluían tratamiento con 100-500 μ M de carbacol durante 15-45 minutos, tratamiento con un 20% de suero durante 15-45 minutos, sin tratamiento pero incluyendo agitación por remolino como en los demás y tratamiento con 10 μ M de atropina durante 5 minutos antes del tratamiento con carbacol. Se incubó una placa de cada grupo durante 30-60 minutos a 37°C y se usó luego para aislar el ARN total para el análisis Northern (véase el Ejemplo 3.A.). Se incubaron las otras dos placas durante 5 h a 37°C y se estudiaron después en cuanto a la actividad CAT.

a. Ensayo CAT para valorar la inducción del gen informador

Se prepararon lisados proteicos lavando las placas con solución salina tamponada con fosfatos ("PBS") y lisando luego las células sobre la placa en 500 μ l de Tris-HCl 0,25 M, pH 7,8, Tritón X100 al 1%. Se transfirió el lisado a un tubo Eppendorf y se incubó entonces a 65°C durante 10 minutos. Después de centrifugar el tubo durante 5 minutos en una microcentrífuga a 4°C, se transfirió el sobrenadante a tubos frescos y se congeló a -20°C hasta su uso en el ensayo CAT.

Al descongelarlos, se estudiaron los lisados por duplicado en cuanto a proteína; se usaron 150 μ l de lisado celular en el ensayo CAT. Se añadieron 90 μ l de dH₂O, 0,5 μ l de cloranfenicol 500 mM y 10 μ l de ¹⁴C-acetil-CoA o ³H-acetil-CoA al lisado para iniciar la reacción, que se incubó durante 1-4 h a 37°C. Se detuvo la reacción sobre hielo y se añadieron 300 μ l de acetato de etilo frío. Se agitaron los tubos vorticialmente, se centrifugaron en una microcentrífuga durante 1 minuto y se transfirieron 200 μ l de la fase orgánica a un vial de centelleo de vidrio. Se repitió la extracción con 300 μ l de acetato de etilo y se combinaron los extractos orgánicos con 5 ml de solución de contaje de centelleo Econofluor. Se determinó la radiactividad en un contador de centelleo.

b. Análisis Northern

Se sondó el ARN en cuanto a la presencia de ARN *c-fos* y CAT según se ha descrito en el Ejemplo 3.A. Se detectó ARN específico de CAT del tamaño esperado.

c. Se indujo la expresión de ARNm CAT en células que expresan receptores HM1 y se bloqueó por el antagonista de M1 atropina

Se analizaron las líneas de células Ltk⁻, incluyendo LM159-10 y LM124-3, que habían sido transfectadas con plásmidos que contenían el gen HM1, en cuanto a la expresión de ARN *c-fos* endógeno tras el tratamiento con el agonista colinérgico carbacol o carbacol y atropina, un antagonista muscarínico. Si hay presencia de receptores HM1 funcionales sobre la superficie de las células, el carbacol debería interactuar con el receptor, dando lugar a mayores niveles de Ca²⁺ y AMPc, y activar así el elemento de control transcripcional del gen *c-fos* endógeno, de tal forma que el gen *c-fos* debería transcribirse a un mayor nivel, que sería detectable a nivel de ARN, por inducción de ARN *c-fos* endógeno. Más aún, la inducción mediada por el agonista de M1 de *c-fos* debería bloquearse por los antagonistas de M1.

Como se muestra en la tabla siguiente, estos resultados fueron conseguidos en las líneas celulares LM159-10 y LM124-3, lo que indica que expresan receptores HM1 que están asociados con una ruta de inducción de *c-fos* funcional.

ES 2 240 957 T3

TABLA IV

Inducción de ARNm c-fos

Línea celular	Sin tratamiento	Carbacol 100 μ M	Carbacol 100 μ M + atropina 10 μ M
LM159-10	-	+++	+
LM124-3	-	+++	+
Ltk ⁻	-	-	-

En células transfectadas con el vector de expresión de HM1 más el plásmido marcador c-fos-CAT, por ejemplo, LM1FC4-8 y LM1FC4-15, las células que expresan receptores HM1 funcionales muestran igualmente un aumento en el ARN c-fos al interactuar con un agonista de HM1. Estas células, sin embargo, deben demostrar también un aumento en el ARN específico de CAT y en la actividad enzimática debido a la activación de la construcción de expresión c-fos-CAT. Al tratar la línea celular LM1FC4-15 con el agonista de HM1, el carbacol, y también con un inductor general de la expresión de c-fos, el suero al 20%, se detectaron aumentos en el ARNm c-fos y en el ARNm CAT.

TABLA V

Línea celular	Sin tratamiento	Carbacol 100 μ M	Suero al 20%
LM1FC4-8			
ARN <u>c-fos</u>	-	-	+
ARN CAT	+	+	+
Actividad CAT	+	+	+
LM1FC4-15			
ARN <u>c-fos</u>	-	++	++
ARN CAT	+	++	++
Actividad CAT	+	++	++
LFC4-7 (control negativo)			
ARN <u>c-fos</u>	-	-	+
ARN CAT	+	+	++
Actividad CAT	+	+	++

2. Las células COS-7 cotransfectadas transitoriamente con ADN del receptor HM1 y construcciones de genes informadores expresaban receptores HM1 funcionales y una mayor expresión de genes informadores

a. Células COS-7 cotransfectadas transitoriamente con ADN del receptor HM1 y pFC4XP1

Veinticuatro a 48 horas después de la cotransfección transitoria de células COS-7 con el ADN del receptor HM1, la construcción génica promotor c-fos-informador de luciferasa (pFC4XP1) y el gen de la β -galactosidasa (pCH110), se expuso a los transfectantes a 500 μ M de carbamilcolina o se dejaron sin tratar durante 5 horas. A las 3 a 5 horas del tratamiento con el fármaco, se lisaron las células y se analizaron en cuanto a luciferasa (véase Brasier y col. (1989), *Biotechniques* 7: 1116-1122), β -galactosidasa (Miller (1972), "Experiments in Molecular Genetics", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY) y concentración proteica (Biorad; Bradford (1976), *Analytical Biochemistry* 72: 248). Se usaron las concentraciones de β -galactosidasa y proteína para normalizar los niveles de luciferasa a la eficacia de transfección y al rendimiento proteico por placa. Luciferasa normalizada = actividad luciferasa/ Δ A420 (actividad β -galactosidasa)/ μ g de proteína/ μ l, donde los volúmenes usados para la luciferasa y la β -galactosidasa son constantes para todos los lisados. En la Tabla VI se exponen los resultados.

Estos resultados indican que los niveles de luciferasa de las células COS-7 cotransfectadas con el ADN del receptor HM1 y el promotor c-fos-gen de luciferasa y expuestas a 500 μ M de carbamilcolina eran 10 veces mayores que los de los transfectantes no tratados. Los niveles de luciferasa de células COS-7 que fueron transfectadas con pFC4XP1 no resultaron afectados por la carbamilcolina. Estos datos confirman que las inducciones de la luciferasa en estas células eran específicas para la expresión del receptor HM1.

También se usó el ensayo basado en la transcripción para generar curvas de dosis-respuesta de agonistas y antagonistas de los receptores muscarínicos de acetilcolina. Se cotransfectaron transitoriamente 14 placas de 10 cm de

células COS-7 mediante el protocolo del fosfato de calcio (véase el Ejemplo I.F.) con HM1pSV2dHFR, pFC4XP1 y pCH110. A las 48 h de la transfección, se trataron placas de células por duplicado con 0, 0,01, 0,10, 1,0, 10, 100 ó 1.000 μ M de carbamilcolina durante 5 horas antes de la lisis de las células y del estudio de la actividad luciferasa inducida por carbamilcolina. Se observó inducción de luciferasa dosis-respuesta por carbamilcolina en un rango de 1 a 1.000 μ M de carbamilcolina.

TABLA VI

Transfectante	Actividad luciferasa (RLU) ^a	β -Gal (Δ A420) ^b / μ g proteína/ μ l	Actividad luciferasa normalizada ^c (RLU)	Luciferasa media ^d	Inducción de luciferasa (Luc. med. + CCh/Luc. med. - CCH)
COS-7					
HM1pSV2dHFR					
FC4XP1	75.111	0,063	1.192.238	1.819.737	
<u>pCH110</u>	176.201	0,072	2.447.236		
-CCh					
-CCh					
+CCh	998.731	0,057	17.521.596	18.945.507	10,4
+CCH	1.120.318	0,055	20.369.418		
pFC4XP1					
<u>pCH110</u>					
+CCh	201.382	0,198	1.017.080		
+CCH	299.789	0,276	1.086.192	1.065.428	0,6 ^e

^a RLU - Unidades de luz relativas de lisados (100 μ l) de las muestras de células transfectadas indicadas.

- 5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65
- b Determinada midiendo el cambio de absorbancia de muestras de lisados celulares a 420 nm en presencia de ONPG y dividiendo por la concentración proteica del lisado.
- c Para justificar las diferencias en la eficacia de transfección de cada placa de células, se dividió la actividad luciferasa de cada muestra de lisado celular en RLU por el nivel de β -galactosidasa (ΔA_{420}) de cada muestra de lisado para obtener actividades luciferasa normalizadas en términos de los niveles de β -galactosidasa de la muestra de células por μg de proteína por μl de lisado. Esta columna da los valores normalizados de las actividades luciferasa.
- d Media de las actividades luciferasa normalizadas de muestras por duplicado de células tratadas con CCh y sin tratar.
- e Se calculó esta razón como sigue:
- Actividad luciferasa media de células COS-7
transfectadas con pFC4XP1 y expuestas a CCh
Actividad luciferasa media de células COS-7
no tratadas cotransfectadas con HM1pSV2dHFR
y pFC4XP1

ES 2 240 957 T3

Se calculó un valor aproximado de CE_{50} ($6 \mu M$) a partir de estos datos. Este valor de CE_{50} guarda correlación con los valores de CE_{50} publicados para la inducción por carbamilcolina de la hidrólisis de PI en células HEK 293 transfectadas con el gen del receptor HM1 (véase Peralta y col. (1988), *Nature* 334: 434-437).

5 También se han generado curvas para la dosis-respuesta de la inhibición por atropina de las actividades luciferasa inducidas por carbamilcolina en células COS-7 transitoriamente cotransfectadas usando el ensayo basado en la transcripción. Para estos experimentos, se cotransfectaron transitoriamente 16 placas de 10 cm de células COS-7 por el protocolo del fosfato de calcio con pCH110, HM1pSV2dHFR y pFC4XP1. A las 48 horas de la transfección, se incubaron placas por duplicado de células durante 5 minutos en 0, 0,01, 0,1, 1,0, 10, 100, 1.000 ó 10.000 nM de atropina en
10 tampón STBS (solución salina tamponada con Tris) antes de añadir 500 μM de carbamilcolina a las placas. Después de 5 minutos de incubación de las células en presencia de carbamilcolina y atropina, se retiraron los fármacos de las células y se substituyeron con medio condicionado. A las 5 h de la adición de carbamilcolina, se prepararon lisados celulares y se analizaron en cuanto a las actividades β -galactosidasa y luciferasa y a los niveles totales de proteína.

15 La atropina inhibía los niveles inducidos por carbamilcolina de luciferasa de un modo dosis-dependiente en un rango de concentraciones de 10-10.000 nM. Como la inhibición de la actividad luciferasa inducida por carbamilcolina era completa en presencia de atropina 10.000 nM en este experimento (es decir, que el nivel de luciferasa de células tratadas con 500 μM de carbamilcolina y 10.000 nM de atropina era equivalente al de células que no fueron tratadas con carbamilcolina), se calculó una CI_{50} de 80 nM para la inhibición por atropina a partir de estos datos. Este valor
20 de CI_{50} está dentro del rango del determinado en ensayos de inhibición por atropina de la hidrólisis de PI inducida por carbamilcolina en células Ltk⁻ transfectadas con el gen del receptor HM1.

b. *Células COS-7 transitoriamente cotransfectadas con un plásmido que contiene ADN codificante del ADN del receptor HM1 y con un plásmido que contiene la construcción promotor de somatostatina-gen CAT*

25 Se cotransfectaron transitoriamente células COS-7 con el promotor de somatostatina-gen CAT (p Δ -71) y el ADN del receptor HM1 usando el método del fosfato de calcio. A las 48 horas de la transfección, se trataron las células con 0,500-1 μM de carbamilcolina o se dejaron sin tratar y se incubaron durante 5 horas. Después de la incubación, se estudiaron las células en cuanto a actividad CAT según se describe en el Ejemplo 3.D. Las células control COS-7 no transfectadas y no tratadas exhibían un alto nivel de fondo de actividad CAT. Los niveles de CAT de las células COS-7
30 transfectadas que no habían sido expuestas a carbamilcolina eran equivalentes a los de las células control. Los niveles de CAT de las células COS-7 transfectadas tratadas con carbamilcolina eran aproximadamente 1,7 veces mayores que los de las células transfectadas no tratadas.

35 c. *Células PC12 transitoriamente cotransfectadas con el ADN del receptor HM1 y promotor c-fos-gen de la luciferasa*

Se transfectaron transitoriamente células PC12 con 0,5 μg de pFC4XP1 usando el método de precipitación con fosfato de calcio. A las 48 horas de la transfección, se expusieron las células a 500 μM de carbamilcolina o se dejaron
40 sin tratar durante 5 horas. Se prepararon lisados celulares y se estudiaron en cuanto a la actividad luciferasa según se describe en el Ejemplo 3.D. (véase Brasier y col.(1989), *Biotechniques* 7: 1116-1122). Los resultados de estos ensayos indicaron que el nivel de luciferasa de las células tratadas con carbamilcolina era 30 veces mayor que el nivel de luciferasa de las células no tratadas.

45 d. *Células PC12 cotransfectadas con ADN codificante de los receptores HM1 y con plásmidos que contienen construcciones génicas c-fos-informador de la luciferasa que incluyen varias porciones de la región promotora de c-fos*

Lamb y col. ((1990) *Cell* 61: 485-496) demostraron que la secuencia FIRE, cuando se inserta en la secuencia
50 codificante de un gen de fusión promotor c-fos- β -galactosidasa, reduce los niveles constitutivos o no inducidos de transcripción de β -gal regulada por el promotor c-fos. Por lo tanto, las células transfectadas con una construcción promotor c-fos (fragmento pFC4)-gen de luciferasa que contiene la secuencia FIRE deben exhibir menores niveles de actividades luciferasa no inducidas y constitutivamente expresadas (ruido) que las células transfectadas con un gen
55 promotor c-fos-informador de luciferasa que carece de la secuencia FIRE. Menores niveles de fondo de luciferasa deberían, a su vez, dar lugar a mayores razones de señal-a-ruido (es decir, la razón de actividades luciferasa de células tratadas con carbamilcolina y no tratadas) generadas en ensayos de inducción de luciferasa de las células transfectadas con genes informadores.

Se usaron células PC12 para analizar la inducción por carbacol de las tres construcciones promotor c-fos-gen de
60 luciferasa, pFC4X2FIRE, pFC1XP2, que incluyen un fragmento c-fos de 2.200 pb de c-fos, y pFC7XP2, que incluye un fragmento de 350 pb del promotor c-fos. Con fines comparativos, se transfectaron también células PC12 con pFC4XP2, un plásmido que contiene un gen de fusión informador consistente en el fragmento de 500 pb del promotor c-fos de pFC4 y la secuencia codificante del gen de la luciferasa.

65 Se midieron las razones señal-a-ruido de las actividades luciferasa de células PC12 tratadas con carbacol frente a las no tratadas, transfectadas con los tres plásmidos alternativos promotor c-fos-gen de la luciferasa y la construcción sin modificar promotor c-fos-luciferasa, pFC4XP2. Los niveles de luciferasa inducidos por carbacol de células PC12 transfectadas con la construcción del gen informador sin modificar pFC4XP2 y la construcción del gen de fusión

ES 2 240 957 T3

informador que contiene la secuencia FIRE (pFC4XP2FIRE) eran aproximadamente 12 y 17 veces mayores, respectivamente, que los niveles de fondo de luciferasa de células no tratadas. Los niveles de luciferasa de células PC12 tratadas con carbacol que habían sido transfectadas con construcciones de genes informadores que contenían fragmentos del promotor c-fos mayores (pFC1XP2) y menores (pFC7XP2) eran 14 y 11 veces superiores a los niveles de luciferasa de fondo, respectivamente.

Dado que se consiguió mejorar la inducción por carbacol de la actividad luciferasa en células PC12 transfectadas con la construcción promotor c-fos-gen de la luciferasa que contenía la secuencia FIRE, pFC4XP2FIRE, sería posible conseguir una mejor inducción y mayores razones de señal a ruido modificando la construcción y optimizando la localización de la secuencia FIRE en la construcción con respecto a estos parámetros. La razón señal-a-ruido y, por lo tanto, la sensibilidad y fiabilidad del ensayo deberían mejorar cuando se transfectan células PC12, COS-7 u otras con estos plásmidos y se usan en el ensayo basado en la transcripción.

En particular, se espera que construcciones en las que la localización de la secuencia FIRE imita más estrechamente su localización en el gen c-fos den mejores niveles de inducciones y razones señal a ruido. Por ejemplo, las construcciones que contienen una fusión de gen informador que incluye al menos el primer exón del gen c-fos, incluyendo la secuencia FIRE y posiblemente toda o una porción de la región intragénica, deberían exhibir una razón señal a ruido relativamente alta al inducir la región promotora de c-fos. Se pueden construir una serie de construcciones que contienen diversas porciones del gen c-fos y fusionarlas a un gen informador y unirlas operativamente al promotor c-fos. Se pueden transfectar células COS-7, PC12 u otras células adecuadas apropiadamente y medir los niveles de inducción del gen informador. Se puede usar cualquier otro gen informador que funcione como gen informador, tal como el gen codificante de la β -galactosidasa, cuando se fusiona a una porción del promotor c-fos.

Como serán aparentes modificaciones para los expertos en la técnica, se pretende que esta invención esté sólo limitada por el alcance de las reivindicaciones adjuntas. También se describen en las siguientes reivindicaciones diversas características de la invención.

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Un método de estudio de compuestos de ensayo para determinar la actividad agonista o antagonista de cada uno de dichos compuestos con respecto a un receptor copulado a proteínas G de la superficie celular, consistente en las siguientes etapas:

a) poner en contacto una célula eucariótica que contiene un receptor copulado a proteínas G heterólogo expresado a partir de un gen heterólogo y una construcción de gen informador heterólogo con el compuesto,

10 donde la construcción de gen informador contiene un gen informador bajo el control de al menos un elemento de control de la transcripción que responde a una condición intracelular que se produce cuando dicho receptor interactúa con el compuesto, y

15 b) medir la cantidad de transcripción o de traducción del gen informador.

2. El método de la reivindicación 1, que además consiste en:

20 comparar la diferencia en la cantidad de transcripción o de traducción de un gen informador en una célula eucariótica en presencia del compuesto de ensayo con la cantidad de transcripción o de traducción en ausencia de compuesto, o con la cantidad de transcripción en ausencia del receptor copulado a proteínas G, mediante lo cual se identifican los compuestos de ensayo que modulan dicha actividad mediada por receptores.

25 3. El método de la reivindicación 1 ó 2, donde la construcción de gen informador contiene una secuencia reguladora de la transcripción que es el elemento regulador intragénico del gen *c-fos*, mediante lo cual el nivel de transcripción del gen informador en ausencia del receptor de la superficie celular o del compuesto de ensayo es menor que en ausencia del elemento regulador intragénico.

30 4. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el receptor copulado a proteínas G es seleccionado entre receptores muscarínicos, receptores adrenérgicos, receptores de dopamina y receptores de serotonina.

35 5. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el elemento de control transcripcional incluye un promotor seleccionado entre: el promotor del gen *c-fos*, el promotor del gen del péptido intestinal vasoactivo, el promotor del gen de la somatostatina, el promotor del gen de la proencefalina, el promotor del gen de la fosfoenolpiruvato carboxikinasa o el promotor del gen del factor de crecimiento de los nervios-1 A.

40 6. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el gen informador es seleccionado entre el gen codificante de la cloranfenicol acetiltransferasa bacteriana, el gen codificante de la luciferasa de luciérnaga, el gen codificante de la β -galactosidasa o el gen codificante de la fosfatasa alcalina.

45 7. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la construcción del gen informador incluye al menos una secuencia de nucleótidos reguladora de la transcripción seleccionada entre elementos que responden al suero, elementos que responden al monofosfato cíclico de adenosina y elementos que responden a los niveles intracelulares de iones calcio.

50 8. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde se determina la cantidad de transcripción midiendo la cantidad de ARNm que se transcribe a partir del gen informador.

9. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde se mide la cantidad de transcripción o de traducción midiendo la cantidad de proteína del gen informador que se produce.

10. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde el compuesto de ensayo es un antagonista.

55 11. El método de la reivindicación 10, que además consiste, antes de comparar la diferencia en la cantidad de transcripción o de traducción del gen informador, en poner en contacto la célula eucariótica con un agonista que activa el receptor copulado a proteínas G, mediante lo cual se induce la transcripción del gen informador.

60 12. Un método de la reivindicación 1, donde el ensayo es un rastreo de un gran número de compuestos potencialmente efectivos desde el punto de vista farmacéutico.

60

65

ES 2 240 957 T3

LISTA DE SECUENCIAS

(1) INFORMACIÓN GENERAL:

- 5 (i) SOLICITANTE: Harpold, Michael M.
Brust, Paul
- (ii) TÍTULO DE LA INVENCION: MÉTODOS DE ENSAYO Y COMPOSICIONES PARA DETECTAR Y
10 EVALUAR LA TRANSDUCCIÓN INTRACELULAR DE UNA SEÑAL EXTRACELULAR
- (iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 4
- (iv) DIRECCIÓN PARA LA CORRESPONDENCIA:
- 15 (A) DESTINATARIO: Fitch Even Tabin & Plannery
(B) CALLE: 135 So. LaSalle Street, Suite 900
(C) CIUDAD: Chicago
(D) ESTADO: IL
20 (E) PAÍS: EE.UU.
(F) ZIP: 60603
- (v) FORMA LEÍBLE DEL ORDENADOR:
- 25 (A) TIPO DE MEDIO: Disco flotante
(B) ORDENADOR: PC compatible de IBM
(C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS
30 (D) PROGRAMA: PatentIn Release #1.24
- (vi) DATOS DE LA SOLICITUD ACTUAL:
- (A) NÚMERO DE SOLICITUD: US PCT/US91/05625
35 (B) FECHA DE SOLICITUD: 07-AGOSTO-1991
(c) CLASIFICACIÓN:
- (vii) DATOS DE LA SOLICITUD ANTERIOR:
- 40 (A) NÚMERO DE SOLICITUD: US 07/563.751
(B) FECHA DE SOLICITUD: 07-AGOSTO-1990
- (viii) INFORMACIÓN SOBRE EL ABOGADO/AGENTE:
- 45 (A) NOMBRE: Saidman, Stephanie L.
(B) NÚMERO DE REGISTRO: 33.779
(C) NÚMERO DE REFERENCIA/EXPEDIENTE: 1838-51826
- (ix) INFORMACIÓN SOBRE TELECOMUNICACIONES:
- 50 (A) TELÉFONO: 619-552-1311
(B) TELEFAX: 619-552-0095

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. ID. N°: 1:

- 55 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 36 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
60 (C) TIPO DE HEBRA: sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)
- 65 (ix) CARACTERÍSTICA
- (A) NOMBRE/CLAVE: misc feature

ES 2 240 957 T3

(B) LOCALIZACIÓN: 16..21

(D) OTRA INFORMACIÓN: /función = "secuencia de reconocimiento de restricción con EcoRI"
/marcaje = EcoRI

5 (ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE/CLAVE: misc signal

(B) LOCALIZACIÓN: 22..34

10 (D) OTRA INFORMACIÓN: /función = "codon de inicio de la transcripción"

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. ID. Nº: 1:

15 CCCCAGCCCC ACCTTGAATT CATGAACACT TCAGCC

36

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. ID. Nº: 2:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

20 (A) LONGITUD: 37 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE HEBRA: sencilla

25 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(ix) CARACTERÍSTICA

30 (A) NOMBRE/CLAVE: misc feature

(B) LOCALIZACIÓN: 17..22

(D) OTRA INFORMACIÓN: /función = "secuencia de reconocimiento de restricción con EcoRI"
/marcaje = EcoRI

35 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. ID. Nº: 2:

CTCCCGCAA TGCTGAGAAT TCTATCTCCT GCATCCC

37

40 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. ID. Nº: 3:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

45 (A) LONGITUD: 17 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE HEBRA: sencilla

50 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(ix) CARACTERÍSTICA

55 (A) NOMBRE/CLAVE: misc feature

(B) LOCALIZACIÓN: 5..10

(D) OTRA INFORMACIÓN: /función = "secuencia de reconocimiento de restricción con EcoRI"
/marcaje = EcoRI

60 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. ID. Nº: 3:

CAGAGAATTC TATCTCC

17

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. ID. Nº: 4:

65 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 18 pares de bases

ES 2 240 957 T3

- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE HEBRA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

5

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(ix) CARACTERÍSTICA

(A) NOMBRE/CLAVE: misc feature

10

(B) LOCALIZACIÓN: 7..12

(D) OTRA INFORMACIÓN: /función = "secuencia de reconocimiento de restricción con EcoRI"
/marcaje = EcoRI

15

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. ID. Nº: 4:

CACCTTGAAT TCATGAAC

18

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65