

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 393 642**

51 Int. Cl.:

G01N 33/58 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08829659 .5**

96 Fecha de presentación: **28.08.2008**

97 Número de publicación de la solicitud: **2191275**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.06.2010**

54 Título: **Identificación de moléculas que modulan las interacciones proteína-proteína usando reporteros activados por proteasa**

30 Prioridad:

04.09.2007 US 969756 P
30.07.2008 US 84987

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:

26.12.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:

26.12.2012

73 Titular/es:

SANOFI (100.0%)
54, rue La Boétie
75008 Paris, FR

72 Inventor/es:

CAI, JIDONG;
WRIGHT, PAUL S.;
WEISSENSEE, PAUL y
EISHINGDRELO, HAIFENG

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 393 642 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

Identificación de moléculas que modulan las interacciones proteína-proteína usando reporteros activados por proteasa

Campo de la invención

5 Esta invención se refiere a los materiales y métodos para determinar las interacciones entre las moléculas de interés. Más particularmente, se refiere a la determinación de si una sustancia particular, por ejemplo, un "compuesto de ensayo" modula la interacción de dos o más proteínas específicas de interés. La determinación envuelve monitorizar la activación de un gen reportero que puede estar en una célula, en solución o en un paquete o unidad artificial que contiene uno o más reactivos de interés, donde la activación o falta de la misma, resulta de la modulación o de la falta de modulación. La determinación ocurre generalmente usando células transformadas o transfectadas, también presentadas como un aspecto de la invención, como lo son los agentes usados para transformarlas o transfectarlas. Puede también emplearse un sistema libre de células o un sistema que usa un paquete artificial o unidad que lleva uno o más reactivos de interés, tales como un virus, una partícula tipo virus, un liposoma y similares.

15 Antecedentes y técnicas relacionadas

El estudio de las interacciones proteína/proteína, como está ejemplificado, por ejemplo, por la identificación de ligandos para receptores, es un área de gran interés. Incluso cuando se conoce un ligando o ligandos para un receptor dado, hay interés en identificar ligandos más eficaces o más selectivos. Los receptores acoplados con la proteína G, GPCRs, también conocidos como receptores transmembrana 7 (7TMR), se describirán aquí como un ejemplo no exclusivo de una clase de proteínas que puede ser caracterizada de esta forma. Sin embargo, cualquiera de las proteínas que interaccionan, por ejemplo, los miembros de un ciclo metabólico o una cascada, son adecuados para uso con el ensayo instantáneo.

Los GPCRs son la clase mayor de receptores de superficie celular conocidos para los seres humanos y se consideran así una aplicación primaria de la invención. Ligandos que modulan la señalización por GPCRs incluyen las hormonas, neurotransmisores, péptidos, glicoproteínas, lípidos, nucleótidos e iones. También se sabe que los GPCRs son receptores para los sentidos, por ejemplo, receptores que son conocidos como receptores de los sentidos, por ejemplo receptores para la luz, el olor, una feromona y el sabor. Dado estos papeles numerosos y diversos, los GPCRs son objeto de una investigación intensa, por ejemplo, en aplicaciones de defensa química y biodefensa y como fármacos útiles para tratar varios trastornos. Ya ha habido muchos éxitos de descubrimiento de fármacos. Por ejemplo, Howard, et al., Trends Pharmacol. Sci., 22:132 140 (2001) han estimado que más del 50% de los fármacos en el mercado actúan sobre dichos receptores.

Los "GPCRs" como se usa aquí, se refiere a cualquier miembro de la superfamilia de receptores GPCR. Esta superfamilia está caracterizada por una estructura de dominio de transmembrana de siete (7TM). Los ejemplos de estos receptores incluyen, pero no se limitan a , la clase A o receptores "de tipo rodopsina"; la clase B o receptores "tipo secretina"; la clase C o "receptores tipo glutamato metabotrópicos"; los receptores relacionados del Frizzled y Smoothed ; la familia de receptores de la adhesión o los receptores EGF-7TM/LNB-7TM ; los receptores de adiponectina y los receptores relacionados ; y los receptores quimiosensibles que incluye los receptores de olor, gusto, los receptores vomeronasal y de feromonas. Como ejemplos, la superfamilia GPCR en seres humanos, que incluye pero no está limitada a, las moléculas del receptor descritas por Vassilatis, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 100:4903 4908 (2003); Takeda, et al., FEBS Letters, 520:97 101 (2002); Fredricksson, et al., Mol. Pharmacol., 63:1256 1272 (2003); Glusman, et al., Genome Res., 11:685 702 (2001); y Zozulya, et al., Genome Biol., 2:0018.1 0018.12 (2001).

En resumen, el mecanismo general de acción de la función GPCR es como se describe a continuación: 1) un GPCR se une a un ligando 2) causando un cambio conformacional en el mismo 3) estimulando una cascada de acontecimientos celulares que conducen a un cambio de la fisiología celular. GPCRs transducen las señales por medio de modular la actividad de una pluralidad de proteínas intracelulares, tales como, las proteínas que se unen al nucleótido de guanina heterotrimérico (proteínas G) y β arrestinas. En el caso de proteínas G, el complejo ligando-receptor estimula el intercambio del nucleótido de guanina y la disociación del heterotrímero de la proteína G en las subunidades α y $\beta\gamma$. En otras circunstancias, una β arrestina puede sustituir a una proteína G , oponerse a la señalización de la proteína G , sinergizar la señalización de la proteína G y así sucesivamente.

Se ha observado que ambos la subunidad α unida a GTP y el heterodímero $\beta\gamma$ regulan varias proteínas efectoras celulares, que incluye adenilciclase y fosfolipasa C (PLC). En ensayos convencionales basados en células de GPCRs, la actividad del receptor se monitoriza midiendo la salida de un camino del efector regulado por la proteína G, tal como, la acumulación de AMPc, producido por la adenilciclase; o la liberación del calcio intracelular, por ejemplo, estimulado por la actividad de PLC.

Los ensayos de transducción de la señal basados en la proteína G convencionales han sido difíciles de desarrollar para algunas dianas por una variedad de razones. Por ejemplo. primero, diferentes GPCRs están acoplados a

diferentes caminos de transducción de señales regulados por proteínas G. Los ensayos basados en proteína G tradicionales son dependientes del conocimiento de la especificidad de la proteína G del receptor diana, o los ensayos requieren la ingeniería del sistema celular para forzar acoplar el receptor diana a un camino efector de proteína G seleccionado. Segundo, ya que la superfamilia de GPCR es tan grande, todas las células expresan muchos GPCRs endógenas (así como otros receptores y factores de señalización). Así, los caminos efectores medidos pueden modularse por moléculas endógenas en adición a la diana GPCR. Este fenómeno puede causar resultados falso positivo o falso negativo, por ejemplo cuando se pretende identificar moduladores selectivos de uno GPCR diana.

La regulación de la actividad de la proteína G no es el único resultado de la unión de ligando/GPCR. Véase, por ejemplo, Luttrell, et al., *J. Cell Sci.*, 115:455-465 (2002), y Ferguson, *Pharmacol. Rev.*, 53:1-24 (2001), que revisan actividades que pueden conducir a la atenuación o terminación de la señal de GPCR. Estos procesos de terminación son útiles para prevenir una estimulación excesiva de la célula, y para reforzar una unión temporal entre una señal extracelular y el camino correspondiente intracelular.

En general, la unión de un agonista a un GPCR causa que los restos de serina y treonina en el extremo C de la molécula del receptor sean fosforilados por una quinasa de GPCR. Los GPCRs complejados con el agonista fosforilados en el extremo C interaccionan entonces con los miembros de la familia de la arrestina, por ejemplo, α arrestina, β arrestina o β arrestina 2, los cuales modulan disminuyendo o parando la señalización del receptor. La unión puede inhibir el acoplamiento de receptor a las proteínas G, de esta forma localizando el receptor para la internalización, seguido de degradación y/o reciclamiento. Por ejemplo, la unión de una arrestina, tal como β arrestina 2 a un GPCR fosforilado puede reducir la actividad de la GPCR diana de distintas maneras. El mecanismo más sencillo para que una arrestina inhiba la activación de su diana es unirse al dominio intracelular del GPCR bloqueando de esta manera el lugar de unión para la proteína G heterotrímica y previniendo que las señales extracelulares activen el camino (desensibilización). Otro mecanismo regulatorio empleado por las arrestinas es la unión del receptor a elementos de la maquinaria de internalización de la membrana (por ejemplo, endocitosis mediada por la clatrina) que inicia la internalización del receptor en una vesícula recubierta para fusión con un endosoma. Una vez en un endosoma, el receptor puede ser destinado a la degradación (por ejemplo, por lisosomas) o puede ser reciclado a la membrana plasmática donde puede ser activado de nuevo.

Por lo tanto, la unión de un ligando a GPCR puede decirse que "modula" la interacción entre el GPCR y las proteínas de arrestina, puesto que la unión de un ligando a GPCR causa que la arrestina se una a GPCR, modulando de esta forma su actividad. En esto, cuando se usa la palabra "modula" o cualquier forma de la misma en relación a interacción o unión, se refiere simplemente a algún cambio en la forma en que las dos proteínas de la invención interaccionan, cuando, por ejemplo, está presente un compuesto de ensayo o ligando, comparado con como estas dos proteínas interaccionan en su ausencia. De esta forma, modular incluye la mera unión de dos moléculas. Por ejemplo, la presencia del compuesto de ensayo puede hacer más fuerte o aumentar la interacción de las dos proteínas, debilitarla, bloquearla, inhibirla, redirigirla, disminuirla o modificarla en alguna dirección, manera o forma que es detectable, o el compuesto de ensayo puede facilitar la probabilidad de interacción y así sucesivamente.

En algunas circunstancias, la señalización de 7TMR puede ocurrir independientemente de las proteínas G. Así, en la unión de 7TMR a un ligando, se recluta a β arrestina en vez de la proteína G para precipitar o iniciar una cascada de señalización en la célula. Véase, por ejemplo, Violin & Lefkowitz, *Trends Pharm Sciences* 28(8):416-422, 2007 y DeFea, *Br J Pharm* 1-12, doi:10.1038/sj.bjp.0707508, 2007 que resumen los dos caminos de señalización independientes e interdependientes que comienzan con el 7TMR activado, y que pueden envolver tanto una proteína G como una β arrestina; quien resume los dos caminos de señalización independiente e interdependiente que comienza en el 7TMR activado, y que puede envolver ambas la proteína G y la β arrestina; o envolver tanto una proteína G como una β arrestina.

Así, por ejemplo, los antagonistas conocidos de un 7TMR activan la señalización de β arrestina. El propranolol, un conocido antagonista de la señalización del receptor adrenérgico β_2 (ADRB2) y de la señalización de la proteína G, se mostró como un agonista parcial de la señalización de β arrestina, activando los caminos iniciados por la β arrestina, como se observa en la práctica de la invención presente.

Los eventos de señalización celular que responden a estímulos extracelulares son generalmente mediados por interacciones proteína-proteína. Las interacciones proteína-proteína son por lo tanto de gran interés para los fisiólogos celulares. Una herramienta para monitorizar estas interacciones envuelve usar una proteína que activa el reportero dividido o permutado, tal como, la proteasa del virus etch del tabaco (TEV). Las partes divididas de la proteasa vuelven a ganar su actividad cuando se expresan conjuntamente como una construcción de fusión con las proteínas interactivas. Wehr, et al., "Monitoring Regulated Protein-protein Interactions Using Split TEV", *Nature Methods*, 3:985-993 (2006). Esta propiedad se ha usado junto con los sistemas de reportero acoplado por transcripción. Véase también Ozawa et al, *Analytica chimica acta*, 556 (1). 58-68.

Este conocimiento ha conducido a métodos alternativos para probar la activación e inhibición de GPCRs. Uno de estos métodos envuelve monitorizar la interacción con las arrestinas en una célula intacta que lleva maquinaria de transcripción. Una ventaja de esta aproximación es que no es necesario ningún conocimiento de los caminos de la proteína G. Véase, por ejemplo, el documento de patente de Estados Unidos N° 7,049,076: "Method for Assaying

Protein-Protein Interaction" para Lee et al. Lee et al. muestran un sistema reportero que requiere sistemas reportero acoplados por transcripción. Según Lee et al., un factor de transcripción peptídico se rompe de una primera proteína cuando interactúan dos proteínas. La segunda proteína es un factor de transcripción que activa un gen reportero. El factor realiza entonces la función reportero por medio del transporte al núcleo para ejecutar la transcripción de un reportero detectable. Puesto que el método es dependiente de la transcripción, el método es inoperable, por ejemplo, en plaquetas, paquetes o unidades artificiales, tales como liposomas, cocleatos, partículas tipo virus, y partículas virales.

Oakley, et al., *Assay Drug Dev. Technol.*, 1:21 30 (2002) y los documentos de patente de Estados Unidos N° Nos. 5,891,646 y 6,110,693, "Methods Of Assaying Receptor Activity and Constructs Useful in Such Methods" para Barak et al., describen ensayos donde se mide la redistribución de moléculas de arrestina marcadas con fluorescencia en el citoplasma a receptores activados en la superficie celular. Estos métodos usan medir mediante imagen de alta resolución de las células para medir la relocalización de la arrestina y la activación del receptor. La persona con conocimientos de la técnica reconocerá que este es un procedimiento complejo, complicado que puede ser descarrilado por la afinidad e interacción de los fragmentos enzimáticos complementarios usados aquí que pueden competir con la interacción inducida por el modulador deseada. Por esto, el método sufre de falsos positivos que se originan en una auto reasociación del enzima, independientemente de la unión con el ligando. Un ensayo más sencillo, más robusto con una incidencia menor de falsos positivos, y que es más fácilmente adaptable a una criba de alta velocidad sería deseable.

Se han solicitado y concedido varias otras patentes de Estados Unidos que envuelven estos puntos. Por ejemplo, el documento de patente de Estados Unidos N° 6,528,271, "Inhibition Of β -Arrestin Mediated Effects Prolongs and Potentiates Opioid Receptor-Mediated Analgesia" para Bohn et al., describe ensayos para cribar medicamentos que controlan el dolor, donde se mide la inhibición de la β arrestina. Solicitudes de patentes de Estados Unidos publicadas, tales como 2004/0002119, 2003/0157553 y 2003/0143626; y el documento de patente de Estados Unidos N° 6,884,870, describen ensayos de distintas formas que envuelven GPCRs. El documento de patente de Estados Unidos N° 7,128,915 presenta tecnología de GPCR similar El documento de patente de Estados Unidos N° 7,049,076 mencionado anteriormente presenta en general actividades de GPCR o ensayos de criba que demuestran la importancia de la investigación de GPCR.

Así, un aspecto de la presente invención, esto es, proporcionar un ensayo más sencillo para monitorizar y/o determinar la modulación de interacciones proteína/proteína específicas, por ejemplo, fisiología mediada por receptores, tales como respuestas celulares mediadas por GPCR, donde las proteínas incluyen, pero no están limitadas a , proteínas unidas a la membrana, incluyendo receptores en general, y GPCRs como ejemplo importante, es satisfactorio para dirigirse a una necesidad deseada en la técnica.

Compendio de la invención

La presente invención proporciona métodos para determinar si un compuesto de ensayo modula una interacción proteína-proteína específica de interés. La interacción proteína-proteína es un mecanismo común de la biología por donde una célula puede interactuar con sus alrededores, un acontecimiento extracelular, tal como, un ligando que se une a un receptor, y puede producir una respuesta interna con o sin internalización del ligando. La internalización puede envolver dos o mas proteínas con partes en o fuera de la membrana. Así, la formación de dímeros, heterodímeros o multímeros puede producir una respuesta interna. Las interacciones intracelulares proteína-proteína pueden estar también envueltas en cascadas de señalización. Un esquema general de la presente invención es aplicable a las interacciones proteína-proteína de cualquier tipo. La interacción puede, por ejemplo, ser entre dos proteínas unidas a membrana, entre una proteína unida a membrana y una proteína citoplasmática, entre proteínas citoplásmicas, etc. Una realización contempla una proteína citoplasmática que transloca a otro organelo, tal como un núcleo, en donde un reportero es activado para producir una señal. Preferiblemente se usa un ensayo basado en la célula, pero puede usarse un sistema libre de células, por ejemplo usando lisatos, fracciones de membrana, fracciones nucleares, etc. Incluidos están los empaquetamientos artificiales o unidades que contienen uno o mas reactivos de interés, tal como liposomas, partículas semejantes a virus y así sucesivamente. La presente invención mejora a Lee et al. descrito anteriormente en que ninguna transcripción es necesaria. Los resultados pueden así ser obtenidos mas rápidamente y pueden obtenerse de sistemas basados en células o sistemas libres de células. Una descripción general de algunas realizaciones especialmente preferidas aparecen a continuación. Estas realizaciones son meramente ilustrativas y de ninguna manera limitan la amplitud de la invención descrita y reivindicada aquí.

Una característica proporcionada por la presente invención comprende contactar al menos un compuesto de prueba con una superficie celular que expresa una proteína de interés. El compuesto de prueba puede ser valorado por su habilidad para modular la actividad de la proteína de interés, por ejemplo , una proteína de receptor. La expresión de la proteína de interés en una célula puede formarse por la transformación o transfección de una célula seleccionada, por ejemplo, de una línea celular de insectos o línea celular de mamífero, con: (1) una molécula de ácido nucleico o moléculas que comprende(n), (a) un polinucleótido que codifica una primera proteína de interés, y (b) un polinucleótido que codifica una proteína que activa el reportero configurada con un lugar de escisión sensible a una proteasa o a una porción activa o activable de una proteasa, y (2) una molécula de ácido nucleico o moléculas que comprende(n), (a) un polinucleótido que codifica una segunda proteína cuya interacción con la primera proteína de interés cambia cuando un modulador, por ejemplo un compuesto de prueba positivo, está presente, y (b) un

polinucleótido que codifica una proteasa o una parte activa o activable de una proteasa que es específica para el lugar de escisión codificado por el ácido nucleico (1). Las moléculas, por ejemplo, un compuesto de prueba positivo, que modula una interacción proteína-proteína de interés (entre las dos proteínas de interés) puede ser valoradas o ensayadas añadiendo, por ejemplo, cuando sea necesario, sustratos de proteína que activa el reportero en células que expresan la primera y segunda proteínas de interés y un sistema de reportero como se describe aquí.

Así, puede obtenerse un método de la presente invención que usa un enzima permutable como lectura de una interacción proteína-proteína de interés. La proteína que activa permutable, tal como un enzima, que se usa como reportero o proteína que activa al reportero puede estar en estado inactivo que puede activarse por escisión, por ejemplo, por la actividad enzimática asociada con la segunda proteína de interés. Otra opción comprende una proteína que activa un reportero inactivo que se activa cuando la primera y segunda proteínas de interés interaccionan. Así, pueden cribarse compuestos que modulan la interacción de la primera y segunda proteína de interés. Un logro de este sistema es que permite una alta velocidad en la identificación de moléculas que modulan interacciones proteína-proteína seleccionadas.

Una enzima capaz (solo o con una o más moléculas asociadas) de producir una lectura de "péptido A" está presente en una forma cuya actividad puede cambiarse. La enzima puede ser o activada o inactivada con este cambio. Por ejemplo, puede construirse un lugar de escisión en la enzima que la inactive con la escisión, por ejemplo, por una segunda enzima acoplada a la segunda proteína de interés.

Alternativamente la escisión puede dar como resultado la activación. La (las) enzima(s) de elección pueden ser producidas en una célula hospedante deseada usando uno o más ácidos nucleicos. Por ejemplo, un vector puede comprender un polinucleótido que codifica una molécula seleccionada como una enzima inactiva que puede ser activada por escisión de la enzima inactiva en un lugar de escisión. El lugar de escisión puede ocurrir naturalmente, pero preferiblemente el lugar de escisión se construye en el polinucleótido de manera que se exprese como una enzima permutada. Por ejemplo, un lugar de escisión no nativo de la proteína de esa célula y/o una proteína no nativa de la célula hospedante que puede ser transfectada en la célula hospedante. Realizaciones alternativas incluyen una enzima activada por escisión o eliminando un péptido bloqueante o permitiendo que dos polipéptidos cambien su configuración de manera que se reorganicen para activar la actividad enzimática.

Así, una realización presenta un polipéptido activo, por ejemplo una enzima. La "enzima" puede ser inactivada por escisión. Para especificidad, puede ser deseable construir un lugar de escisión en la enzima reconocida por una proteasa que no es nativa a la célula hospedante. El lugar de la escisión puede ser introducido en la forma de una unión que se une, o sea mantiene en contacto, dos porciones o motivos de la "enzima", la unión puede ser un lugar de escisión nativo de la "enzima", por ejemplo, la enzima con un lugar de escisión puede ser de otro tipo de célula o de otra especie y no encontrarse en la célula hospedante, o el lugar de escisión puede producirse por una sustitución conservadora de uno o más aminoácidos. La sustituciones conservadoras son como se conoce en la técnica. Por ejemplo pueden conservarse la carga, tamaño, aromaticidad u otras características para mantener la actividad. La actividad no necesita ser idéntica a la de la "enzima" no permutada, pero debe ser alterada por la escisión en el lugar de escisión. Puede interponerse un lugar de escisión entre dos porciones de una enzima. La escisión de este lugar puede alterar la enzima causando así la inactivación o puede permitir que ocurra actividad catalítica, por ejemplo, eliminando una porción de péptido que bloquea un lugar de unión o un lugar catalítico o permitiendo que dos porciones de una enzima permutada interaccionen de una manera que restaure la actividad.

Así, la escisión en el lugar de escisión puede inactivar o activar la proteína que produce una lectura. La escisión puede conseguirse en presencia de un compuesto de prueba, por ejemplo, cuando un producto de expresión de una molécula de ácido nucleico que comprende un polinucleótido que codifica la segunda proteína de interés interacciona con la primera proteína de interés iniciando así la actividad de una proteasa que reconoce y rompe la secuencia de escisión sensible a la proteasa en la proteína que activa el reportero permutado.

Una segunda proteína de interés interacciona con la primera proteína de interés en presencia de, o alternativamente en ausencia de, una tercera molécula. Por eso se dice que esta tercera molécula modula la interacción proteína-proteína entre los polipéptidos A y B. La interacción proteína-proteína o péptido-péptido (para los propósitos de la discusión proteína y péptido se usan de la misma forma) que se modula por una tercera molécula, por ejemplo, un compuesto de prueba, es así eficientemente reportado por el sistema de la presente invención. Las moléculas que modulan la interacción proteína-proteína (entre polipéptidos denominados 1 y 2, primero y segundo, A y B, y así sucesivamente, dichas frases y términos se usan aquí de la misma manera) pueden medirse por la molécula que activa al reportero activo o añadiendo un sustrato de la proteína que activa al reportero activo a células que expresan el sistema que comprende las proteínas de interés.

La selección de las proteínas A y B es una elección de diseño puesto que pueden usarse pares de moléculas que se sabe o sospecha que se asocian, interaccionan y así sucesivamente. Como se describe aquí, una pareja adecuada es una 7TMR con tanto una proteína G como una β arrestina. Otro ejemplo es un receptor frizzled y una proteína de unión Dishevelled; y similares. Todavía otro ejemplo sería uno que opera durante y después de la interacción célula-célula. Por lo tanto, las proteínas A y B están en la célula 1. Cuando la célula 1 es contactada por o con la célula 2, esa interacción desencadena una acción por y en la célula 1 revelada por la asociación de las proteínas A y B, la

interacción y así sucesivamente, y revelada además por los reactivos de la invención presente que proporcionan una señal discernible y detectable.

Todavía otro ejemplo es que la proteína A se exprese en la célula 1 y la B en la célula 2. Eso puede conseguirse, por ejemplo, construyendo una proteína G o una β arrestina que tenga un dominio extracelular, o construyendo una proteína que activa el reportero que tenga un dominio extracelular sobre el que se actúa, por ejemplo, por o con la célula 1 después de la activación de la célula 1 con un ligando o candidato a fármaco. Alternativamente, pueden asociarse espontáneamente moléculas endógenas de las dos células. En otra realización, la proteasa y la molécula que activa el reportero se configuran para que se expresen en la superficie de la célula o unidad, como dominios extracelulares.

En todavía otra realización, las proteínas que se asocian, ensamblan y así sucesivamente para formar una estructura de prensado que comprende las proteínas A y B. El ensayo presente puede usarse para identificar moléculas que facilitan o previenen la asociación o ensamblaje. Un ejemplo sería la formación de un cápsido de virus, ensamblaje de partículas tipo virus o formación de ribosomas.

En los mecanismos comunes de receptores acoplados con la proteína G (GPCRs también conocidos como 7TMRs, dichos términos se usan aquí de la misma manera), la activación agonista de GPCR produce el incorporación de una molécula intracelular que está envuelta en un camino de señalización, tal como iniciar, terminar, tener sinergia con, oponer y así sucesivamente, tal como una proteína G o una β arrestina. Así, una quinasa del receptor acoplada a una proteína G puede actuar sobre el receptor activado lo que causa la fosforilación del receptor. El receptor fosforilado facilita las β arrestinas se unan al receptor. Este mecanismo está bien conservado en algunos GPCRs. En otras circunstancias, el receptor activado interactúa en vez de esto con una β arrestina.

Para evaluar moléculas que modulan la interacción proteína-proteína, tal como la activación de GPCR, se diseñó un sistema para probar las interacciones proteína-proteína y se probó en un sistema molecular de reportero permutado GPCR. Por ejemplo, el sistema molecular de reportero puede ser un sistema de ensayo luciferasa/luciferina. Generalmente, la molécula de reportero es una molécula extraña exógena a la célula hospedante o mecanismo de señalización. Esto minimiza la activación espontánea de la molécula de reportero por y en la célula hospedante y de esta manera, la generación de la señalización, y de esta manera, falsos positivos. La molécula que activa el reportero puede ser una con una estructura de dominio o una que puede permutarse para dar una proteína que activa el reportero inactivo que tiene el potencial de actividad de reportero cuando se manipula. Por lo tanto, la aplicación presente contempla el uso de una molécula que activa el reportero latente. La molécula que activa el reportero permutado minimiza la actividad espontánea de la molécula que activa el reportero y por lo tanto los falsos positivos. Por ejemplo, en los ensayos de complemento de fragmentos de enzimas, la afinidad de los fragmentos de enzimas puede ser superior a la cinética de la reacción con la molécula diana, ligando o molécula que se está cribando de manera que se produzca la reasociación espontánea de los fragmentos del enzima para formar una molécula funcional, contribuyendo de esta forma a aumentar el ruido de base y/o los falsos positivos. La proteína de interés que activa el reportero permutado puede construirse para tener un lugar en el que cuando se actúa sobre él, permita a la molécula que activa al reportero permutado formar una molécula funcional. Ese lugar puede ser un lugar de proteasa. El lugar de proteasa preferiblemente es un lugar que es un lugar único raramente presente o no presente en la célula hospedante o unidad en la que el componente o componentes del método de interés residen. Esto proporciona otro medio de evitar la reasociación espontánea de la molécula que activa el reportero intacto, y de esta manera minimiza los falsos positivos. La señal específica se obtiene solo si los ligandos envueltos inducen últimamente a la proteasa a estar en proximidad a la proteína que activa el reportero inactivo para romper la misma, y solo en ese punto puede realizarse una entidad que activa o genera una señal activa. Hay un número de proteasas conocidas en la técnica que pueden usarse en la práctica de la invención presente. Por ejemplo, pueden ser útiles las proteasas de fuentes virales puesto que estas generalmente son extrañas a una célula hospedante intacta. Una aplicación comprende un gen de proteína que activa el reportero permutado en donde la secuencia que codifica la luciferasa de luciérnaga está pegado a o con el extremo extremo C de una secuencia de GPCR, y la β arrestina 2 (Ar2 o Arr2) está unida al gen de proteasa del virus etch del tabaco (TEV). En otra realización, una luciferasa permutada está pegada a una β arrestina (Ar o Arr) y un gen TEV está unido a una proteína de más abajo de un camino de señalización sobre la que actúa o que está envuelta con la β arrestina, o a un receptor tal como un 7TMR sospechoso de actuar independientemente de las proteínas G. Cuando se expresan en las células plásmidos fabricados para expresar los dos anteriores, los compuestos que modulan la interacción GPCR-arrestina-2, reclutan a la proteína de fusión de la Arr2-proteasa al lugar de reconocimiento de la proteasa en la luciferasa permutada y la proteasa TEV rompe a la luciferasa permutada. Los efectos de los compuestos de prueba pueden medirse por medio del cambio en la actividad enzimática ocasionado por la reconstitución de la proteína que activa al reportero, en este caso, la luciferasa se activa y puede generar una señal detectable actuando en un sustrato adecuado, tal como la luciferina.

La invención no está limitada a la luciferasa o incluso a las enzimas. La activación por ruptura es un fenómeno conocido, por ejemplo con las pro-enzimas. Sistemas de reportero no enzimáticos son también aplicables. Por ejemplo, puede usarse una proteína fluorescente verde (GFP). Una GFP permutada, por ejemplo una GFP con partes reordenadas, puede servir como la proteína que activa el reportero y el reportero. La acción por una proteasa tal como TEV u otra proteasa con el lugar de reconocimiento de la misma incluido en el polipéptido permutado

rompe la proteína que activa el reportero permutado/reportero permitiendo de esta manera la nueva disposición que produce una señal. La GFP tiene la ventaja de que ella misma es una molécula señalizadora el reportero detectable. Alternativamente, los sitios de ruptura pueden introducirse en moléculas de reportero que no perturban significativamente la señal. La ruptura que se obtiene de la interacción proteína-proteína resulta entonces en una señal de reportero reducida. Pueden introducirse lugares múltiples de ruptura en la construcción del reportero.

La estructura terciaria de las proteínas puede usarse para proporcionar una guía a la persona con conocimientos de la técnica en cuanto al mejor lugar de poner los sitios de ruptura. Por ejemplo, se esperaría que donde dos partes del polipéptido tienen un fuerte contacto, el separar estas porciones perturbando la secuencia ocasionaría la reducción o eliminación de la actividad. Con la ruptura, se esperaría que las partes interaccionasen, restaurando así la actividad.

La primera proteína de interés puede ser una proteína unida a la membrana, tal como un receptor transmembrana, por ejemplo, un GPCR. Ejemplos de receptores transmembrana incluyen el receptor β -adrenérgico (ADRB2), el receptor de arginina vasopresina 2 (AVPR2 o V2) el receptor de serotonina 1a (HTR1 A), el receptor muscarínico m2 de acetilcolina (CHRM2), quimiocina (motivo C-C) receptor 5 (CCR5), receptor de dopamina D2 (DRD2), receptor kappa de opioide (OPRK), o receptor α 1a-adrenérgico (ADRA1A), etc. Los receptores unidos a membrana son bien conocidos en la técnica. Debe entenderse que en todos los casos, la invención no está limitada a las realizaciones específicas descritas como ejemplos de la presente invención. Por ejemplo, pueden emplearse en la presente invención moléculas tales como el receptor del factor de crecimiento 1 de la insulina (IGF-1R), que es una tirosina quinasa, y proteínas que no están normalmente unidas a la membrana, como el receptor del estrógeno 1 (ESR1) y el receptor del estrógeno 2 (ESR2) La proteasa o porción de la proteasa asociada con la proteína B puede ser una proteasa A de inclusión nuclear de virus etch del tabaco (TEV). El TEV tiene un lugar de reconocimiento de siete residuos y es por lo tanto más específico que proteasas con lugares de reconocimiento más pequeños y estadísticamente más comunes. Otras proteasas son también apropiadas para uso en la presente invención. Por ejemplo, la enteroquinasa y la proteasa del factor Xa, que cada una con una secuencias de reconocimiento de cinco residuos, la trombina y PureAct™ o Clean Cut™ cada una con una secuencias de reconocimiento de seis residuos , y PreScission™ con una secuencia de reconocimiento de siete residuos son también proteasas para uso en la presente invención. La presente invención no está limitada al uso de ninguna proteasa específica. La proteasa debe, sin embargo, romper en un lugar que origine la señal generada o alterada del reportero.

La proteína que activa al reportero puede ser cualquier enzima que pueda actuar en un sustrato para producir una señal detectable. Por ejemplo, el enzima puede directa o indirectamente aumentar o disminuir la fluorescencia o quimioluminiscencia o puede causar un cambio de color. El sustrato del reportero puede ser uno biológico, tal como una proteína, o puede ser uno químico cuya reacción se cataliza por la enzima del reportero. La segunda proteína de interés puede ser una proteína de inhibición, tal como una arrestina. Las arrestinas interaccionan corrientemente con GPCRs para modular la actividad en respuesta a una interacción ligando/receptor. La célula puede ser eucariota o procariota. El reportero puede ser un componente exógeno, tal como una β galactosidasa o una luciferasa. Para simplificar, "enzima de reportero" se usa como el equivalente a una molécula que activa el reportero, activador de reportero, molécula moduladora de reportero, proteína moduladora de reportero o proteína que activa el reportero, y como abreviatura de una molécula que realiza un cambio en el rendimiento del reportero. Por ejemplo, la enzima del reportero puede causar enzimáticamente un cambio en la señal del reportero o, por ejemplo, puede causar un cambio enzimáticamente o no enzimáticamente en la señal, tal como, una señal fluorescente. La persona con conocimientos de la técnica entiende varios sistemas de reportero y proteínas de reportero que modulan o activan la señal del reportero.

La secuencia de nucleótido que codifica la primera proteína puede ser modificada para aumentar la interacción con la segunda proteína. Dichas modificaciones incluyen, pero no están limitadas a, reemplazar todo o parte de la secuencia de nucleótido de la región del extremo C de la primera proteína con una secuencia de nucleótido que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene mayor afinidad para la segunda proteína que la secuencia original. Por ejemplo, la región extremo C puede ser reemplazada por una secuencia de nucleótido que codifica la región extremo C de AVPR2, AGTRLI, F2RL1, CXCR2/IL-8b o CCR4. Dichas modificaciones son conocidas en la técnica y son un aspecto opcional de la presente invención.

Los métodos de la presente invención pueden comprender poner en contacto una pluralidad de compuestos de prueba con una pluralidad de muestras de células o unidades. Cada muestra puede ponerse en contacto con uno o más compuestos de prueba. En otra realización, una célula o unidad lleva dos moléculas diferentes con dominios extracelulares que llevan distintas moléculas que activan el reportero, ambas interaccionan con β arrestina. Se realiza la criba determinando la actividad de un reportero, por ejemplo, monitorizando la actividad enzimática de las muestras para determinar si cualquier compuesto o mezclas de compuestos modulan la interacción específica proteína/proteína. El método puede comprender poner en contacto cada muestra de prueba con un compuesto de prueba único, puede comprender poner en contacto cada muestra de prueba con una mezcla de compuestos de prueba, o puede combinar estos aspectos. Pueden probarse o cribarse compuestos que inhiben la unión de compuestos a la proteína A usando la presente invención. Por ejemplo, puede incluirse en un ensayo un ligando conocido de la proteína A y los compuestos que modulen la unión del ligando a la proteína pueden identificarse y/o

caracterizarse, como en un ensayo de tipo competitivo. Puede haber en cada ensayo muestras de control o pueden realizarse en ensayos paralelas.

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un método para determinar si un compuesto de prueba modula una o más de una pluralidad de interacciones de proteínas de interés. Estas realizaciones, en general, presentan: poner en contacto un compuesto de prueba con una pluralidad de muestras de células que han sido transformadas o transfectadas con: (a) una primera molécula de ácido nucleico que incluye, (i) un polinucleótido que codifica una primera proteína, y una secuencia de polinucleótido que codifica un lugar de ruptura para una proteasa. e (ii) un polinucleótido que codifica una proteína que activa un reportero en la célula; y (b) una segunda molécula de ácido nucleico que incluye, (i) un polinucleótido que codifica una segunda proteína cuya interacción con la primera proteína en la presencia del compuesto de prueba de interés es para ser medido, y (ii) un polinucleótido que codifica una proteasa o un polipéptido específico para romper un polipéptido en el lugar de escisión. La primera proteína puede ser diferente de las otras primeras proteínas en una pluralidad de muestras. Después el método comprende determinar la actividad del reportero en una o más de la pluralidad de muestras como una determinación de modulación de una o más interacciones de proteínas de interés.

La segunda proteína puede ser diferente en cada muestra o la misma en cada muestra. Todas las muestras pueden ser combinadas en un receptáculo común, y cada muestra puede comprender un par diferente de primera y segunda proteína. Alternativamente, cada muestra puede ser probada en un receptáculo diferente. El reportero de una muestra dada puede ser diferente del reportero en otras muestras. La mezcla de compuestos de prueba puede comprender o estar presente en una muestra biológica, tal como fluido cerebroespinal, orina, sangre, suero, pus, ascitos, fluido sinovial, un extracto de tejido, extractos de plantas o hierbas, o un exudado.

En otras realizaciones, la presente invención proporciona una célula recombinante, transformada o transfectada con (a) una molécula de ácido nucleico que incluye, (i) un polinucleótido que codifica una primera proteína, (ii) un polinucleótido que codifica un lugar de ruptura para una proteasa, una porción de una proteasa o un polipéptido con actividad de proteasa. e (iii) un polinucleótido que codifica una proteína que activa un reportero en la célula, y (b) una molécula de ácido nucleico que comprende, (i) un polinucleótido que codifica una segunda proteína cuya interacción con la primera proteína en presencia del compuesto de prueba se va a medir, e (ii) un polinucleótido que codifica una proteasa, una porción de una proteasa o un polipéptido con actividad de proteasa que es específico para dicho lugar de ruptura.

Una o ambas de las moléculas de ácido nucleico puede ser incorporada de forma estable en el genoma de una célula de ensayo hospedante. La célula puede también haber sido transformada o transfectada con un reportero. La primera proteína puede ser una proteína unida a la membrana, tal como un receptor de transmembrana, por ejemplo, un GPCR. Receptores de transmembrana ejemplificantes incluyen ADRB2, AVPR2, HTR1A, CHRM2, CCR5, DRD2, OPRK, o ADRA1A.

La proteasa o porción de una proteasa puede ser, como se mencionó anteriormente, no está limitada a la proteasa A de inclusión nuclear del virus etch del tabaco sino que puede ser cualquier proteína que activa la proteína que activa al reportero, y puede ser cualquier enzima que actúa sobre un sustrato para producir una señal usable o detectable. La segunda proteína puede ser una proteína inhibitoria. La célula puede ser eucariota o procariota, generalmente para cribar fármacos se preferirá una célula eucariota. Las células que glicosilan de una forma similar a la diana eventual de un compuesto farmacéutico pueden ser especialmente preferidas. Una célula puede ser cultivada o transformada para proporcionar las características de glicosilación deseadas. El uso de células procariotas que no tienen las mismas propiedades de glicosilación de la diana propuesta eventual puede ser útil para la criba y caracterización.

El reportero puede ser exógeno, por ejemplo una β galactosidasa, un GFP o una luciferasa. La secuencia de nucleótido que codifica la primera proteína puede ser modificada para aumentar la interacción con la segunda proteína, por ejemplo, reemplazando toda o parte de la secuencia de nucleótido de la región del extremo C de dicha primera proteína con una secuencia de nucleótido que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene mayor afinidad para la segunda proteína que la secuencia original. La región extremo C puede ser reemplazada por una secuencia de nucleótido que codifica la región extremo C de, por ejemplo, AVPR2, AGTRL1, F2RL1, CXCR2/IL-8B, CCR4 o GRPR.

La presente invención comprende como una realización la provisión de una molécula aislada de ácido nucleico que incluye, (i) un polinucleótido que codifica una proteína, (ii) un polinucleótido que codifica un lugar de ruptura para una proteasa, una porción de una proteasa o un polipéptido con actividad de proteasa. e (iii) un polinucleótido que codifica una proteína que activa un reportero en una célula u otro sistema de ensayo. La proteína puede ser una proteína unida a la membrana, tal como un receptor de transmembrana, por ejemplo, un GPCR. Receptores de transmembrana ejemplificantes incluyen ADRB2, AVPR2, HTR1A, CHRM2, CCR5, DRD2, OPRK, o ADRA1A. La proteasa o porción de una proteasa puede ser una A de inclusión nuclear del virus etch del tabaco. Como se ha mencionado anteriormente, la proteína que activa el reportero puede ser cualquier proteína que interacciona con un sustrato para producir una señal y no necesita estar limitada al ejemplo de TEV descrito aquí. Esto u otro ejemplo de la invención no debe verse como limitante de la invención para realizaciones específicas.

En algunas realizaciones, la invención presenta un vector de expresión que comprende una molécula aislada de ácido nucleico que comprende, (i) un polinucleótido que codifica una proteína (ii) un polinucleótido que codifica un lugar de ruptura para una proteasa, una porción de una proteasa o un polipéptido que codifica una actividad de proteasa, e (iii) un polinucleótido que codifica una proteína que activa un reportero en la célula, y además está unida de forma operable a un promotor.

En algunas realizaciones la invención presenta una molécula aislada de ácido nucleico que comprende, (i) un polinucleótido que codifica una proteína cuya interacción con otra proteína en presencia de un compuesto de prueba se va a medir, e (ii) un polinucleótido que codifica una proteasa, una porción de una proteasa o un polipéptido con una actividad de proteasa que es específico para el lugar de ruptura. La proteína o la otra proteína puede ser una proteína inhibidora, tal como una arrestina.

En algunas realizaciones la invención presenta también un vector de expresión que comprende una molécula aislada de ácido nucleico que comprende, (i) un polinucleótido que codifica una proteína cuya interacción con otra proteína en presencia de un compuesto de ensayo se va a medir, e (ii) un polinucleótido que codifica una proteasa o una porción de una proteasa que es específica para el lugar de ruptura, dicho ácido nucleico está además unido operativamente a un promotor.

Una realización adicional presenta una proteína de fusión producida por expresión de: una molécula aislada de ácido nucleico que incluye, (i) un polinucleótido que codifica una proteína (ii) un polinucleótido que codifica un sitio de escisión para una proteasa, una porción de una proteasa o un polipéptido con actividad proteasa, y (iii) a un polinucleótido que codifica una proteína que activa un reportero en la célula, y que además está unida de forma operable a un promotor; o una molécula aislada de ácido nucleico que incluye, (i) un polinucleótido que codifica una proteína cuya interacción con otra proteína en presencia de un compuesto de prueba se va a medir, e (ii) un polinucleótido que codifica una proteasa o una porción de una proteasa que es específica para el lugar de ruptura.

En aún otra realización, la invención presenta un kit de ensayo útil para determinar si un compuesto de ensayo modula una interacción específica proteína/proteína de interés. El kit de ensayo comprende uno o más de lo siguiente: una porción separada de cada uno de (a) una molécula aislada de ácido nucleico que comprende, un polinucleótido que codifica la primera proteína (i) un polinucleótido que codifica un lugar de ruptura para una proteasa, una porción de una proteasa o un polipéptido con actividad de proteasa, (ii) un polinucleótido que codifica una proteína que activa un gen reportero en la célula, y (b) una molécula de ácido nucleico que comprende, (i) un polinucleótido que codifica una segunda proteína cuya interacción con dicha primera proteína en presencia de un compuesto de ensayo se mide, (ii) un polinucleótido que codifica una proteasa o una porción de una proteasa que es específica para el lugar de ruptura, y opcionalmente contiene los medios para mantener cada uno de (a) y (b) separados el uno del otro. una porción separada de cada uno de (a) una molécula aislada de ácido nucleico que comprende, un polinucleótido que codifica la primera proteína (i) un polinucleótido que codifica un lugar de ruptura para una proteasa, una porción de una proteasa o un polipéptido con actividad de proteasa, (ii) un polinucleótido que codifica una proteína que activa un gen reportero en la célula, y (b) una molécula de ácido nucleico que comprende, (i) un polinucleótido que codifica una segunda proteína cuya interacción con dicha primera proteína en presencia de un compuesto de ensayo se mide, (ii) un polinucleótido que codifica una proteasa o una porción de una proteasa que es específica para el lugar de ruptura, y opcionalmente contiene los medios para mantener cada uno de (a) y (b) separados el uno del otro. El kit puede incluir instrucciones para uso.

La primera proteína puede ser una proteína unida a membrana, tal como un receptor transmembrana. Un tipo particular de receptor de transmembrana es un GPCR. Un tipo particular de proteína de transmembrana es una GPCR. Receptores de transmembrana ejemplificantes incluyen ADRB2, AVPR2, HTR1A, CHRM2, CCR5, DRD2, OPRK, o ADRA1A. La proteasa, porción de una proteasa o polipéptido con actividad de proteasa puede ser la proteasa A de inclusión nuclear del virus etch del tabaco. La proteína que activa dicho reportero puede ser cualquiera, por ejemplo, proteasa, que actúe en una molécula detectable que activa de reportero sensible a la activación por ruptura. El reportero puede ser cualquier molécula que de una señal detectable con el producto de ruptura. La segunda proteína puede ser una proteína de inhibición, tal como una arrestina. El kit puede además comprender una porción separada de una molécula aislada de ácido nucleico que codifica un gen activador del reportero. El activador del reportero puede, por ejemplo, ser una β galactosidasa o una luciferasa. La secuencia del nucleótido que codifica dicha primera proteína puede modificarse para aumentar la interacción con la segunda proteína, tal como reemplazando todo o parte de la secuencia de nucleótido de la región del extremo C de dicha primera proteína con una secuencia de nucleótido que codifica una secuencia de aminoácido que tiene mayor afinidad para la segunda proteína que la secuencia original. La secuencia de nucleótido de dicha región extremo C puede ser reemplazada por una secuencia de nucleótido que codifica la región extremo C de, por ejemplo, AVPR2, AGTRLI, F2RL1, CXCR2/IL-8B, y CCR4.

Se contempla que cualquier método o composición descrito aquí puede implementarse en relación a cualquier otro método o composición descritos aquí. El uso de la palabra "un" o "una" cuando se usa junto con el término "que comprenden" en las reivindicaciones y/o la solicitud puede significar "uno", pero es también consistente con el significado de "uno o más", "al menos uno", y "uno o más de uno". Cuando se escriben componentes correspondientes con fraseología ligeramente diferente, estos pueden no significar una diferencia de varias

realizaciones, pero tomados en conjunto, la fraseología variada describe los elementos correspondientes de forma amplia.

Estas, y otras realizaciones de la invención se apreciarán y entenderán mejor cuando se consideren junto con la descripción siguiente y los dibujos que acompañan. Debería entenderse, sin embargo, que la descripción siguiente, mientras que indica varias realizaciones de la invención y numerosos detalles específicos de la misma, se presenta como ilustración y no como limitación. Muchas sustituciones, modificaciones, adiciones y/o cambios de orden pueden hacerse dentro del alcance de la invención sin abandonar el espíritu de la misma, y la invención incluye todas de dichas sustituciones, modificaciones, adiciones y/o cambios de orden.

Descripción breve de las figuras

Los dibujos adjuntos forman parte de la presente solicitud y se incluyen para demostrar además ciertos aspectos de la presente invención. La invención puede entenderse mejor en referencia a uno o más de estos dibujos en combinación con la descripción detallada de realizaciones específicas aquí presentadas.

La figura 1 muestra un esquema de una realización de la solicitud en donde un modulador **4** se une a una proteína **1** asociada a una proteasa causando que la proteína interactúe con una segunda proteína **2** asociada con un modulador de reportero **3** tal como una proteína moduladora inactiva permutada. El modulador **4** representa un compuesto que modula la interacción proteína-proteína. En este ejemplo, por ejemplo, Ar o arrestina **2**, se fusiona a una proteína **3** inactiva que modula o activa el reportero permutado. Una proteasa **7** se asocia con una proteína **1**. Se muestra un lugar de ruptura **8** entre los dos segmentos de la proteína **3** moduladora del reportero. Cuando ocurre la ruptura de la proteasa después de la interacción con el modulador **4**, unido a la proteína **1**, por ejemplo, un 7TMR, se reconstituye la actividad de la proteína que activa el reportero, originando por último una señal detectable, representada por la bombilla **6**.

La figura 2 es una representación en diagrama de un ensayo de interacción proteína-proteína de la presente invención. Una proteína **21** unida a la membrana con una proteasa intracelular **22** unida interacciona con un modulador **4**. Una proteína asociada de reportero inactivada **23** lleva un reportero inactivo **3** o activador de reportero **3**. Con la interacción, la proteasa **22** asociada con la proteína **21** rompe el lugar de ruptura de la proteína **23** que activa el reportero permutado permitiendo de esta forma la nueva disposición **5** de las porciones de la proteína **3** que activa el reportero cuando el modulador **4** se relaciona con la proteína **21**. El activador de reportero por lo tanto realiza la reconstitución del reportero o del activador de reportero **3** para producir o activar un reporte.

La figura 3 muestra un esquema de una realización donde dos proteínas de transmembrana interactúan. Una molécula **4** causa (modula) una interacción entre las dos proteínas de membrana, o sea, al menos una proteína receptora. En esta figura, una proteasa **22**, por ejemplo, (TEV (7 en la figura 1), está unida a una proteína **1** y se la acerca a una proteína **3** de fusión que activa de reportero permutado unida a una segunda proteína de membrana **33**. La proteólisis en un sitio de ruptura **8** posibilitada por la proximidad de las proteínas **1**, **33** produce la activación **5** de la proteína **3** que activa el reportero.

La figura 3 puede leerse también como que muestra una aplicación esquemática de la tecnología para la identificación de moléculas que modulan la formación de receptores homodímeros o heterodímeros. Las proteínas **1** y **33** en este diagrama son proteínas unidas a la membrana. Las proteínas **1** y **33** se han fabricado para incluir cada una o un proteasa **22** o un reportero **3** activado por la proteasa **22**. Una molécula **4** que modula la interacción se une, por ejemplo, a la proteína **1** y/o **33**. Cuando **1** y **33** interactúan, la proteasa **22** actúa en el activador de reportero **3** efectuando de esta forma un cambio en la señal. La heterodimerización puede expandirse para incluir la homodimerización tradicional. Por ejemplo, **1** y **33** pueden ser dos copias del mismo receptor, pero difieren en la asociación con la proteasa o reportero. Como se ha mencionado en otra parte, los términos reportero y activador de reportero pueden a menudo usarse de la misma manera para describir realizaciones diferentes de la invención.

La figura 4 muestra un ejemplo que envuelve la interacción proteína-proteína de proteínas intracelulares. La proteína **41** es, por ejemplo, un receptor hormonal nuclear, fusionado a un activador **22**, por ejemplo, TEV. Una molécula **43** que activa el reportero permutado está localizada en el núcleo celular **40**. Puede localizarse el reportero en el núcleo usando un polipéptido básico que funciona como una secuencia de péptido de localización nuclear. Cuando se une a un ligando, por ejemplo, una hormona (no mostrado), la fusión NHR **41** se traslada al núcleo donde interacciona con el sistema reportero.

La figura 5 muestra que la actividad de luciferasa regenerada de las proteínas de fusión de luciferasa permutadas por la proteasa TEV en las células puede ser controlada modificando el lugar de ruptura de la proteasa. La relación señal-a-línea de base es por lo tanto controlable. Se presentan dos construcciones, ADRB2 es el receptor adrenérgico β_2 , Luc 234-550 y 2-233 son los dos fragmentos luciferasa unidos por X, el lugar de ruptura de TEV con un aminoácido de extremo C variable. X puede ser serina, S, arginina, R, o valina, V, por ejemplo. Se observó la actividad de luciferasa reconstruida a partir de una proteína de fusión de luciferasa permutada en células de mamíferos cuando ambas construcciones estaban presentes en una célula. La susceptibilidad a la escisión por TEV puede depender de los residuos específicos del lugar de ruptura. RLU aquí y en toda la solicitud indica luminiscencia o unidades (de luz) relativas. Np no se usó ningún ligando en el experimento.

5 La figura 6 muestra la actividad de la luciferasa inducida por el agonista en un ensayo basado en células de luciferasa GPCR permutada usando el receptor ADRB2 unido a una luciferasa permutada con lugares de ruptura de la proteasa TEV diferentes, R en la posición X del lugar de ruptura de TEV (gráfico de la izquierda) y V en la posición X (gráfico de la derecha). La proteasa de TEV estaba fusionada a arrestina. El eje de las x de cada gráfico muestra un valor de cero (sin agonista) y de agonista 10µM.

10 La figura 7 muestra una curva dependiente de la dosis de la actividad de la luciferasa en un ensayo basado en células de luciferasa GPCR permutada en sistemas transfectados cotransitoriamente y parcialmente transitoriamente. En el gráfico de la izquierda, la valina en el lugar de ruptura de la proteasa de la construcción se usó en células CHO. Tanto la construcción de ADRB2-luc como la de Arr-TEV fueron cotransfectadas de forma transitoria. En el gráfico de la derecha, las células se transfectaron de forma estable con la construcción de luciferasa que contenía a R fusionado con ADRB2 que fueron después transfectadas de forma transitoria con la construcción Arr-TEV.

15 La figura 8 muestra un ensayo de luciferasa permutada GPCR alternativo. Las construcciones de expresión llevaban ADRB2 unido al activador del reportero y arrestina 2 unida a la proteasa. Las construcciones fueron transfectadas de forma transitoria en células HEK 293. La cinética de la reacción se presenta en el gráfico con una reacción de incubación de una hora (▲) y de cinco horas (■).

20 La figura 9 describe la generación de una línea celular HEK que expresa de forma estable una construcción de arrestina/enzima permutado que lleva V en el lado X que fue transfectada de forma transitoria con el receptor ADRB2-TEV (gráfico de la izquierda) y una línea celular CHO que expresa de forma estable Arr-luc234S233 y transfectada de forma pasajera con la construcción del receptor TEV.

La figura 10 muestra una evaluación de un ensayo Per-Luc de las respuestas para un agonista (isoproterenol) (■), agonista parcial (▲), antagonista más isoproterenol (▼), antagonista (◆) y receptor endógeno no específico (⊗) en células HEK que expresan de forma estable una construcción de arrestina/enzima permutada y que están transfectadas de forma pasajera con ADRB2-TEV. (●)

25 La figura 11 muestra una evaluación de un ensayo GPCR Per-Luc con agonista agonista inverso de V2 (receptor 2 de vasopresina). Células HEK transfectadas de forma estable con una construcción arrestina/luciferasa permutada fueron transfectadas de forma transitoria con una construcción V2-TEV e inducidas con el agonista, 8AVP, arginina vasopresina (gráfico de la izquierda). Cuando se probaron esas células con un agonista inverso, se observó una dependencia de la dosis, y que la señal era mediada por arrestina más que por una proteína G (gráfica de la derecha).

30 La figura 12 muestra varios ensayos basados en β arrestina para ADRB2. En el gráfico de la derecha, se transfectaron de forma transitoria células DiscoverX HEK con ADRB2 según las instrucciones del fabricante y se probaron con un antagonista (propranolol) (■), agonista isoproterenol (▲) y una combinación de los mismos (●) a la izquierda y a la derecha con un agonista (■), un agonista inverso (▲), derecha) y una combinación de los mismos (●). El ensayo mostrado a la derecha se comparó con el ensayo presente en cuanto a la respuesta a un antagonista, el agonista isoproterenol y una combinación de los mismos (gráfico de la izquierda). El ensayo presente de la izquierda proporcionó mayor discriminación y actividad específica mayor.

La figura 13 muestra un ensayo basado en β arrestina para V2. En el gráfico, un agonista inverso de V2 (SR121463) indujo una señal dependiente de la arrestina, independiente de la proteína G.

40 La figura 14 describe construcciones de expresión que contienen una superposición de copias esencialmente de longitud total, pero no completas de luciferasa unida como se ha descrito aquí para producir una luciferasa permutada. CMV es un promotor del citomegalovirus. Luc2-456 y Luc234-550 son los fragmentos de luciferasa esencialmente de longitud total. En este ejemplo, GS es una unión de péptido compuesto de glicina y serina. El lugar de ruptura de TEV tiene una valina en el extremo C.

45 La figura 15 muestra un ejemplo de un ensayo para monitorizar interacciones proteína-proteína intracelulares. La rapamicina es un fármaco inmunosupresor que se une simultáneamente a la proteína que se une a rapamicina (FKBP12, o FKBP) el dominio de unión FKBP-rapamicina (FRB) de la quinasa diana de rapamicina (mTOR) en los mamíferos. mTor es una proteína quinasa serina/treonina murina que comprende un dominio de unión a rapamicina 151 que es una diana de rapamicina en los mamíferos **154**. FKBP **152** es la proteína de unión 12 kDa FK506, que tiene un lugar de unión de rapamicina. La proteasa TEV está fusionada con el dominio de unión a rapamicina de mTOR, FRB **151**. La proteína que activa el reportero permutado está fusionada con FKBP **152**, el dominio de unión de rapamicina de FKBP12. La rapamicina **154** reacciona con, media la unión con y pone en proximidad a FRB **151** y FKBP **152** produciendo la activación del reportero permutado.

55 La figura 16 muestra una configuración de ensayo donde las proteínas A **21** y B **23** son dos receptores unidos a la membrana que se dimerizan (de izquierda a derecha) espontáneamente o se disocian (de derecha a izquierda) cuando se unen con el ligando. El ensayo puede monitorizar la interacción espontánea de los dos receptores o inducir su interacción, donde cualquiera o ambos receptores se unen a un ligando, que puede ser igual o diferente.

Alternativamente, las proteínas A **21** y B **23** pueden dimerizarse espontáneamente o sin tener que unirse a un ligando o modulador (esto no se muestra). En esta realización, la proteasa y las porciones del activador del reportero permutado de las proteínas de fusión se expresan en la superficie de la célula o el exterior del empaquetamiento artificial o unidad. El ensayo puede también configurarse para monitorizar la fractura de los receptores que interactúan, sea espontáneamente o mediada por una o más moléculas, como se evidencia por un deterioro, disminución o pérdida de señal.

La figura 17 muestra un ensayo celular donde las proteínas A **171** y B **172** residen en o sobre células separadas, que pueden unirse, estar contiguas, interactuar y así sucesivamente. De nuevo, tanto A **171** como B **172** pueden llevar la proteasa **177** o la proteína que activa de la señal permutada **173**. El ensayo puede detectar la interacción espontánea de los dos receptores marcados en las dos células o inducir la interacción cuando cualquiera o ambos de los receptores se unen a un ligando, que puede ser igual o diferente, como evidencia de una interacción célula-célula o proximidad. En esta realización, la proteasa **177** y las porciones del activador del reportero permutado **173** de las proteínas de fusión se expresan en la superficie de la célula o el exterior del empaquetamiento artificial. El reportero permutado activado **175** se origina de que las proteínas A **171** y B **173** se asocian la una con la otra. Alternativamente, la fusión del receptor y la fusión intracelular de las proteínas de interés puede estar presente en una célula, y el evento inductor, el ligando y así sucesivamente que se está monitorizando se expresa en una segunda célula o es la segunda célula. El ensayo puede también configurarse para monitorizar la fractura de los receptores y las células que interactúan, sea espontáneamente o mediada por una o más moléculas, como se evidencia por un deterioro, disminución o pérdida de señal cuando se separan las células.

Descripción detallada de varias realizaciones ilustrativas

El ensayo de la presente invención detecta interacciones proteína-proteína sin requerir conocimiento anterior de los compuestos que modulan la interacción o de los caminos celulares iniciados por la interacción. El ensayo puede detectar interacciones de las proteínas de la membrana, o sea, formación de homodímeros o heterodímeros. El ensayo puede detectar interacciones de una proteína de membrana con una proteína citoplásmica. El ensayo puede detectar interacciones de dos proteínas citoplásmicas. El ensayo puede detectar la translocación de una proteína al espacio intracelular o a un organelo dentro de la célula. El ensayo puede detectar la interacción de dos células o empaquetamientos o unidades. Cualquiera de las dos proteínas A o B puede unirse a un ligando, cofactor u otro compuesto, molécula o sustancia, que puede o no puede ser esencial o indispensable en la interacción proteína-proteína.

El término, "secuencia", tiene varios usos en la ingeniería genética, técnicas de ácido nucleico y proteínas, como es sabido por la persona con conocimientos de la técnica, y puede tener distintos significados en el contexto de una frase, párrafo, concepto, idea, pasaje y así sucesivamente. Por ejemplo, una secuencia puede representar el listado particular de restos de aminoácidos de un polipéptido (estructura primaria) o bases de nucleótido de un polinucleótido. En otro contexto, una secuencia puede referirse a la molécula compuesta en un sentido genérico, tal como una secuencia e polipéptido que se refiere a la molécula entera sin que se requiera conocimiento de la estructura primaria de los aminoácidos. Una secuencia de un gen puede ser sinónima con un gen y referirse al polinucleótido per se o en total. Las secuencias pueden referirse a polipéptidos individuales o polinucleótidos, o porciones de los mismos. En consecuencia, cuando se usa la frase, "las secuencias están unidas de forma operativa", esa frase significa que genes individuales, dominios o unidades de transcripción pueden estar ligadas o unidas de una forma funcional para permitir la expresión del (los) gen(es) individuales, dominio(s), unidad(es) de transcripción y así sucesivamente que se originan del ligamiento o unión. Las secuencias pueden ser también porciones de un gen o proteína particular expresados, tal como el (los) dominio(s) de una proteína que tiene una pluralidad de porciones funcionales o dominios. Como se conoce en la técnica, los polinucleótidos de interés pueden ser o ADN o ARN, o mezclas de los mismos, y los métodos para fabricar y usar los mismos en la práctica de la invención presente son conocidos en la técnica.

Por ejemplo, la figura 4 muestra un ensayo de actividad modulada de un receptor hormonal nuclear. El transporte del receptor hormonal nuclear al núcleo causa o instiga una señal por la nueva disposición de una proteína que activa el reportero y, opcionalmente, una molécula que es detectable y puede así servir como reportero, tal como, cambios en la fluorescencia o presencia en respuesta a la actividad de una proteína que activa, por ejemplo, la luciferasa. La señal que se obtiene puede ser cualquier cambio detectable, por ejemplo, un cambio en intensidad o un cambio en los parámetros de excitación/emisión. La quimioluminiscencia es otra señal de reportero corriente. La persona con conocimientos de la técnica apreciará que tanto una proteasa o un reportero permutado puede ser fabricado para tener un polipéptido nuclear u otro polipéptido diana. Dicho polipéptido diana puede comprender aminoácidos básicos. La señal sería modulada con la interacción de ambos en la región diana.

En cuanto a los GPCRs, el ensayo actual es específico, sensible, y no requiere información preliminar en cuanto a la proteína G particular para el acoplamiento. El ensayo no está influenciado por GPCRs endógenos y puede aplicarse para identificar moléculas, incluyendo agonistas, antagonistas y agonistas inversos (para algunos receptores). El ensayo de la presente invención es una mejora del ensayo de Lee et al., evitando la necesidad de amplificar la transcripción. La presente invención proporciona una lectura más inmediata y directa.

La presente invención proporciona un sistema de ensayo más sencillo y robusto que el de Lee et al., en parte porque el presente sistema no requiere translocación de un reactivo al núcleo y después transcripción para amplificar la señal. La lectura puede por lo tanto estar próxima al evento de modulación del receptor. La presente invención no requiere un núcleo como lo hace el ensayo de Lee et al. De hecho, una aplicación de la presente invención es detectar proteínas secretadas. Tanto el receptor como la proteasa en el citoplasma pueden activar (o inactivar) la señal de una proteína socia secretada. Otra realización es el uso en células enucleadas o en células artificiales, empaquetamientos o unidades.

La presente invención es especialmente útil para identificar moléculas que modulan cualquier interacción proteína-proteína. El ensayo DiscoverX™, un ensayo que usa β arrestina, requiere que los dos componentes de proteína que interactúan permanezcan juntos durante todo el rato para la generación de la señal. La mayor parte de los ensayos GPCR anteriores están basados en la señalización de la proteína G, tal como los FLIPR y cAMP. Cualquier molécula que afecta las concentraciones de Ca^{++} o cAMP es propensa a generar señales positivas falsas. Por otro lado, el ensayo presente es rápido, robusto y barato, mientras que es independiente de la asociación del componente enzimático o de la señalización de la proteína G, lo que puede impactar la sensibilidad y la especificidad.

La presente invención proporciona una forma de ensayar o cribar cualquier interacción proteína-proteína fusionando la proteína A (o proteína B) con una proteína que activa el reportero (una proteína moduladora de un reportero / molécula o proteína que activa el reportero son aquí equivalentes). Un ejemplo de tal es una enzima permutada que contiene un lugar de ruptura proteolítico. La proteína B está fusionada con una proteasa. La interacción de la proteína A y la proteína B puede ser constitutiva o inducida por una tercera molécula. La persona con conocimientos de la técnica puede usar el ensayo de la presente invención para identificar moléculas que aumentan o perturban las interacciones proteína-proteína. Alternativamente, la proteína A puede ser fusionada con una proteasa y la proteína B con una proteína que activa el reportero.

Una proteína que activa el reportero de la invención es una que está latente y es activable con la interacción de la proteasa de la segunda proteína. Una aproximación de interés es producir una proteína que activa el reportero que es una molécula permutada construida para contener un lugar de ruptura de una proteasa. Con la ruptura, las porciones de la proteína que activa el reportero se pueden asociar, ensamblarse y así sucesivamente para producir un polipéptido o ensamblaje activo activador del reportero. Esa proteína que activa el reportero activa, por ejemplo, activa enzimáticamente, puede entonces actuar sobre un sustrato adecuado, por ejemplo, un reportero, para dar una señal detectable. Por lo tanto, por ejemplo, cuando la molécula permutada, inactiva es la luciferasa, cuando se rompe para formar una luciferasa biológicamente activa, esa luciferasa puede actuar sobre un sustrato adecuado, tal como una luciferina, para producir una señal detectable, en este caso la luminiscencia.

En otra realización, la proteína que activa el reportero es un reportero. Por lo tanto, eso puede verse como autoactivación por la proteína que activa el reportero con la ruptura. Un ejemplo sería una GFP, que cuando se rompe, se reordena y genera una señal detectable independiente de un sistema reportero, tal como un reactivo que proporciona una luciferina cuando el activador de reportero es una luciferasa.

Los genes activadores de reportero permutado pueden construirse tanto de forma activa como inactiva. Por ejemplo, al desarrollar esta tecnología, se construyó una fusión de luciferasa permutada inactiva a GPCR en la que se cambió el orden de la secuencia de aminoácidos de la luciferasa. El fragmento del extremo N original se movió al extremo C y el fragmento del extremo C original se movió al extremo N y se usó un lugar de reconocimiento de proteasa para fusionar los dos fragmentos cambiados de orden. La interacción de una proteína de fusión de luciferasa permutada inactiva a GPCR con una proteína de fusión de proteasa 2-TEV de β arrestina ocasiona la ruptura de la luciferasa permutada inactiva y genera una actividad de luciferasa reconstituida. Usando una estrategia alternativa, los inventores presentes construyeron una construcción de fusión de luciferasa permutada activa a GPCR en la que se introduce un lugar de reconocimiento de la proteasa en el orden original de la secuencia de luciferasa sin efectos significativos en la actividad de la luciferasa. La interacción de una proteína de fusión de luciferasa permutada activa a GPCR con una proteína de fusión de proteasa 2-TEV de β arrestina produce la ruptura de la luciferasa permutada activa y produce dos fragmentos de luciferasa inactivos lo que causa pérdida de actividad, y por lo tanto disminución o pérdida de la señal.

La proteína que activa el reportero puede seleccionarse de reporteros basados en proteínas permutadas tales como la Gaussia luciferasa; renilla luciferasa; β lactamasa; β galactosidasa; y proteínas fluorescentes tales como una de las proteínas verdes fluorescentes (GFP) o proteínas DsRed, etc., que contienen, por ejemplo, un lugar de ruptura proteolítica, tal como, un lugar de ruptura TEV. Aunque "enzima" se usa aquí como un término general, la proteína que activa el reportero no está per se limitada a "enzimas" sino a cualquier proteína que activa el reportero que pueda efectuar un cambio en la señal. Por ejemplo, el unir o secuestrar una proteína fluorescente puede ser un cambio de señal suficiente sin una reacción química que cambie la estructura molecular.

Como un aspecto de la presente invención, pueden construirse variantes de luciferasa permutada usando puntos de ruptura diferentes y con regiones de superposición diferentes para reducir o aumentar la actividad de la proteasa, actividad basal de la luciferasa o actividad de una luciferasa reconstituida por un biólogo molecular o químico de

proteínas con conocimientos de la técnica. Rachel B. Kapust, et al. *Biochemical & Biophysical Research Communications*, 294 (2002) 949-955.

5 Las proteasas son conocidas en la técnica y pueden seleccionarse de fuentes diferentes, por ejemplo, bacterias, levaduras, hongos, plantas, insectos, mamíferos etc. Los organismos requieren proteasas para procesar los péptidos y por lo tanto el mundo biológico presenta muchas proteasas diversas adecuadas para uso en la presente invención. La selección de lugares de ruptura apropiados para una enzima deseada puede encontrarse generalmente en la bibliografía o en catálogos de productos. Dichos lugares de ruptura de proteasas son oligopéptidos de longitud variada, tal como dos aminoácidos, tres aminoácidos, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o más aminoácidos, y así sucesivamente.

10 La proteína que activa el reportero permutado puede también ser reemplazada con lugares de ruptura de proteasa alternativos o unida a uno o más pre-pro-enzimas inactivas que pueden convertirse en enzimas activas después de la ruptura. Por ejemplo, los lugares de ruptura de pre-pro-enzimas pueden modificarse para ser sensibles a una enzima que reconoce una secuencia que es diferente del tipo silvestre. Alternativamente, el lugar de ruptura puede modificarse para un efecto particular deseado, tal como una mayor especificidad, mayor susceptibilidad a la escisión y así sucesivamente.

15 El ensayo puede también realizarse usando una enzima activa con un lugar de ruptura de proteasa que se convierte en una enzima inactiva después de la ruptura. Este aspecto proporciona algo de sencillez puesto que enzimas proteolíticos múltiples con especificidades diferentes pueden entonces actuar sobre la enzima activa como se desee con ninguna o solo mínima reingeniería.

20 Las células de los mamíferos, tales como HEK293, COS-7, NIH3T3, etc. así como las células de levadura pueden usarse para establecer el ensayo de proteína que activa de reportero permutado de la interacción proteína-proteína. Sistemas libres de células pueden también usarse. Dichos sistemas libres de células incluyen lisados, preparaciones de membrana, bases de virus, partículas tipo virus, liposomas, plaquetas, preparaciones de membrana, cocleatos, otras unidades o empaquetamientos artificiales basados en lípidos que simulan membranas biológicas para formar una estructura que puede rodear, unirse a, llevar, incluir y así sucesivamente a una entidad biológica, tal como una proteína de transmembrana. Pueden usarse organismos, tal como organismos transgénicos, en un ensayo de interés, o pueden contribuir células o reactivos que pueden usarse en un ensayo de interés.

25 El ensayo presente proporciona también un reportero detectable. Ese reportero es uno que es un sustrato para la proteína que activa el reportero de interés. Por lo tanto, en el caso de una luciferasa permutada, un reportero adecuado es una luciferina que cuando actúa sobre ella una luciferasa da una señal luminiscente detectable. El reportero puede ser intracelular para proporcionar un ensayo que evite la lisis celular. Por ejemplo, GFP fusionada al extremo carboxilo de la proteína que se une a la maltosa (MBP) no es fluorescente cuando la secuencia de la señal MBP está presente. Cuando se elimina el péptido de la señal MBP, se observa la fluorescencia. Feilmeier et al., *J Bacteriol* 182(14)4068--4076, 2000. Por lo tanto, puede introducirse un lugar de ruptura de proteasa más abajo del péptido de la señal MBP como se describió aquí para dar un ensayo que puede realizarse usando células vivas.

35 El ensayo puede aplicarse para monitorizar la ubicación subcelular y la translocación de un complejo de interacción proteínica usando luciferasa permutada o proteínas fluorescentes. La figura 4 muestra un esquema de dicha realización.

40 La presente invención se refiere a métodos para determinar si una sustancia de interés modula la interacción de i) una primera proteína, tal como una proteína unida a la membrana, por ejemplo, un receptor, tal como un receptor de transmembrana, con ii) una segunda proteína, tal como una molécula intracelular, otra proteína de transmembrana y así sucesivamente, por ejemplo, un miembro de la familia arrestina. Una metodología envuelve la transformación conjunta o transfección conjunta de una célula, que puede ser procarionota o eucariota, con dos construcciones. La primera construcción incluye, un primer ácido nucleico que codifica (a) la primera proteína, tal como un receptor de transmembrana, y (b) un lugar de ruptura de una proteasa, y (c) un segundo ácido nucleico que codifica una proteína que activa un reportero. La segunda construcción incluye, (a) un ácido nucleico que codifica una segunda proteína cuya interacción con la primera proteína se mide y/o determina, y (b) un ácido nucleico que codifica una proteasa, una porción de una proteasa o un polipéptido con actividad de proteasa que actúa en el lugar de ruptura de la primera construcción. En algunas realizaciones, una o más de estas construcciones pueden integrarse de forma estable en las células.

45 Aspectos de una realización de la invención se muestran, en forma pictórica, en la figura 1. En resumen, se obtiene una célula que expresa una primera proteína de interés. La proteína de interés puede incluir una porción proteolítica o la porción proteolítica puede asociarse con un complejo con la unión o liberación de un ligando unido. Se une una enzima inactiva a una porción de péptido que se asocia con la primera proteína de interés en respuesta a un cambio en la unión del ligando. La proximidad de la proteasa al enzima inactivo permite, en esta realización, la reconstitución de la actividad de la enzima, por ejemplo, una luciferasa. La actividad reconstituida afecta el reporte de la interacción proteína-proteína.

- 5 El ejemplo mostrado en la figura 1 presenta una proteína de transmembrana, un enzima de ruptura TEV, una luciferasa permutada y un sustrato para la luciferasa, por ejemplo, una luciferina. En este ejemplo la proteína "A" puede ser una arrestina. La primera proteína de interés puede ser un GPCR. Los extremos N y C de la luciferasa pueden ser reordenados y pueden unirse con un lugar de ruptura de la proteasa TEV para generar una luciferasa permutada, inactiva. La luciferasa permutada como se muestra se fusiona con β arrestina 2.
- 10 La proteína A puede estar condensada con una proteasa. La proteína B puede fusionarse con una proteína que activa el reportero permutado inactivo. Se inserta un lugar de ruptura y reconocimiento de proteasa (que es reconocido por una proteasa fusionada a la proteína A) en la proteína que activa el reportero permutado. La proteína A y la proteína B se ponen en proximidad, por ejemplo, con una tercera molécula que modula la interacción de la proteína A y la proteína B. La proteólisis de la proteína que activa el reportero permutado inactivo por la proteasa de fusión en la proximidad origina la fusión de dos fragmentos de la proteína que activa el reportero permutado para regenerar la actividad de la proteína que activa el reportero activo. La actividad de la proteína que activa el reportero puede estimarse con reactivos y aparatos apropiados usando un reportero adecuado, tal como, luciferina, usando reactivos y kits comercializados.
- 15 Un GPCR como la proteína A puede condensarse con una proteasa TEV. Alternativamente, ese GPCR puede fusionarse con una proteína que activa el reportero permutado.
- 20 En la figura 1, una molécula que se une a un GPCR causa interacción de la β arrestina con GPCR. La proteólisis del lugar de la escisión dentro de la luciferasa permutada mediante la unión de la proteasa TEV unida a, o en la proximidad de, la proteína A genera fragmentos de la proteína de luciferasa. Los fragmentos reconstituyen la luciferasa activa que se detecta o la presencia de la misma se infiere usando un reportero adecuado para la actividad de la luciferasa, tal como una luciferina en la célula o en un lisado.
- 25 El método puede producir señales específicas para las proteínas del receptor tales como GPCRs, que pueden actuar con una proteína G o una β arrestina.
- El método general como se muestra en la figura 1 es aplicable generalmente a GPCRs ya que la incorporación de beta arrestina en un fenómeno común. Sin embargo, cualquier par de moléculas que interactúan, se unen, asocian y así sucesivamente son sospechosos de interactuar, unirse, asociarse y así sucesivamente pueden usarse en la práctica de la presente invención.
- 30 Un método ejemplificado utiliza un camino de señalización de β arrestina y no requiere conocimiento previo del acoplamiento de la proteína G específica ya que el ensayo actual no es específico para el GPCR o para la proteína G que participa. De aquí, que este ensayo sea deseable para los GPCRs huérfanos en los que el camino de acoplamiento de la proteína G es desconocido. El método produce lecturas fisiológicamente relevantes e inmediatas sin amplificación de la transcripción como en el ensayo del documento de patente de los Estados Unidos No. 7,049,076 (Lee et al.).
- 35 Los materiales y métodos también permiten monitorizar los fenómenos independientes de la proteína G. En ese caso, puede marcarse una β arrestina con la proteína que activación el reportero permutado. Una molécula que se sospecha o conoce que interactúa con β arrestina puede marcarse con la proteasa adecuada, tal como un GPCR que demuestra la participación de β arrestina .
- 40 La presente invención tiene ventaja en comparación con los ensayos de complementado del fragmentos de enzimas (tal como el ensayo de β arrestina de DiscoverX PathHunter™) en el que los socios de la interacción tienen que permanecer comprometidos o juntos para asegurar el complementado del fragmento de la enzima. Por otra parte, en el presente ensayo, una vez que la proteólisis ocurre debido a la proximidad de los reactivos, el activador del reportero activo es generado, y los socios de la interacción de la proteína no se requiere que permanezcan asociados para obtener un ensayo informativo propiamente.
- 45 El ácido nucleico que codifica esta primera proteína de fusión y otros componentes de péptido pueden introducirse dentro de la célula hospedante. Tal ingeniería de la célula es bien conocida en la técnica. El ácido nucleico para los péptidos varios pueden estar organizados como una molécula única o pueden introducirse en serie o en paralelo. Algunas de las construcciones pueden ser integradas dentro de un cromosoma hospedante, por ejemplo, para obtener una transfección estable, los materiales de la práctica y los métodos conocidos en la técnica.
- 50 En un sistema alternativo, las dos proteínas de interés pueden interactuar en la ausencia de un ligando o un compuesto de prueba. El ligando o el compuesto de prueba puede causar que se disocian las dos proteínas, cambie la conformación, o de alguna forma se disminuya o inhiba su interacción. En tal caso, la concentración de enzima proteolítica funcionalmente activa libre de la célula disminuye en la presencia de un compuesto de prueba positivo, conduciendo a una disminución de la proteólisis, y una disminución medible en la actividad de la proteína que activa el reportero.
- 55 En una realización ejemplificante, una arrestina es la segunda proteína que se une al receptor de transmembrana en la presencia de un agonista; sin embargo, se debe de entender que ya que los receptores no son mas que un tipo de

proteína, el ensayo no es dependiente del uso de las moléculas del receptor, y el agonista que se une no es la única interacción capaz de estar envuelta. Cualquier proteína que interacciona con una segunda proteína será suficiente, aunque el interés está en proteínas de transmembrana debido a su papel para elicitar, reacciones en la célula órganos y tejidos en la exposición del receptor a un modulador que precipita el receptor unido a la célula a un estado activo. Además, la unión del agonista a un receptor no es el único tipo de unión que se puede ensayar. Los agonistas inversos también pueden probarse en el ensayo presente. Se puede determinar antagonistas, per se, y también determinar las fuerzas relativas de antagonistas diferentes y/o agonistas en concordancia con la invención.

Otros detalles de la invención, que incluye métodos específicos y tecnología para hacer y usar la materia sujeto del mismo, como se describen a continuación.

Como con el método descrito aquí, los productos que son aspectos de la invención pueden describirse sencillamente. Por ejemplo, en la "construcción de tres partes," por ejemplo, una construcción que tiene secuencias que codifican i) una proteína, ii) el lugar de ruptura, y iii) la proteína que activa el reportero. la proteína puede ser, por ejemplo, una proteína intracelular o una proteína unida a la membrana, tal como un receptor de transmembrana, por ejemplo, un miembro de la familia de GPCR El lugar de escisión puede ser cualquier sitio hidrolizable cuya hidrólisis puede ser llevada a cabo por la acción de una proteasa de una proteína socio de la interacción proteína-proteína. La escisión puede producir directamente el reporte o la escisión puede la reorganización de una proteína que activa el reportero para efectuar el reporte de otra molécula. La tercera parte puede ser en cambio una proteasa o polipéptido con actividad de proteasa.

Estas secuencias pueden modificarse de manera que el extremo C de las proteínas que codifican tenga interacciones mejores y mas fuertes con la segunda proteína. Las modificaciones pueden incluir, por ejemplo, reemplazar una secuencia de codificación del extremo C de la proteína, tal como un GPCR, con la región que codifica el extremo C para AVPR2, AGTRLI, F2PLI, CCR4, CXCR2/IL-8 y sucesivas. La secuencia de genes puede recodificarse para optimizar la translación de las proteínas de interés en una célula hospedante de interés.

La proteína que activa el reportero puede ser una proteína que actúa dentro del citoplasma o dentro de un organelo, tal como el núcleo, o puede ser una molécula que inicia una cascada de reacciones en movimiento, que origina una acción de alguna otra proteína. El conocedor de la técnica esta bien versado en tales cascadas puesto que son eventos celulares bien estudiados. Pueden incorporarse, las señales de translocación, tales como una secuencia de translocación nuclear en la enzima reportera. Las secuencias de localización son conocidas en la técnica.

Una segunda construcción, como se describió anteriormente, incluye una región que codifica una proteína que interacciona con la primera proteína, conduciendo a algún fenómeno medible. La proteína puede ser un activador, un competidor, un inhibidor, uno que proporciona una respuesta sinérgica y así sucesivamente, o, mas genéricamente, un "modulador" de la primera proteína. Los miembros de la familia de la arrestina están ejemplificados, especialmente cuando la primera proteína es un GPCR, pero pueden usarse otras secuencias codificadoras de proteínas, especialmente cuando la primera proteína no es un GPCR. La segunda parte de estas construcciones de dos partes codifica la proteasa, la porción de una proteasa o un polipéptido con actividad de proteasa, que actúa para romper la proteína que activa el reportero codificada por la primera construcción para producir la proteína que activa el reportero capaz de producir directa o indirectamente, una señal detectable.

Sin embargo, estas realizaciones ejemplifican tez no limitan la invención, como se describió en las realizaciones adicionales que siguen proporcionadas aquí, por ejemplo, la proteasa puede fusionarse con la proteína A o la proteína B como una elección designada.

Células hospedante

Como se usa aquí, el término "célula", "línea celular", y "cultivo celular" pueden usarse intercambiamente. Las células hospedantes pueden también referirse a una célula origen desde la que se podría obtener un lisado. Todos estos términos también incluyen su progenie, que es cualquiera y todas las generaciones subsiguientes. Se entiende que toda la progenie puede no ser idéntica debido a mutaciones deliberadas o inadvertidas, selección o diferenciación. Las células hospedantes pueden haber sido construidas para expresar un marcador cribable o seleccionable o un reportero que produce una señal cuando actúa sobre él la proteína que activa el reportero de la primera construcción que se rompe por la proteasa que es parte de una proteína de fusión de la segunda construcción. El marcador cribable o reportero cribable puede introducirse en la célula del hospedante o del sistema ensayado de cualquier forma.

Numerosas líneas celulares y cultivos están disponibles para usar como células hospedantes. Por ejemplo, muchas pueden obtenerse a través de American Type Culture Collection (ATCC), que es una organización que sirve como un archivo para cultivos vivientes y materiales genéticos. Un hospedante apropiado puede determinarse por alguien con conocimiento de la técnica basado en la estructura del vector y el resultado deseado. Un plásmido o cósmido, por ejemplo, puede ser introducido dentro de una célula hospedante procariota para replicación de muchos vectores. Los tipos de células disponibles para replicación del vector y/o expresión incluyen, pero no están limitados a, bacterias, tal como E. coli (por ejemplo, E. coli cepa RR1, E. coli LE392, E. coli B, E. coli X 1776 (ATCC No. 31537), E. coli W3110 (F⁻, lambda⁻, prototrófico., ATCC No. 273325), DH5α, JM109, y KC8), bacilos tales como Bacillus

subtilis; y otras enterobacteriáceas tal como Salmonella typhimurium, Serratia marcescens, varias especies de Pseudomonas, así como un número de hospedantes bacterianos comercialmente disponibles tales como SURE[®] Competent Cells y SOLOPACK[™] Gold Cells (STRATAGENE[®], La Jolla). En ciertas realizaciones, las células bacterianas tales como E. coli LE392 pueden usarse como células hospedantes para virus de fago.

5 Ejemplos de células hospedante eucariotas para replicación y/o expresión de un vector incluyen, pero no están limitados a, HeLa, NIH3T3, Jurkat, 293 (HEK), COS, CHO, Saos, y PC12. Otras células tales como células de levaduras o células de insecto, por ejemplo, células Sf9, son también adecuadas. Es a discreción del experto emplear la célula hospedante que él o ella deseen usar para el propósito deseado. Muchas células hospedantes de
10 varios tipos de células y organismos están disponibles y son bien conocidos para aquellos con conocimientos de la técnica.

Similarmente, un vector viral (incluyendo un fago) puede usarse en conjunción con una célula hospedante eucariota o procariota, particularmente una que sea permisiva para la replicación o expresión del vector. La célula hospedante no es necesariamente una línea celular inmortalizada. La célula hospedante puede ser del cultivo de una célula madre o un cultivo celular primario, tal como células madres hematopoiéticas, vasculares, epiteliales, de músculo liso, esplénica, célula T, célula B, monocito, etc. La célula hospedante puede ser transgénica, por ejemplo que comprende material genético de otro organismo. Las células imposibles de usar en el método de Lee et al. son
15 adecuadas para el ensayo de la presente invención debido a que la transcripción activa no se requiere. Por ejemplo, células sin núcleo, tal como las células rojas de la sangre o plaquetas, son posibles de usar en la presente invención.

20 En el contexto del ensayo presente, se quiere decir que la célula hospedante incluye empaquetamientos artificiales y unidades, tal como liposomas y partículas como virus, por ejemplo. Tales estructuras a menudo mimetizan o estimulan una célula o partes de la misma, que originan un encerramiento con un vaciamiento interno separado total o parcialmente del exterior por una película, membrana u otra estructura. Como se mencionó, tal empaquetamiento artificial y unidades incluyen liposomas, cocleatos, partículas tipo virus, virus y así sucesivamente.

25 Proteínas

La presente invención contempla el uso de cualquiera de dos proteínas para la que una interacción física es conocida o sospechada. En algunas realizaciones, las proteínas existirán o serán fabricadas para existir como proteínas de fusión, una primera proteína fusionada con un polipéptido que activa un reportero latente o inactivo, y la segunda proteína fusionada a una proteasa que reconoce un lugar de escisión en la primera proteína de fusión,
30 escisión que libera al polipéptido que activa el reporte o permite la actividad del mismo.

Con respecto a la primera proteína de interés, la primera proteína puede ser por ejemplo, una proteína unida a la membrana que ocurre naturalmente, o una que ha sido fabricada para llegar a ser proteína unida a la membrana. Por ejemplo, la primera proteína puede ser un receptor de transmembrana tal como un GPCR, o cualquier otro receptor de transmembrana de interés, que incluye, pero no está limitado a, receptores tirosina quinasas, receptor serina/treonina quinasas, receptores de citoquina, y otros semejantes. Además, como es bien conocido porciones de
35 las proteínas funcionarán de la misma manera que la proteína origen de la longitud total, tales partes activas de la proteína origen, tal como el dominio extracelular y el dominio de transmembrana, están comprendidos por la definición de proteína aquí.

Como será evidente para aquellos con conocimientos de la técnica, la presente invención puede usarse para ensayar la interacción con cualquier proteína, y no está limitada en su alcance a ensayar receptores unidos a membrana, tal como los GPCRs. Por ejemplo, la actividad de otras clases de receptores de transmembrana, que incluye pero no está limitado a: receptor tirosina quinasas (RTKs), tal como IGF1R, tal como el receptor factor de crecimiento epidérmico (EGFR), ErbB2/HER2/Neu o RTKs relacionados; el receptor serina/treonina quinasas, tal como el factor transformador de crecimiento β (TGF β), activina, o los receptores de proteína morfogénica del hueso (BMP); los receptores de citoquina, tal como los receptores para la familia del interferón de la interleuquina, eritropoyetina, G-CSF, GM-CSF o el factor de necrosis tumoral (TNF); los receptores de leptina, y otros receptores, que no son necesariamente normalmente unidos a membrana, tal como el receptor 1 de estrógeno (ESR1), y el receptor 2 de estrógeno (ESR2). En cada caso, el método puede implicar transfectar una célula con un receptor modificado polinucleótido que dirige la expresión de una proteína de fusión o quimérica que incluye el receptor de interés, un lugar de escisión de proteasa y un polipéptido que activa el reportero. que dirige la expresión de una proteína de fusión o quimérica que incluye el receptor de interés, un lugar de escisión de proteasa y un polipéptido que activa el reportero. La célula puede estar cotransfectada con un segundo polinucleótido, por ejemplo un vector que dirige la expresión de una proteína de fusión o quimérica que incluye una proteína de interacción fusionada a la proteasa que reconoce y rompe el lugar de escisión de la primera proteína. El primer y segundo polinucleótidos
40 pueden estar incluidos en una molécula única, evitando así la cotransfección. En el caso de RTKs, tal como el EGFR, esta proteína de interacción puede consistir en un SH2 (dominio 2 de homología de Src) que contiene polipéptido, tal como fosfolipasa C (PLC) o un dominio 2 de homología de Src que contiene la proteína 1 de transformación (SHC1). En el caso del receptor serina/treonina quinasas, tales como los receptores de TGF β , activina y BMP, este polipéptido de interacción puede ser una proteína Smad o una parte de la misma. En el caso de
45 los receptores de citoquina, tal como los receptores de interferón α , interferón β o interferón γ , esta proteína de
50
55
60

interacción puede ser un transductor de señal y activador de la proteína de transcripción (STAT) tal como, pero no limitado a, Stat1 o Stat2; o proteínas de quinasas de Janus (JAK) , Jak1, Jak2 o Tyk2; o porciones de las mismas, y así sucesivamente. La célula transfectada puede contener un reportero que sobre el que actúa una proteína que activa el reportero. entonces un ensayo en el que las células transfectadas se tratan con un compuesto de prueba por un periodo específico y la actividad del reportero se mide al final del periodo de ensayo . Si el compuesto de prueba activa el receptor de interés, las interacciones entre el receptor de interés y la proteína de interacción se estimulan, conduciendo a la escisión del lugar de la proteasa y a la activación de la proteína que activa el reportero, que a su vez , produce un cambio medible o un aumento en la actividad del reportero.

Otro posible par de proteínas incluyen anticuerpo-antígeno, enzima-sustrato, proteínas dimerizantes, componentes de las cascadas de la señal de transducción, componente(s) de una estructura de prensado, tal como un ribosoma o un virus, moléculas de interacción intercelular en células diferentes, tal como una célula que presenta un antígeno y una célula inmune para la respuesta, tal como una célula T, una célula B, una célula NK, una célula dendrítica, un monocito, un macrófago y así sucesivamente, y otros pares de proteínas conocidas en la técnica. La proteasa y la proteína que tienen un lugar de reconocimiento de proteasa son intercambiables con respecto a cualesquiera proteína, o sea A o B, a la cual cada una está unida o asociada.

Reporteros

Los reporteros pueden ser cualquier molécula que cambie apariencia o función en respuesta a la actividad de una molécula activa que activa el reportero y produce una señal detectable o puede fácilmente monitorizada para seguir esos cambios. Estos términos se entienden para ser aplicados con laxitud. La proteína que activa el reportero una vez activada (o en alguna realización posible, inactivada), causa un cambio detectable en el reportero. La detección de este cambio se usa para determinar si por ejemplo, un compuesto de prueba ha modulado una interacción proteína-proteína. Otras proteínas que activan reporteros no enzimáticas se pueden usar siempre que se produzca una señal detectable. Por tanto, las proteínas que activan el reportero pueden usarse, tal como galactosidasas, peroxididasas, luciferasas y así sucesivamente. Pueden usarse reporteros conocidos, tales como sustratos de galactosidasas, sustratos de peroxididasas, sustratos de luciferasas, GFP's y así sucesivamente.

Proteasas y lugares de escisión

Las proteasas son enzimas bien caracterizadas que rompen otras proteínas en un lugar particular. Una familia, la familia de proteasas Ser/tre, rompe en los residuos de serina y/o treonina. Otras proteasas incluyen cisteína o proteasas de tiol, proteasas aspárticas, metaloproteinasas, aminopeptidasas, di y tripeptidasas, carboxipeptidasas, y peptidilpeptidasas. La elección de estas se deja al conocedor de la técnica y no necesita estar limitada a las moléculas descritas aquí. Es bien conocido que las enzimas tienen dominios catalíticos y que estos dominios pueden usarse en lugar de las proteasas de longitud completa. Tales están comprendidas también por la invención. Una realización específica es la proteasa A de inclusión nuclear del virus etch del tabaco (TEV), o una porción activa de la misma. Otro lugar de escisión específico para proteasas puede también usarse, como se comprende por la persona con conocimientos de la técnica.

Modificación de proteínas

La proteína primera puede modificarse para aumentar su unión a la proteína de interacción en algunas realizaciones de este ensayo. Por ejemplo, se conoce que ciertos GPCRs unen arrestinas mas establemente o con mayor afinidad con la estimulación del ligando y esta interacción aumentada es mediada por dominios determinados por ejemplo, conjuntos de residuos de serina y treonina en el extremo C (Oakley, et al, J. Biol. Chem., 274:32248-32257, 1999 y Oakley, et al., J. Biol. Chem., 276:19452-19460, 2001). Usando esto como un ejemplo, está claro que la secuencia codificadora del receptor misma puede ser modificada, de manera que aumente la afinidad de la proteína ligada a la membrana, tal como el receptor, con la proteína a la que se une. Ejemplificaciones de tales cambios son las modificaciones de la región del extremo C de la proteína unida de membrana, por ejemplo, una 7TMR, que puede envolver remplazamiento de una parte de ella con una región correspondiente de otro receptor que tiene mayor afinidad por la proteína de unión, pero que no impacta la función de unión al receptor.

En adición o alternativamente, la segunda proteína puede modificarse para aumentar su interacción con la primera proteína. Por ejemplo, el ensayo puede incorporar mutaciones de punto, truncados u otras variantes de la segunda proteína, por ejemplo arrestinas, que se sabe ligan GPCRs ocupado del agonista mas establemente o en una manera independiente de la fosforilación (Kovoor, et al., J. Biol. Chem., 274:6831-6834, 1999). Tales cambios pueden hacerse practicando métodos conocidos en la técnica.

Formatos de los ensayos

La presente invención, en varias realizaciones, ofrece un camino directo para evaluar la interacción de dos proteínas cuando se expresan en la misma célula, unidad o mezcla de reacción. Una primera construcción puede comprender una secuencia que codifica un primer polipéptido concatenado aun polinucleótido que codifica un lugar de escisión para una proteasa, una porción de proteasa o un polipéptido con una actividad de proteasa, que es está el mismo concatenado a un polinucleótido que codifica una enzima reportera. "Concatenado" describe una situación donde las

secuencias descritas están fusionadas para producir un único, marco de lectura abierto intacto, que puede ser trasladado dentro de un polipéptido único que contiene todos los elementos. Estos pueden, pero no necesitan ser, separados por nucleótidos adicionales que pueden o no pueden codificar proteínas adicionales o péptidos. Una segunda construcción insertada dentro de las células recombinantes pueden contener ambos un polinucleótido que codifica una segunda proteína y la proteasa, la porción de proteasa o polipéptido que codifica la actividad de la proteasa. Juntos, estos elementos forman un formato de ensayo de base cuando combinados con un agente candidato cuyo efecto sobre la interacción de la proteína diana se busca.

Sin embargo, la invención puede también usarse para ensayar más de una proteína unida a la membrana, tal como un receptor, simultáneamente mediante el empleo de diferentes reporteros, cada uno de los cuales es estimulado por la activación de una proteína, tal como las clases de proteínas descritas aquí. Por ejemplo, esto puede conseguirse mezclando células transfectadas con diferentes construcciones del receptor y diferentes proteínas que activan el reportero, o por fusión de enzimas diferentes para cada receptor de ensayo, y midiendo la actividad de cada gen reportero por el tratamiento con los compuesto(s) de prueba. Por ejemplo, puede ser deseable determinar si una molécula de interés activa un primer receptor y también determinar si los efectos secundarios deberían esperarse como resultado de la interacción con un segundo receptor. En tal caso uno puede, por ejemplo, involucrar una primera línea celular que codifica un primer receptor y una primera proteína que activa el reportero, tal como lacZ, y una segunda línea celular que codifica un segundo proteína que activa el receptor y un segundo reportero, tal como GFP. En esa circunstancia, un GFP puede permutarse como practicado en la invención presente. Se mezclarían las dos líneas de células, añadiría el compuesto de interés, y buscaría un efecto positivo en la uno, con ningún efecto sobre la otro.

La invención en formatos alternativos se refieren tanto a los ensayos donde se examina un par único de proteínas de interacción, pero también a lo que será referido aquí como ensayos "multiplex". Tales ensayos pueden ser llevados a cabo en varias formas, pero en todos los casos, más de un par de proteínas se ensayan simultáneamente. Esto puede obtenerse, por ejemplo, proporcionando más de una muestra de células, cada una de las cuales ha sido transformada o transfectada, para probar cada par de interacción de proteínas. Las diferentes células transformadas pueden combinarse, y probarse simultáneamente, en un receptáculo, o cada diferente tipo de transformadas pueden colocarse en un pocillo diferente, y entonces probarse. Alternativamente, una célula puede manipularse para llevar primeras proteínas marcadas en forma plural, tal como proteínas basadas en la transmembrana, para determinar si un ligando o una molécula candidata activa más de un receptor.

Las células usadas para los ensayos multiplex descritos aquí, pueden ser, pero no necesitan ser, las mismas. Similarmente, el sistema reportero usado puede ser, pero no necesita ser, el mismo en cada muestra. Después de que la muestra o muestras se colocan en receptáculos, tal como pocillos de una micromatriz, uno o más compuestos pueden ser cribados frente posiblemente la pluralidad de pares de proteínas de interacción establecidas en los receptáculos.

La figura 10 es indicativa de los resultados usuales obtenidos usando el presente ensayo. A bajas o altas concentraciones (dependiendo de si la modulación es inhibitoria o que activadora) un compuesto de prueba puede no tener efecto. Según la concentración del compuesto de prueba disminuye o aumenta, el efecto modulador puede cambiar. Una curva de dosis respuesta como se muestra en la figura 10 puede usarse para evaluar la modulación. Un punto único puede también ser evaluado. Por ejemplo, el punto podría ser un valor predeterminado diferente del control o el ruido de fondo, a menudo determinado sobre una base estadística por datos acumulativos o llevando a cabo múltiples muestras de sujetos "normales" para obtener un valor de la media de la población de muestra con errores estándar y desviaciones. Una constante puede usarse como un valor diferente predeterminado. Generalmente se usa relaciones, por ejemplo, al menos 10% del control, pero más a menudo un múltiplo del control, por ejemplo, alrededor de 1,5, 2, 2,5, 3, 4, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500, 1000 o más (o recíprocos de los mismos) veces un valor de control que puede predeterminarse en otro ensayo realizado. El umbral predeterminado para modulación significativa es calculada rutinariamente por el conocedor de la técnica teniendo en cuenta balancear los errores de tipo 1 y tipo 2 como la situación sugiere o requiere.

Kits

Cualquiera de las composiciones descritas aquí y combinaciones de las mismas pueden ser proporcionadas en un kit. Los kits comprenderán así, en recipiente(s) apropiados uno o más de los componentes, por ejemplo los vectores o células de la presente invención, y cualquiera agentes adicionales que puedan usarse según la presente invención.

Los kits pueden comprender una o más composiciones alícuotas adecuadas de la presente invención. Los componentes de los kits pueden ser empaquetados o en un medio acuoso o en forma liofilizada o como un concentrado en un disolvente adecuado para el soluto. El recipiente(es) de los kits generalmente incluyen al menos un vial, tubo de ensayo, matraz, botella, jeringa u otro recipiente, dentro del cual un componente puede estar colocado o ha sido colocado, y preferiblemente, alícuotado adecuadamente. Cuando hay más de un componente en el kit, el kit también contendrá generalmente un segundo, tercero u otro recipiente adicional dentro del que los componentes adicionales pueden estar colocados separadamente. Sin embargo, varias combinaciones de componentes pueden estar comprendidos en un recipiente único, tal como un vial. También, se pueden proporcionar

diluyentes adecuados. Los kits de la presente invención también incluirán típicamente unos medios para contener los recipientes del reactivo en confinamiento cerrado para la venta comercial. Tales recipientes pueden incluir plástico de inyección o modelado por soplado o recipientes de espuma dentro de los cuales los viales deseados son retenidos , junto con instrucciones impresas.

- 5 Cuando los componentes de un kit se proporcionan en uno y/o más soluciones líquidas, la solución del líquido puede estar en solución acuosa, tal como una solución acuosa estéril que es particularmente útil. Sin embargo, los componentes del kit pueden proporcionarse como polvo(s) secos o en un soporte sólido. Cuando los reactivos y/o los componentes se proporcionan como polvo seco, el polvo puede ser reconstituido por la adición de un disolvente adecuado. Se visualiza que el disolvente, tal como agua estéril o una solución salina adecuada o tampón puede también proporcionarse en otro recipiente.

Ejemplos

Las realizaciones específicas que describen la invención serán vistas en los ejemplos a continuación , pero la invención no será estimada como limitada a esto.

Ejemplo 1

- 15 La figura 1 muestra una realización que incluye una luciferasa inactiva permutada cuya actividad se reconstituye por la acción de la proteasa TEV en un lugar de reconocimiento de la proteasa TEV contenida allí. La primera proteína, como se muestra, se fusiona con una proteasa. El ejemplo 1 se designó para usar la actividad de la proteasa TEV para reconstituir la actividad de la luciferasa permutada como una realización de la segunda proteína. La segunda proteína, como se muestra, se fusiona con una proteína que activa el reportero permutado inactiva, luciferasa. Se inserta un lugar de ruptura y reconocimiento de proteasa que es reconocido por una proteasa fusionada a la proteína de interés en la proteína que activa el reportero permutada. La primera proteína y la segunda proteína se traen a la proximidad por una tercera molécula que modula la interacción entre la primera proteína y la segunda proteína. La proteólisis de la proteína que activa el reportero inactiva permutada por la proteasa de fusión en la proximidad produce la ruptura formando los dos segmentos de la proteína que activa el reportero permutado para regenerar la proteína que activa el reportero activa. La actividad de la proteína de activación del reportero puede ser valorada con los reactivos y aparatos apropiados.

- La luciferasa permutada fue construida reorganizando los aminoácidos 2 a 233 del extremo N de la luciferasa de luciérnaga y los aminoácidos 234 a 550 del extremo C en orden invertido, interrumpido por el lugar de reconocimiento de la proteasa TEV, ENLYFQX (SEQ ID NO:3). La escisión de este sitio origina la actividad reconstituida de la luciferasa permutada. La posición X puede ser cualquier aminoácido que dicte la afinidad de reconocimiento y la eficiencia de la escisión de la proteasa TEV. La variación de X se ha mostrado que modula la cinética de la enzima de TEV. Similares sustituciones de aminoácidos en otros lugares de la secuencia de reconocimiento pueden también alterar las cinéticas. Es ventajoso optimizar las cinéticas de modulación , por ejemplo, los tiempos de incubación en el proceso de cribado y la actividad de fondo que afecta los parámetros de la señal/ruido. La luciferasa permutada (luc234X233, en donde X es el aminoácido particular en el extremo N del lugar de escisión del heptapéptido TEV, SEQ ID NO:3) fue después fusionada en el extremo C de un GPCR, ADRB2, para generar el plásmido de expresión de la luciferasa permutada del GPCR , ADRB2-luc234X233 .

Ejemplo 2

- El plásmido de fusión de TEV de la β arrestina 2 humana se construyó por fusión de la proteasa A del virus etch del tabaco en el extremo C de la β arrestina 2. Todos los fragmentos de ADN fueron generados por PCR usando las plantillas apropiadas. Los genes de fusión GPCR-luc234X233 fueron subclonados en pcDNA3.1(+) con un marcador de selección de neomicina (Invitrogen) y los genes de fusión Arr-TEV fueron subclonados en pcDNA3.1(+) con un marcador de selección de zeocin (Invitrogen Cat. #43--0018).

Ejemplo 3

- 45 Las células CHO-K1 fueron cotransfectadas con ADRB2-luc234R233 (Ejemplo 1) y los plásmidos Arr-TEV (Ejemplo 2) usando los kits de transfección comerciales apropiados. Cuarenta y ocho horas después de la transfección, las células fueron tratadas con o sin 10 μ M del agonista de ADRB2 , isoproterenol, durante 2 horas, Bright-GLO™ o Steady-GLO™ (Promega) fue añadido a las células , y la luminiscencia relativa de los lisados fue gravada por un lector de luminiscencia apropiado. Aumento de sobre tres veces en la actividad de la luminiscencia fue observada en la presencia del isoproterenol.

- La figura 5 muestra la expresión de la GPCR /luciferasa permutada con y sin Arr2-TEVp. En los datos representados en el gráfico, las construcciones fueron introducidas dentro de las células, pero las células transfectadas no fueron expuestas a ningún modulador. Así, los datos indican que cuando el lugar de escisión contiene serina, hay alguna actividad espontánea, pero esencialmente no hay ruido de fondo cuando X es R o V. Como se apreció en la figura 6, cuando las células que expresan el lugar de escisión de R o V se expusieron al agonista, se observó una respuesta.

La figura 7 muestra la respuesta dependiendo de la dosis de la actividad de la luciferasa en las células que expresan GPCR-luc234V233 y/o Arr-TEV transitoria o establemente.

Ejemplo 4

5 La figura 8 muestra que un periodo de incubación de 5 horas o 1 hora es suficiente para ensayar la interacción proteína-proteína. Una relación dosis respuesta se muestra claramente.

Un plásmido de expresión del gen de fusión ADRB2-TEV fue construido fusionando la proteasa A del virus etch del tabaco en el extremo C de ADRB2 e insertando el gen de fusión dentro de pcDNA3.1(+) con un marcador de selección de zeocin (Invitrogen Cat #43-0018). Todos los fragmentos de ADN fueron generados por PCR usando plantillas adecuadas como se conoce en la técnica.

10 El plásmido de expresión del gen de fusión (Arr-luc234X233) de la luciferasa permutada de la β arrestina 2 se construyó fusionando la luciferasa permutada luc234X233 al extremo C de la β arrestina 2. El lugar de escisión de la proteasa TEV es ENLYFQ/X, (Rachel B. Kapust, et al. Biochemical & Biophysical Research Communications, 294 (2002) 949-955) donde E y Q generalmente son invariables, y en los que X puede ser cualquier aminoácido, aunque G y S son aminoácidos comunes encontrados en ese lugar. La escisión ocurre entre los residuos Q y los residuos X. X puede determinar la eficiencia de la escisión. En algunas realizaciones, el lugar de escisión de la proteasa TEV se incluyó en la luciferasa permutada. El ruido de fondo y la relación señal/ruido puede mejorarse por experimentación de rutina simple. Por ejemplo, el uso de una valina en el lugar de la glicina en el lugar de la hidrólisis X para TEV se ha encontrado que baja el ruidos de fondo en algunas aplicaciones. El gen de fusión fusionado fue clonado en pcDNA3.1(+) con un marcador de selección de neomicina (Invitrogen).

20 Las células HEK293 fueron cotransfectadas con plásmidos ADRB2-TEV y Arr-luc234V233, donde la secuencia de reconocimiento de TEV es ENLYFQV (SEQ ID NO:12), usando kits de transfección comerciales apropiados. Cuarenta y ocho horas después de la transfección, las células fueron tratadas con diferentes concentraciones del agonista de ADRB2, isoproterenol, por 1 y 5 horas, Bright-GLO™ (Promega) fue añadido a las células, y las unidades de luminiscencia relativas fueron gravadas en EnVision II™. La actividad de luminiscencia dependiente de la dosis fue observada después de ambas incubaciones de 1 hora y 5 horas con isoproterenol.

Ejemplo 5

30 La figura 9, panel izquierdo muestra la actividad de la luciferasa inducida por el ligando en células HEK293 que establemente expresan las proteínas de fusión Arr-luc234V233 y transitoriamente expresan las proteínas de fusión ADRB2-TEV. El panel derecho muestra la expresión estable de la construcción de la proteína de activación del reportero de arrestina y la expresión transitoria de la fusión de la proteasa de 7TMR en células CHO.

Las líneas estables que expresan GPCR-luc234R233 o Arr-TEV se generaron en células HEK293 o CHO. Se usaron veinte ng/pocillo de cada ADN para la transfección en una placa de 12 pocillos con Lipofectamina (Invitrogen) para células HEK293 y células TranIT-CHO.

35 En el ensayo per-luc, un formato de placa de 384 pocillos se usó rutinariamente. Otros formatos de placa fueron formatos de placa aceptables. Las células de CHO que expresan establemente GPCR-luc234R233 o Arr-TEV se colocaron a razón de 10.000 células por pocillo en una placa de ensayo blanca de 384 pocillos de superficie tratada de cultivo tisular (Becton Dickinson). Al día siguiente, las células se trataron con el agonista, concentraciones desde 10 μ M a 0.7 pM (en diluciones seriadas 3:1 hechas en medio de células libre de suero). Se usó el sistema de ensayo de luciferasa Steady-Glo (Promega) para medir la actividad de luciferasa. Después de 2 horas de tratamiento del agonista, el medio fue aspirado y 25 μ l del reactivo del ensayo de luciferasa se añadió a cada pocillo. Las unidades de luminiscencia relativa (RLUs) se leyeron en EnVision, un lector multietiquetas de Perkin Elmer. Los datos se representaron y analizaron con el software PRISM.

45 Las células HEK293 que expresaban Arr-luc234V233 establemente se generaron por selección para la resistencia a neomicina. El gen de resistencia a neomicina está presente en el vector pc DNA3.1 del plásmido de expresión Arr-luc234V233.

Ejemplo 6

50 La figura 9, panel de la derecha muestra la dosis-respuesta para el isoproterenol en una línea de CHO. Las líneas celulares estables que expresan GPCR-luc234R233 o Arr-TEV se generaron en células CHO. Un μ g de cada ADN se usó en la transfección por pocillo en una placa de 12 pocillos con el kit de transfección TransfectIT-CHO (Mirus Bio, Madison, WI). Las colonias únicas fueron recogidas de los transfectados bajo selección con neomicina o zeomicina.

Las células que expresan establemente Arr-luc234V233 fueron transfectadas con el plásmido ADRB2-TEV usando los kits de transfección comerciales apropiados. Las células que transitoriamente expresan ADRB2-TEV y establemente expresan Arr-luc-234V233 se incubaron con isoproterenol durante dos horas, y el reactivo de

luciferasa Bright-GLO™ se añadió a las células. La actividad de luciferasa dependiente de la dosis fue gravada en EnVison II.

Ejemplo 7

5 La figura 10 muestra una evaluación del ensayo del GPCR Per-Luc para el agonista, agonista parcial, antagonista, y respuestas del receptor endógeno no específico.

10 Las células HEK293 establemente expresando Arr-luc234V233 fueron transfectadas con el plásmido de ADRB2-TEV usando el reactivo de transfección Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Cuarenta y ocho horas después de la transfección, las células se incubaron con diferentes concentraciones del agonista conocido, isoproterenol, el agonista parcial BRL37344 (Sigma-Aldrich); el antagonista ICI118551 (ICI); el antagonista ICI118551 con 200 nM de isoproterenol; y el agonista S1P (esfingosina--1-fosfato) para los receptores EDG endógenos de K293 durante dos horas, y el reactivo de luciferasa Bright-GLO™ se añadió a las células. La actividad de luciferasa dependiente de la dosis fue gravada en EnVison II, como se muestra en la figura 10.

15 Los valores de EC50 y IC50 del ensayo fueron similares a los valores obtenidos en los ensayos en FLIPR y cAMP. El receptor endógeno EDG en células HEK293 y su ligando S1P no afectó la actividad de la luciferasa, mientras que otros ensayos tales como FLIPR y cAMP produjeron señales positivas. El isoproterenol, un agonista, generó una respuesta. El agonista parcial, BRL37344 presentó una respuesta graduada. El antagonista, ICI118551, inhibió el isoproterenol, pero no tenía actividad solo. Por tanto, el ensayo presente es específico, y como se muestra en la figura 10 (tomado en conjunto con otros datos comparativos) produce menos y reducidas señales positivas falsas.

Ejemplo 8

20 La Figura 14 muestra un ejemplo en donde una luciferasa permutada fue construida por clonación de los aminoácidos 2 a 456 del extremo N de la luciferasa de luciérnaga detrás de los aminoácidos del extremo C 234 a 550 con un sitio de reconocimiento de una proteasa TEV, ENLYFQX, usando V por X. La luciferasa permutada (luc234V456) se fusionó al extremo C del GPCR, ADRB2, para generar la construcción de la luciferasa permutada de GPCR, plásmido de expresión de ADRB2-luc234V456.

25 Todos los fragmentos de ADN fueron generados por PCR usando las plantillas apropiadas. Los genes de fusión ADRB2-luc234V456 fueron clonados en pcDNA3.1(+) con un marcador de selección de neomicina (Invitrogen).

30 Las células CHO-K1 fueron cotransfectadas con los plásmidos ADRB2-luc234V456 y Arr-TEV usando kits de transfección adecuados. Cuarenta y ocho horas después de la transfección, las células fueron tratadas con o sin 10 µM del agonista ADRB2, isoproterenol, durante 2 horas, Bright-GLO™ o Steady-GLO™ (Promega) se añadió a las células, y la luminiscencia relativa se grabó con lectores de luminiscencia apropiados. La actividad de la luciferasa reconstituida se observó en respuesta a las diferentes dosis de isoproterenol.

Se seleccionaron células HEK293 que expresaban Arr-luc234V233 establemente en cuanto a la resistencia a neomicina. El gen resistente de la neomicina está presente en el vector pcDNA3 del plásmido de expresión Arr-luc234V233. La actividad de la luciferasa en respuesta al agonista fue observada.

35 Ejemplo 9

La figura 13 muestra la dependencia de la dosis con el agonista inverso V2.

40 Para este ejemplo, las células K293 que establemente expresan Arr-luc234V233 fueron transfectadas con el plásmido V2-TEV usando el reactivo de transfección Lipofectamina 2000 (Invitrogen). Cuarenta y ocho horas después de la transfección, las células se incubaron con diferentes concentraciones de un compuesto, SR121463 (Sanofi Recherche, Toulouse, FR), considerado un antagonista usando ensayos estándar, durante dos horas. El reactivo de luciferasa Bright-GLO™ fue añadido a las células. La actividad de luciferasa dependiente de la dosis fue gravada en EnVison II. Esto es se observaron concentraciones de luminiscencia que aumentan con cantidades que aumentan de SR121463, mas propiamente definido como agonista inverso.

45 En este ensayo, el agonista inverso se comportó como un agonista, como hacen otros agonistas inversos. Se conoce que un agonista inverso puede bloquear el camino de la señal de la proteína V2G, mientras que promueve la activación mediada de β arrestina de MAPK (Azzi et al., PNAS, 2003, 100:11406--11411). De modo que el ensayo de la presente invención puede indicar conformaciones activas distintas para los receptores acoplados a la proteína G.

50 Por el contrario, en los sistemas clásicos de ensayo, los agonistas inversos de GPCRs se comportan como antagonistas. Esto es porque los agonistas inversos probablemente se unen a y estabilizan la conformación inactiva de GPCR para la señalización de la proteína G. Sin embargo, algunos agonistas inversos estabilizan ambas la forma inactiva de GPCR para la señalización de la proteína G y también promueve la incorporación de la β arrestina al GPCR para activar el camino de señalización de una β arrestina.

Ejemplo 10

La figura 6 muestra la actividad de la luciferasa inducida por agonista.

En este ejemplo, la luciferasa permutada se construyó por medio de reorganizar los aminoácido 2 a 233 del extremo N de la luciferasa de la luciérnaga y los aminoácidos 234 a 550 del extremo C en orden reverso, interrumpido por un lugar de reconocimiento de la proteasa TEVI, ENLYFQX. La posición X puede ser cualquier aminoácido. Los aminoácidos en esta posición se sabe que dictan la afinidad del reconocimiento de la proteasa TEV y la eficiencia de la escisión. La luciferasa permutada (luc234X233) fue después fusionada al extremo C del GPCR, o sea, ADRB2, para generar una luciferasa permutada de GPCR, o sea, el plásmido de expresión ADRB2-luc234X233.

El plásmido de fusión de TEV de la β arrestina 2 humana se construyó por fusión de la proteasa A del virus etch del tabaco en el extremo C de la β arrestina 2. los fragmentos de ADN fueron generados por el PCR usando las plantillas adecuadas. Los genes de fusión GPCR-luc234X233 fueron subclonados en pcDNA3.1(+) con un marcador de selección de neomicina (Invitrogen) y el gen de fusión Arr-TEV fue subclonado en pcDNA3.1(+) con un marcador de selección de zeocina (Invitrogen Cat #43-0018).

Las células CHO-K1 fueron cotransfectadas con los plásmidos ADRB2-luc234R233 y Arr-TEV usando kits de transfección adecuados. Cuarenta y ocho horas después de la transfección, las células fueron tratadas con o sin 10 μ M del agonista ADRB2, isoproterenol, durante 2 horas, Bright-GLO™ o Steady-GLO™ (Promega) se añadió a las células, y la luminiscencia relativa se grabó con lectores de luminiscencia apropiados. Se observó sobre aumento de tres veces en la actividad de la luminiscencia en la presencia de isoproterenol.

Ejemplo 11

La figura 12 muestra los resultados de los agonistas, antagonistas y agonistas inversos usando la presente invención (panel izquierdo) y otro ensayo (panel derecho). Las dos gráficas muestran diferenciación y efectos contrarios del agonista, antagonista y agonista inverso. El ensayo presente proporciona buena actividad específica.

Ejemplo 12

La figura 7 muestra las células CHO con ambos la luciferasa permutada de ADRB2 y Arr-TEV. Los datos del panel izquierdo, ADRB2-luc234V233 se hicieron por contener el lugar de reconocimiento de TEV, ENLYFQV. Las células CHO-K1 fueron cotransfectadas con los plásmidos ADRB2-luc234V233 y Arr-TEV usando kits de transfección comerciales apropiados. Cuarenta y ocho horas después de la transfección, las células fueron tratadas con diferentes concentraciones del agonista de ADRB2 isoproterenol durante 2 horas, Bright-GLO™ o Steady-GLO™ (Promega) se añadieron a las células, y la luminiscencia relativa se grabó por lectores de luminiscencia apropiados.

Ejemplo 13

La figura 7, el panel derecho resume los datos utilizando las células transfectadas establemente con diferentes lugares de escisión. Los resultados son similares a los del panel izquierdo. Por tanto, dos construcciones de luciferasa de GPCR que tienen diferentes lugares de escisión respondieron al agonista.

Ejemplo 14

La figura 6 muestra la actividad de la señal inducida del agonista comparando X como R y X como V. Los resultados son similares mostrando que X puede ser variado rutinariamente.

En este ejemplo, la luciferasa permutada fue construida disponiendo los aminoácidos 2 a 233 del extremo N de la luciferasa de la luciérnaga y los aminoácidos 233 a550 del extremo C en orden reverso, interrumpido por un lugar de reconocimiento de la proteasa de TEV, ENLYFQ/X. La posición X puede ser cualquier aminoácido que dicte la afinidad de reconocimiento y la eficiencia de la escisión de la proteasa TEV. V y R se muestran. La luciferasa permutada (luc234X233) fue después fusionada al extremo C del GPCR, o sea, ADRB2, para generar la luciferasa permutada de GPCR, o sea el plásmido de expresión ADRB2-luc234X233.

En este ejemplo, el plásmido de fusión de 2-TV de β arrestina 2 humana fue construido por fusión de la proteasa A del virus etch del tabaco al extremo C de la β arrestina 2. Todos los fragmentos de ADN fueron generados por PCR usando las plantillas apropiadas. Los genes de fusión de GPCR-luc234X233 fueron subclonados en pcDNA3.1(+) con un marcador de selección de neomicina (de Invitrogen) y el gen de fusión de Arr-TEV fue subclonado en pcDNA3.1(+) con un marcador de selección de zeocina (Invitrogen Cat. #43-0018).

Las células CHO-K1 fueron cotransfectadas con los plásmidos ADRB2-luc234R233 y Arr-TEV usando kits de transfección comerciales apropiados. Después de 48 horas, las células fueron tratadas con o sin 10 μ M del agonista de ADRB2 durante 2 horas, Bright-GLO™ o Steady-GLO™ (Promega) se añadieron a las células, y las unidades de luminiscencia relativas fueron grabadas por lectores de luminiscencia apropiados. Niveles mayores de tres veces de actividad de luminiscencia fueron observados en la presencia de isoproterenol.

Ejemplo 15

La figura 11, el panel izquierdo muestra los resultados con el agonista 8-AVP en células que expresan transitoriamente V2-TEV.

- 5 En este ejemplo, las células K293 que establemente expresan Arr-luc234V233 fueron transfectadas con el plásmido V2-TEV usando el reactivo de transfección Lipofectamina 2000 (Invitrogen). Después de 48 horas, las células se incubaron con diferentes concentraciones del agonista 8-AVP (Arg⁸ vasopresina, un agonista conocido del receptor de vasopresina V2) durante dos horas, y el reactivo de luciferasa Bright-GLO™ se añadió a las células. La actividad de luciferasa dependiente de la dosis fue gravada en EnVison II.

Ejemplo 16

- 10 Las células HEK293 establemente expresando Arr-luc234V233 fueron transfectadas con el plásmido de V2-TEV usando el reactivo de transfección Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Después de 48 horas, las células se incubaron con diferentes concentraciones del agonista inverso durante dos horas, y el reactivo de luciferasa Bright-GLO™ se añadió a las células. La actividad de luciferasa dependiente de la dosis fue gravada en EnVison II.

- 15 En este ensayo, el agonista inverso se comporta como agonista. Se conoce que algunos agonistas inversos bloquean un camino de señalización de la proteína V2 G , pero promueve la activación de MARK mediada de β arrestina MAPK (Azzi et al., PNAS, 2003 100:11406-11411). Así el ensayo puede valorar conformaciones activas diferentes de receptores acoplados con proteína G.

Ejemplo 17

- 20 La figura 11, el panel derecho muestra la actividad de la luciferasa dependiente de la dosis producida del agonista inverso V2 mediante la promoción de la interacción de la β arrestina con un receptor V2 .

En este ejemplo, las células K293 que establemente expresan Arr-luc234V233 fueron transfectadas con el plásmido V2-TEV usando el reactivo de transfección Lipofectamina 2000 (Invitrogen). Después de 48 horas, las células fueron incubadas con diferentes concentraciones del agonista inverso durante dos horas, y el reactivo de luciferasa Bright-GLO™ se añadió a las células. La actividad de luciferasa dependiente de la dosis fue gravada en EnVison II.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Eishingdrelo, Haifeng
 Cai, Jidong
 Wright, Paul
 5 Weissensee, Paul
- <120> IDENTIFICACIÓN DE MOLÉCULAS QUE MODULAN LA INTERACCIÓN PROTEÍNA-PROTEÍNA
- <130> US2006/244
 10
- <140> PCTUS0874543
 <141> 28-08-2008
- <160> 15
 15
- <170 > Versión PatentIn 3.3
- <210> 1
 <211> 27
 20 <212> ADN
 <213> virus etch del tabaco
- <400> 1
 25 ggatccgcag agttgatcat catagtc 27
- <210> 2
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Virus etch del tabaco
 30
- <400> 2
 gggcccctat tgcgagtaca ccaattcatt c 31
- <210> 3
 35 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Virus etch del tabaco
- <220>
 40 <221> SITIO
 <222> (7).. (7)
 <223> Péptidos que alteran el reconocimiento de la proteasa TEV. X es S, R o V en la Figura 5.
- <400> 3
Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Xaa
1 5
- 45
- <210> 4
 <211> 1237
 <212> ADN
 50 <213> Adenovirus humano tipo 1
- <400> 4

ES 2 393 642 T3

gggcaacccg ggaacggcag cgccttcttg ctggcaccca atagaagcca tgcgccggac 60
cacgacgtca cgcagcaaag ggacgagggtg tgggtgggtgg gcatgggcat cgtcatgtct 120
ctcatcgtec tggccatcgt gtttggcaat gtgctgggtca tcacagccat tgccaagtcc 180
gagcgtctgc agacggtcac caactacttc atcacttcac tggcctgtgc tgatctggtc 240
atgggcctgg cagtgggtgcc ctttggggcc gcccatattc ttatgaaaat gtggactttt 300
ggcaacttct ggtgcgagtt ttggacttcc attgatgtgc tgtgcgtcac ggccagcatt 360
gagaccctgt gcgtgatcgc agtggatcgc tactttgcca ttacttcacc tttcaagtac 420
cagagcctgc tgaccaagaa taaggcccgg gtgatcattc tgatgggtg gattgtgtca 480
ggccttacct ccttcttgcc cattcagatg cactgggtacc gggccaccca ccaggaagcc 540
atcaactgct atgccaatga gacctgctgt gacttcttca cgaaccaagc ctatgccatt 600
gcctcttcca tcgtgtcctt ctacgttccc ctgggtgatca tggctctcgt ctactccagg 660
gtctttcagg aggccaaaag gcagctccag aagattgaca aatctgaggg ccgcttccat 720
gtccagaacc ttagccaggt ggagcaggat gggcggacgg ggcatggact ccgcagatct 780
tccaagttct gcttgaagga gcacaaagcc ctcaagacgt taggcatcat catgggcact 840
ttcaccctct gctggtgcc cttcttcacg gttaacattg tgcattgtat ccaggataac 900
ctcatccgta aggaagttaa catctccta aattggatag gctatgtcaa ttctggtttc 960
aatcccctta tctactgccg gagcccagat ttcaggattg ccttccagga gcttctgtgc 1020
ctgcgcaggt cttctttgaa ggcctatggg aatggctact ccagcaacgg caacacaggg 1080
gagcagagtg gatatcacgt ggaacaggag aaagaaaata aactgctgtg tgaagacctc 1140
ccaggcacgg aagactttgt gggccatcaa ggtactgtgc cttagcgataa cattgattca 1200
caagggagga attgtagtac aaatgactca ctgctgg 1237

<210> 5
<211> 1110
5 <212> ADN
<213> humano

<400> 5
ctcatggcgt ccaccacttc cgctgtgect gggcatccct ctctgcccag cctgcccagc 60
aacagcagcc aggagaggcc actggacacc cgggacccgc tgctagcccg ggccggagctg 120
gcgctgctct ccatagtctt tgtggctgtg gccctgagca atggcctggg gctggcggcc 180

ES 2 393 642 T3

ctagctcggc ggggcccggc gggccactgg gcacccatac acgtcttcat tggccacttg 240
 tgccctggccg acctggccgt ggctctgttc caagtgtgc cccagctggc ctggaaggcc 300
 accgaccgct tccgtgggcc agatgccctg tgctggggccg tgaagtatct gcagatggtg 360
 ggcatgtatg cctcctccta catgatcctg gccatgacgc tggaccgcca ccgtgccatc 420
 tgccgtccca tgctggcgta ccgccatgga agtggggctc actggaaccg gccggtgcta 480
 gtggcttggg ccttctcgct ccttctcage ctgccccagc tcttcatctt cgccccagcg 540
 aacgtggaag gtggcagcgg ggtcactgac tgctgggcct gctttgcgga gccctggggc 600
 cgtcgcacct atgtcacctg gattgccctg atggtgttcg tggcacctac cctgggtatc 660
 gccgcctgcc aggtgtcat cttccgggag attcatgcca gtctggtgcc agggccatca 720
 gagaggcctg gggggcgccg caggggacgc cggacaggca gccccggtga gggagccac 780
 gtgtcagcag ctgtggccaa gactgtgagg atgacgctag tgattgtggt cgtctatgtg 840
 ctgtgctggg cacccttctt cctggtgcag ctgtggggccg cgtgggaccc ggaggcacct 900
 ctggaagggg cgccctttgt gctactcatg ttgctggcca gcctcaacag ctgcaccaac 960
 ccctggatct atgcatctt cagcagcagc gtgtcctcag agctgogaag cttgctctgc 1020
 tgtgcccggg gacgcacccc acccagcctg ggtccccaag atgagtctctg caccaccgcc 1080
 agtcctccc tggccaagga cacttcatcg 1110

<210> 6
 <211> 951
 <212> ADN
 <213> Luciérnaga

5

<400> 6
 gatactgcga ttttaagtgt tgttccatc catcacggtt ttggaatggt tactacactc 60
 ggatatttga tatgtggatt tccagtcgtc ttaatgtata gatttgaaga agagctgttt 120
 ctgaggagcc ttcaggatta caagattcaa agtgcgctgc tggtgccaac cctattctcc 180
 ttcttcgcca aaagcactct gattgacaaa tacgatttat ctaatttaca cgaaattgct 240
 tctggtggcg ctccccctc taaggaagtc ggggaagcgg ttgccaagag gttccatctg 300
 ccaggatca ggcaaggata tgggctcact gagactacat cagctattct gattacacc 360
 gagggggatg ataaaccggg cgcggtcggg aaagtgttc catttttga agcgaagggt 420
 gtggatctgg ataccgggaa aacgctgggc gttaatcaaa gaggcgaact gtgtgtgaga 480
 ggtcctatga ttatgtccgg ttatgtaaac aatccggaag cgaccaacgc cttgattgac 540

ES 2 393 642 T3

aaggatggat ggctacattc tggagacata gcttactggg acgaagacga acacttcttc 600
 atcgttgacc gcctgaagtc tctgattaag tacaaaggct atcaggtggc tcccgtgaa 660
 ttggaatcca tcttgetcca acacccaac atcttcgacg caggtgtcgc aggtcttccc 720
 gacgatgacg ccggtgaact tcccgccgc gttgttgttt tggagcacgg aaagacgatg 780
 acggaaaaag agatcgtgga ttacgtgcc agtcaagtaa caaccgcgaa aaagttgcgc 840
 ggaggagttg tgtttgtgga cgaagtaccg aaaggtctta ccggaaaact cgacgcaaga 900
 aaaatcagag agatcctcat aaaggccaag aagggcggaa agatcgcctg g 951

<210> 7
 <211> 696
 <212> ADN
 <213> Luciérnaga

5

<400> 7
 gaagacgcca aaaacataaa gaaaggcccc gcgccattct atccgctgga agatggaacc 60
 gctggagagc aactgcataa ggctatgaag agatacgccc tggttcctgg aacaattgct 120
 tttacagatg cacatatcga ggtggacatc acttacgctg agtacttcga aatgtccggt 180
 cggttggcag aagctatgaa acgatatggg ctgaatacaa atcacagaat cgtcgatgc 240
 agtgaaaact ctctcaatt ctttatgccg gtgttgggcg cgttatttat cggagttgca 300
 gttgcgcccc cgaacgacat ttataatgaa cgtgaattgc tcaacagtat gggcatttcg 360
 cagcctaccg tgggttctgt ttccaaaaag gggttgcaaa aaattttgaa cgtgcaaaaa 420
 aagctcccaa tcatcaaaaa aattattatc atggattcta aaacggatta ccagggattt 480
 cagtcgatgt acacgttcgt cacatctcat ctacctccg gttttaatga atacgatttt 540
 gtgccagagt ccttcgatag ggacaagaca attgcaactga tcatgaaact ctctggatct 600
 actggtctgc ctaaagggtg cgctctgect catagaactg cctgcgtgag attctcgcct 660
 gccagagatc ctatTTTTGG caatcaaatc attccg 696

10

<210> 8
 <211> 1363
 <212> ADN
 <213> Luciérnaga

15

<400> 8
 gaagacgcca aaaacataaa gaaaggcccc gcgccattct atccgctgga agatggaacc 60
 gctggagagc aactgcataa ggctatgaag agatacgccc tggttcctgg aacaattgct 120

ES 2 393 642 T3

tttacagatg cacatatcga ggtggacatc acttacgctg agtacttcga aatgtccggt 180
 cggttggcag aagctatgaa acgatatggg ctgaatacaa atcacagaat cgtegtatgc 240
 agtgaaaact ctcttcaatt ctttatgccg gtgttgggcg cgttatttat cggagttgca 300
 gttgccccg cgaacgacat ttataatgaa cgtgaattgc tcaacagtat gggcatttcg 360
 cagcctaccg tgggtttcgt ttccaaaaag gggttgcaaa aaattttgaa cgtgcaaaaa 420
 aagctcccaa tcatccaaaa aattattatc atggattcta aaacggatta ccagggattt 480
 cagtcgatgt acacgttcgt cacatctcat ctacctccg gttttaatga atacgatttt 540
 gtgccagagt ccttcgatag ggacaagaca attgcactga tcatgaactc ctctggatct 600
 actggtctgc ctaaagggtg cgctctgect catagaactg cctgcgtgag attctcgcac 660
 gccagagatc ctatTTTTGG caatcaaadc attccggata ctgcgatttt aagtgttgtt 720
 ccattccatc acggttttgg aatgtttact aactcggat atttgatag tggatttcga 780
 gtcgtcttaa tgtatagatt tgaagaagag ctgtttctga ggagccttca ggattacaag 840
 attcaaagtg cgctgctggt gccaacctta ttctccttct tcgccaaaag cactctgatt 900
 gacaaatcag atttatctaa tttacacgaa attgcttctg gtggcgctcc cctctctaag 960
 gaagtcgggg aagcggttgc caagaggttc catctgccag gtatcaggca aggatatggg 1020
 ctactgaga ctacatcagc tattctgatt acaccgagg gggatgataa accgggcgcg 1080
 gtcggtaaag ttgtccatt tttgaagcg aaggttggg atctggatac cgggaaaacg 1140
 ctgggcgcta atcaaagagg cgaactgtgt gtgagaggtc ctatgattat gtccggttat 1200
 gtaaacaatc cggaaagcag caacgccttg attgacaagg atggatggct acattctgga 1260
 gacatagett actgggacga agacgaacac ttcttcatcg ttgaccgct gaagtctctg 1320
 attaagtaca aaggetatca ggtggctccc gctgaattgg aat 1363

<210> 9

<211> 726

5 <212> ADN

<213> Virus etch del tabaco

<400> 9

ggagaaagct tgtttaagg accacgtgat tacaaccgca tatcgagcac catttgcac 60

ttgacgaatg aatctgatgg gcacacaaca tcgttgtatg gtattggatt tggcccttc 120

atcattacaa acaagcactt gtttagaaga aataatggaa cactgttggc ccaatcacta 180

catggtgtat tcaaggtaa gaacaccag actttgcaac aacacctcat tgatgggagg 240

ES 2 393 642 T3

gacatgataa ttattcgcac gcctaaggat ttcccacccat ttctctcaaaa getgaaattt 300
 agagagccac aaaggaaga ggcgatatgt cttgtgacaa ccaacttcca aactaagagc 360
 atgtctagca tgggtgcaga cactagttgc acattccctt catctgatgg catattctgg 420
 aagcattgga ttcaaaccac ggatgggcag tgtggcagtc cattagtatc aactagagat 480
 gggttcattg ttggtataca ctcagcatcg aatttcacca acacaaacaa ttatttcaca 540
 agcgtgccga aaaacttcat ggaattgttg acaaatcagg aggcgcagca gtgggtagt 600
 ggttgccgat taaatgctga ctcagtattg tgggggggcc ataaagtttt catgagcaaa 660
 cctgaagagc ctttcagcc agttaaggaa ggcactcaac tcatgaatga attggtgtac 720
 tcgcaa 726

5 <210> 10
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> .sitio de reconocimiento TEV

<400> 10
 Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Ser
 1 5

15 <210> 11
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> sitio de reconocimiento para la proteasa TEV

<400> 11
 gagaacctgt actccagag c 21

25 <210> 12
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> sitio de reconocimiento para la proteasa TEV

<400> 12
 Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Val
 1 5

35 <210> 13
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial

40 <220>
 <223> AND para el sitio de escisión /V

45 <400> 13
 gagaacctgt actccaggt c 21

<210> 14

ES 2 393 642 T3

<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

5 <220>
<223> sitio de reconocimiento

<400> 14
Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Arg
1 5

10 <210> 15
<211> 21
<212> ADN
<213> Artificial

15 <220>
<223> sitio de reconocimiento

20 <400> 15
gagaacctgt acttcagcg c 21

REIVINDICACIONES

1. Un método para identificar un compuesto que modula una interacción proteína-proteína entre una primera proteína y una segunda proteína, que comprende:
- 5 i) proporcionar una primera proteína unida a una proteína que activa el reportero dividido o reordenado y una segunda proteína unida a una proteasa,
- en donde dicha proteína que activa el reportero es una luciferasa, una proteína fluorescente, una peroxidasa, β -galactosidasa o β -lactamasa,
- en donde dicha proteína que activa el reportero tiene un sitio de escisión para dicha proteasa que está interpuesto entre dos porciones de dicha proteína que activa el reportero, en las que las dos porciones están presentes en un orden reordenado,
- 10 en donde dicha proteasa es capaz de escindir dicho sitio de escisión en dicha proteína que activa el reportero dando como resultado el rearreglo de dichas dos porciones de dicha proteína que modula el reportero, activando de ese modo dicha proteína que activa el reportero, y
- en donde la asociación de dicha primera proteína con dicha segunda proteína da como resultado la escisión de dicha proteína que activa el reportero;
- 15 ii) proporcionar un reportero cuya señal detectable está alterada por la actividad de dicha proteína que activa el reportero;
- iii) proporcionar dicho compuesto;
- iv) permitir a dicha proteasa escindir dicho lugar de escisión; y
- 20 v) monitorizar la señal de reporte;
- en donde un cambio en la señal del reportero es indicativo de dicha interacción proteína-proteína.
2. El método de la reivindicación 1, en donde dicha proteína que activa el reportero es auto-activante.
3. El método de la reivindicación 1 ó 2, en donde la primera proteína forma una proteína de fusión con dicha proteína que activa el reportero.
- 25 4. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende además proporcionar una molécula conocida por modular la interacción proteína-proteína, en donde dicho compuesto modula la interacción de dicha molécula con dicha interacción proteína-proteína.
5. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la proteína fluorescente es el reportero.
6. Un sistema de ensayo que comprende:
- 30 i) una primera proteína que comprende una proteína que activa el reportero dividido y reordenado,
- en donde dicha proteína que activa el reportero es una luciferasa, una proteína fluorescente, una peroxidasa, β -galactosidasa o β -lactamasa, y
- en donde dicha proteína que activa el reportero tiene un sitio de escisión para una proteasa que está interpuesto entre dos porciones de dicha proteína que activa el reportero, en las que las dos porciones están presentes en un orden reordenado,
- 35 ii) una segunda proteína unida a dicha proteasa;
- iii) dicha proteína que activa el reportero activada por la escisión por dicha proteasa, escisión que da como resultado la reordenación de dichas dos porciones de dicha proteína que activa el reportero; y
- iv) un reportero cuya señal detectable es cambiada por dicha proteína que activa del reportero;
- 40 en donde la asociación de dicha primera proteína con dicha segunda proteína da como resultado la escisión de dicha proteína que activa el reportero.
7. El sistema de la reivindicación 6, en donde dicha proteína que activa el reportero es dicho reportero.
8. El sistema de la reivindicación 6 o 7, en donde al menos una proteína seleccionada del grupo que consiste en dicha primera proteína y dicha segunda proteína es una proteína de membrana.

9. El sistema de la reivindicación 8, en donde dicha proteína de membrana es una GPCR.
10. El sistema de cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, en donde dicha proteasa tiene una secuencia de reconocimiento que tiene al menos 4 aminoácidos.
- 5 11. El sistema de cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10, en donde dicha proteasa es una proteasa TEV (virus etch del tabaco virus).
12. El sistema de cualquiera de las reivindicaciones 6 a 11, en donde dicha señal es luz y dicho reportero es una luciferina o proteína fluorescente.
13. El sistema de la reivindicación 12, en donde dicho reportero es GFP.
- 10 14. El sistema de cualquiera de las reivindicaciones 6 a 13, en donde al menos una proteína seleccionada del grupo que consiste en dicha primera proteína y dicha segunda proteína es una proteína citoplásmica.
15. El sistema de cualquiera de las reivindicaciones 6 a 14, en donde la interacción proteína-proteína requiere la translocación de dicha primera proteína o dicha segunda proteína un organelo o compartimento celular.
16. El sistema de la reivindicación 15, en donde la translocación de dicha primera proteína o dicha segunda proteína al núcleo causa la modulación de la señal del reportero.
- 15 17. El sistema de cualquiera de las reivindicaciones 6 a 16, en donde dicho reportero o dicha proteasa comprende una secuencia diana nuclear.

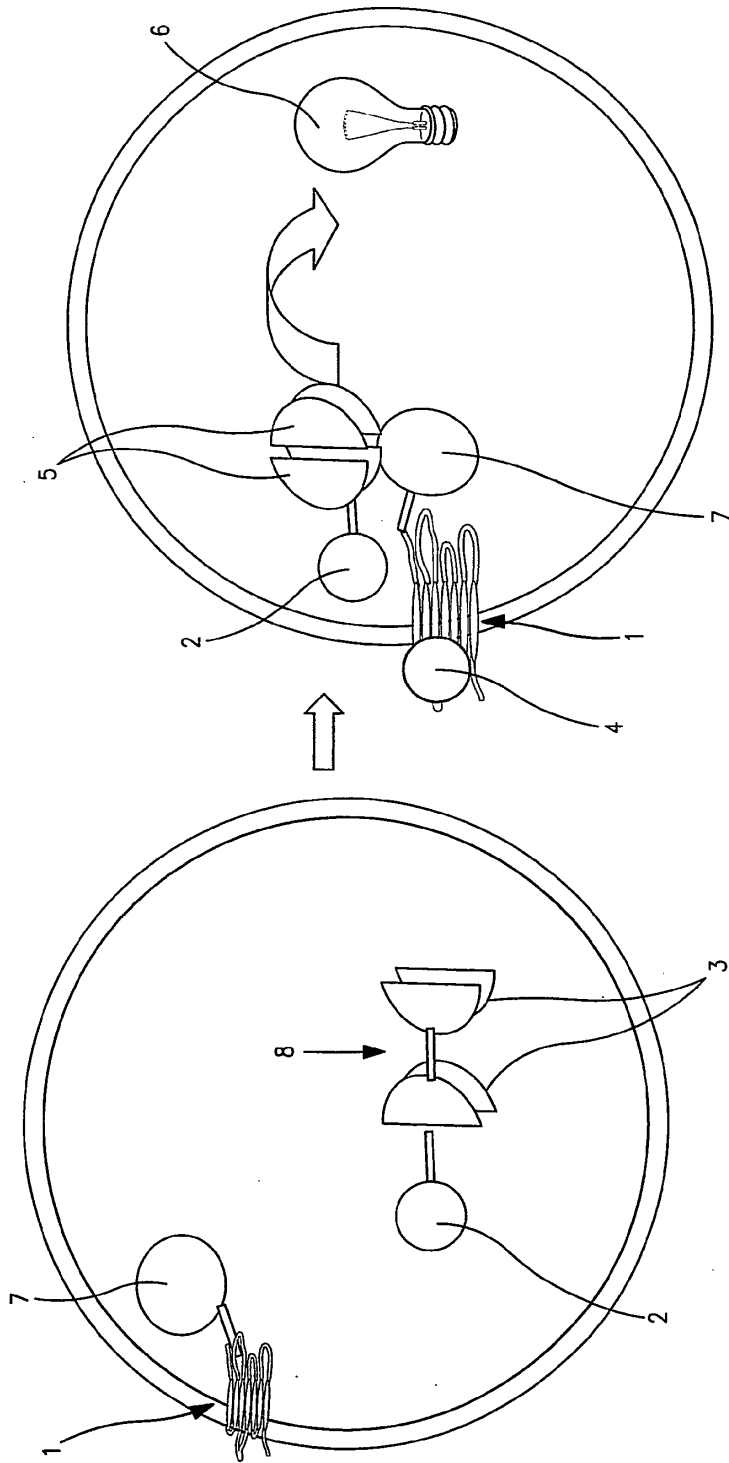


FIG. 1

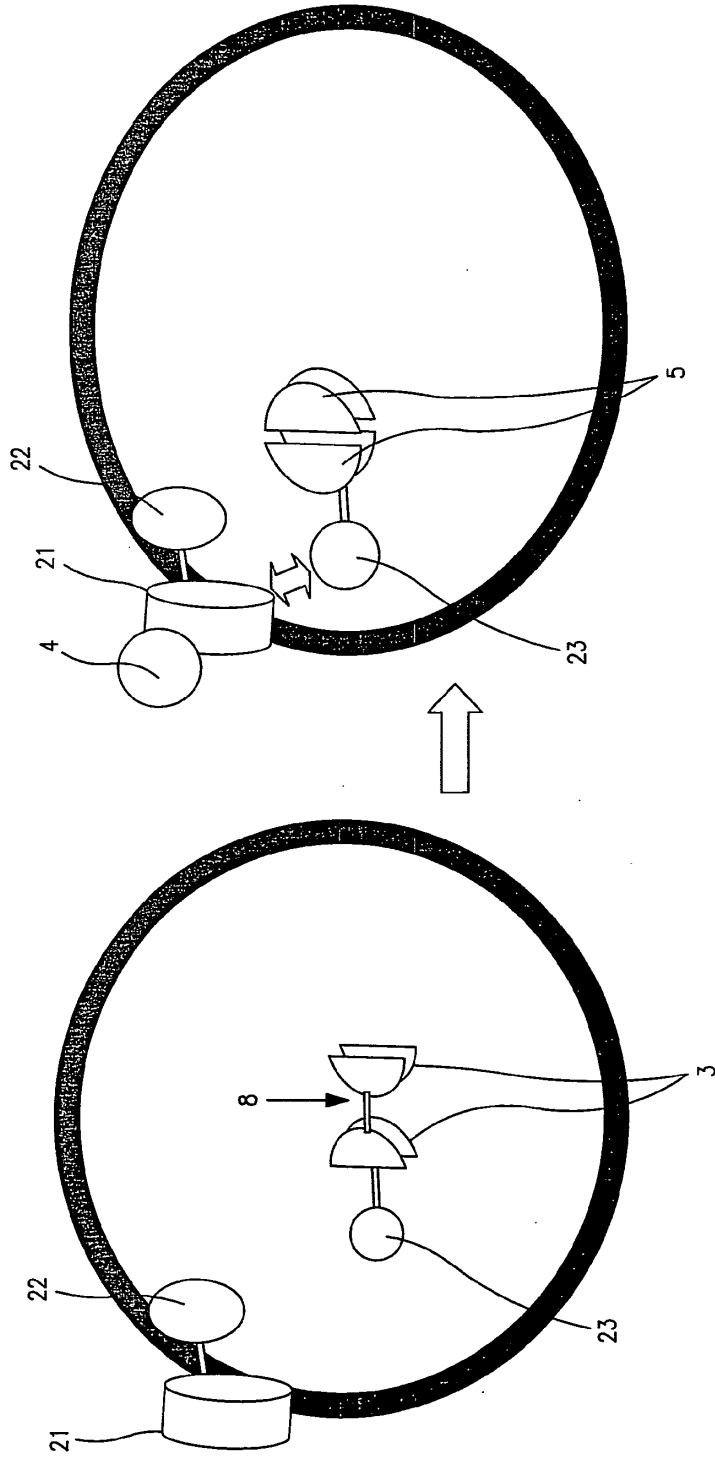


FIG. 2

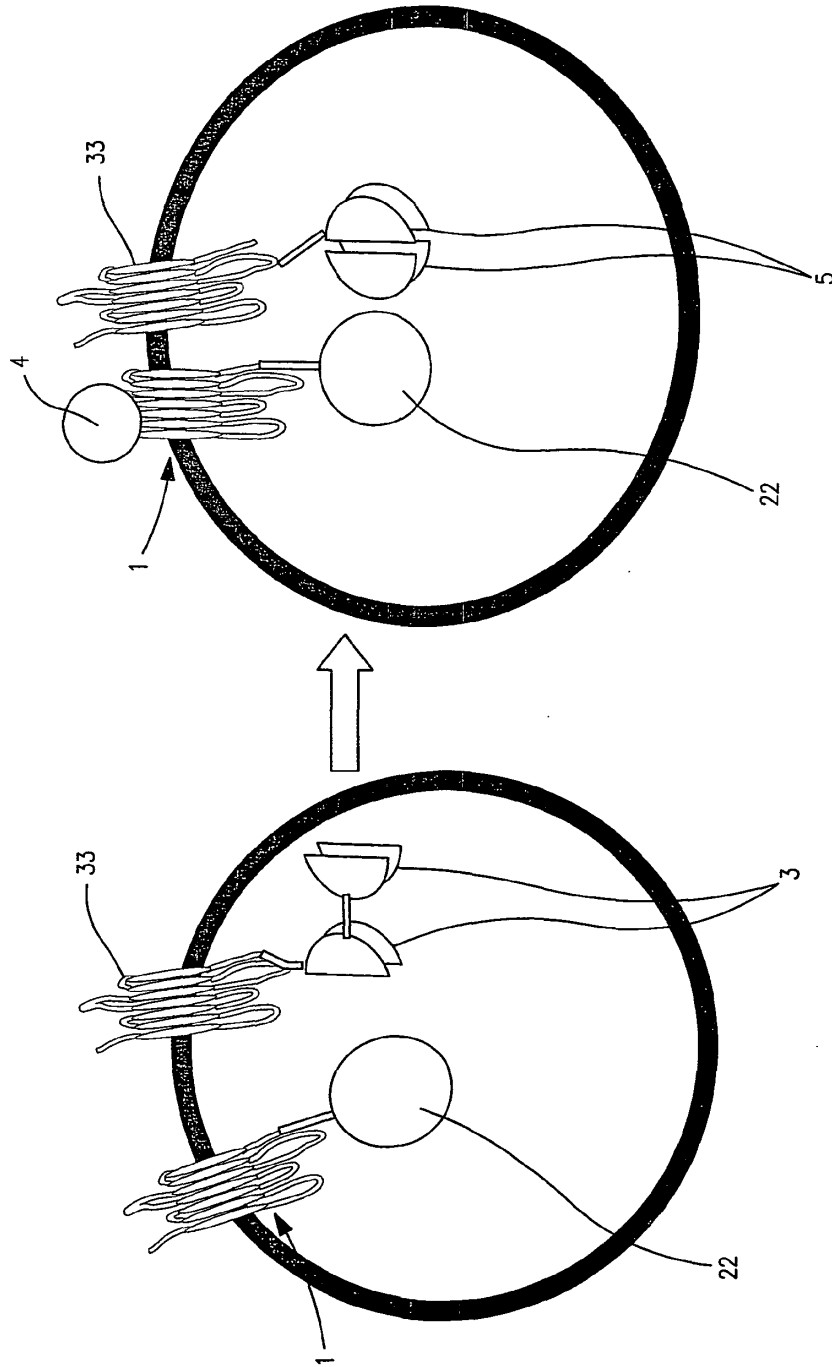


FIG. 3

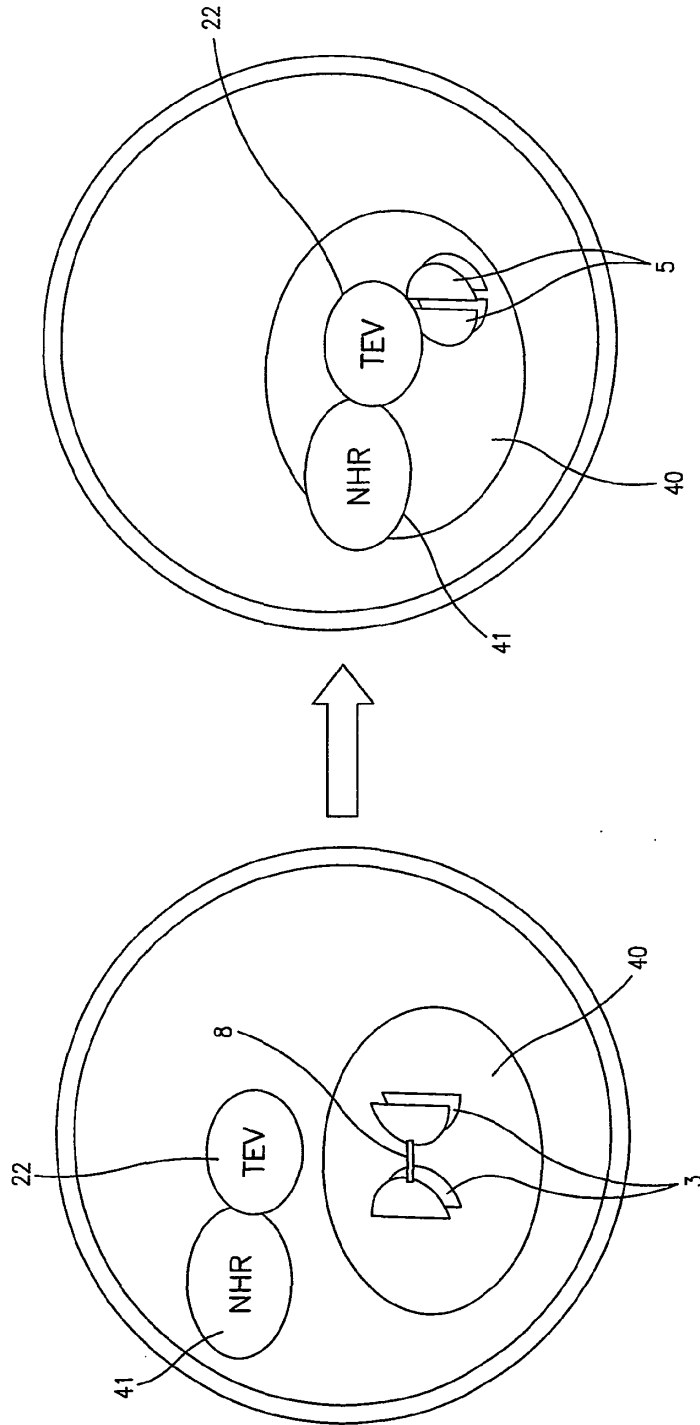


FIG. 4

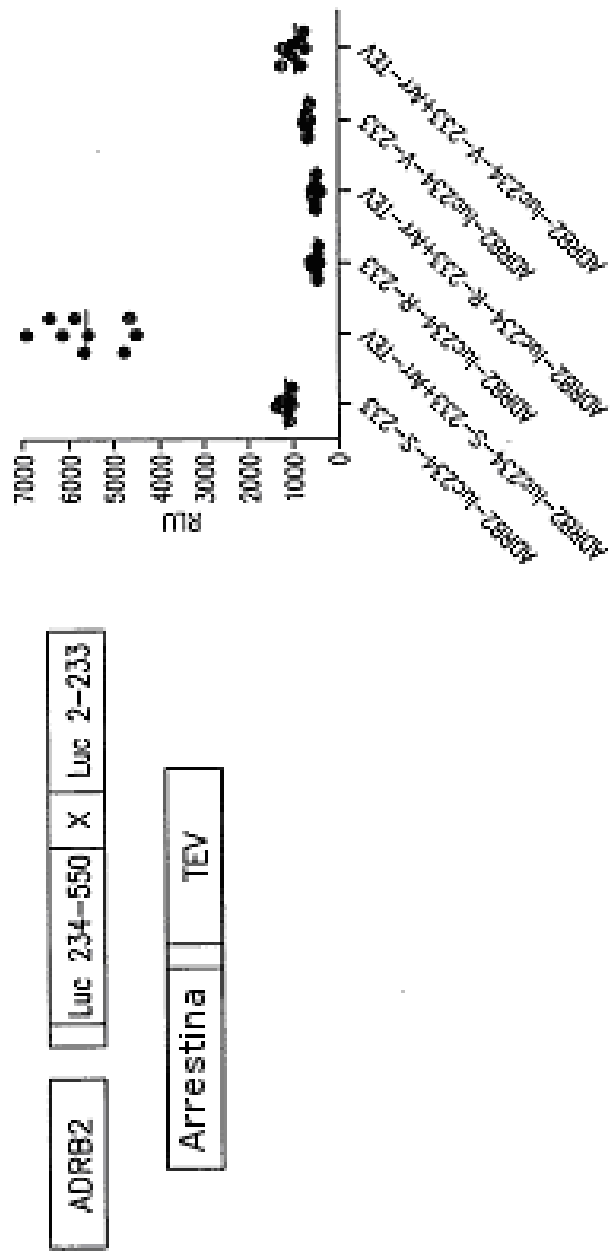


FIG. 5

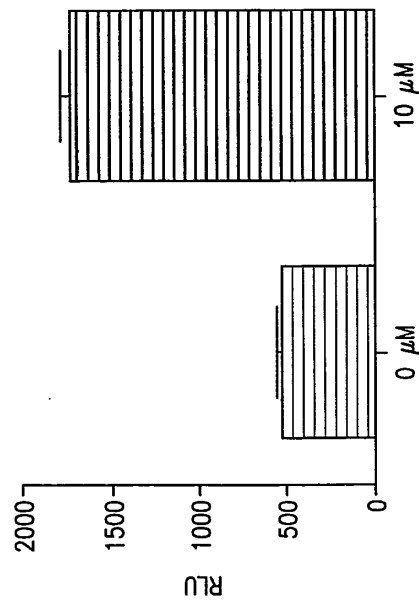
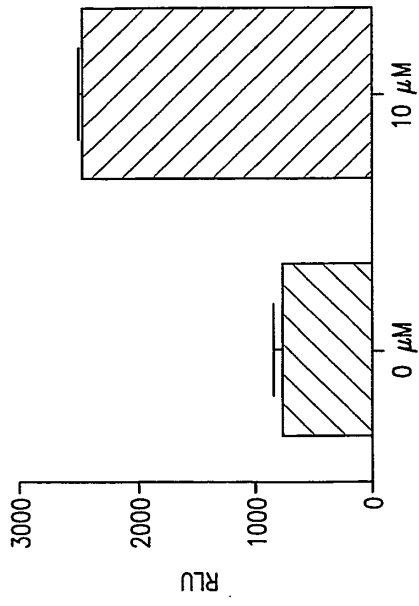


FIG. 6

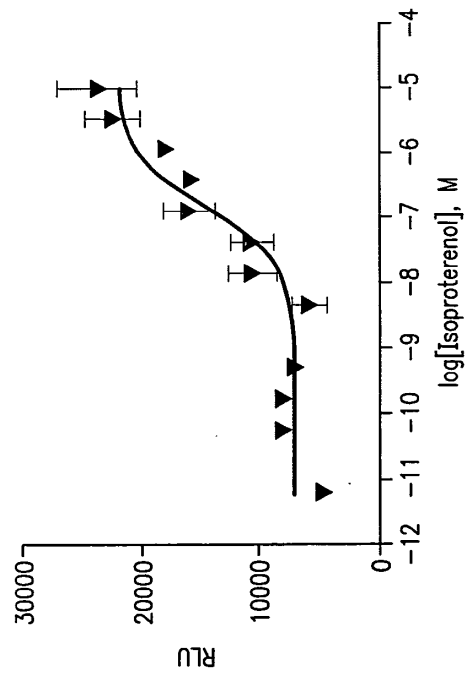
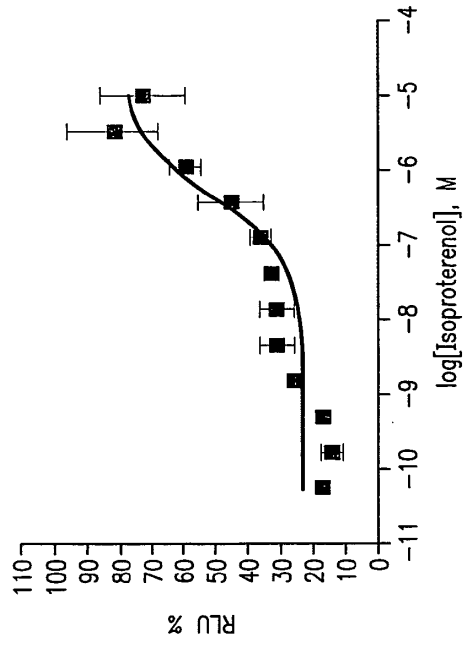
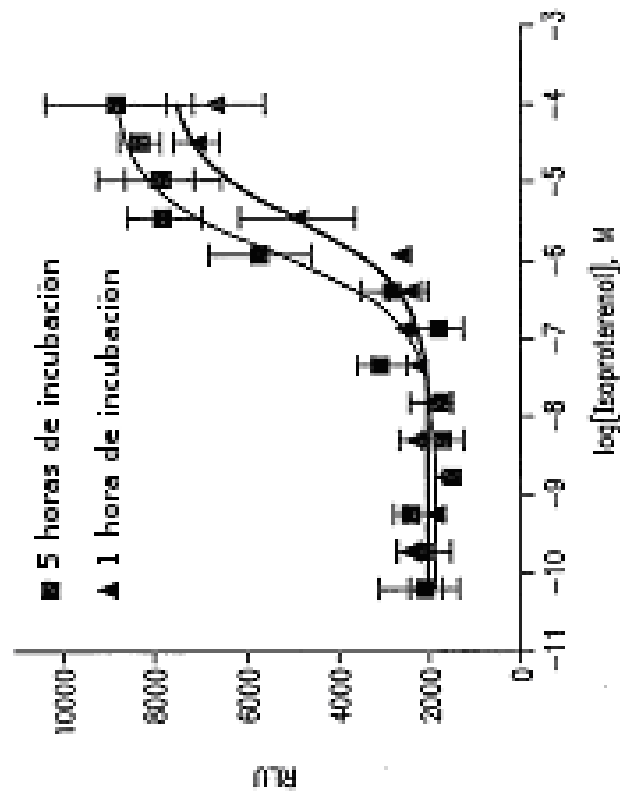


FIG. 7



ADRB2	TEV
-------	-----

Arrestina 2	Luc 234- 550	x	Luc 2- 233
----------------	-----------------	---	---------------

FIG. 8

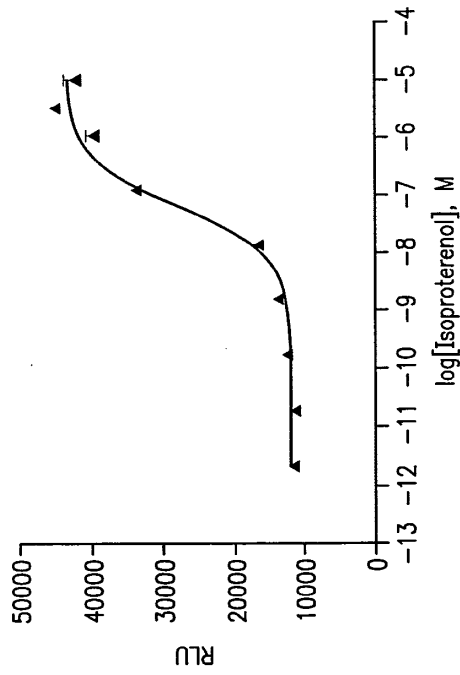
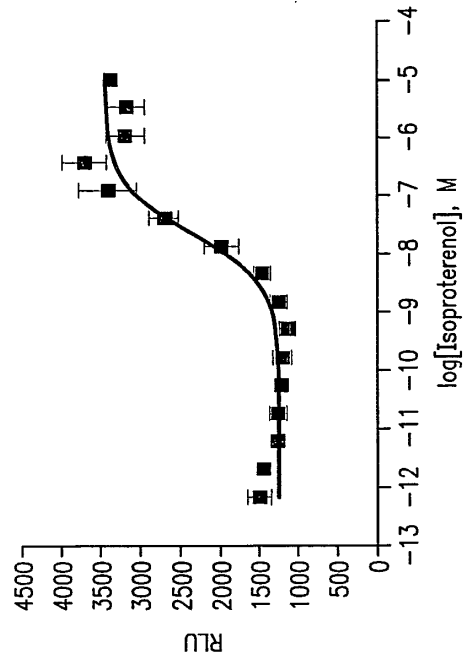


FIG. 9

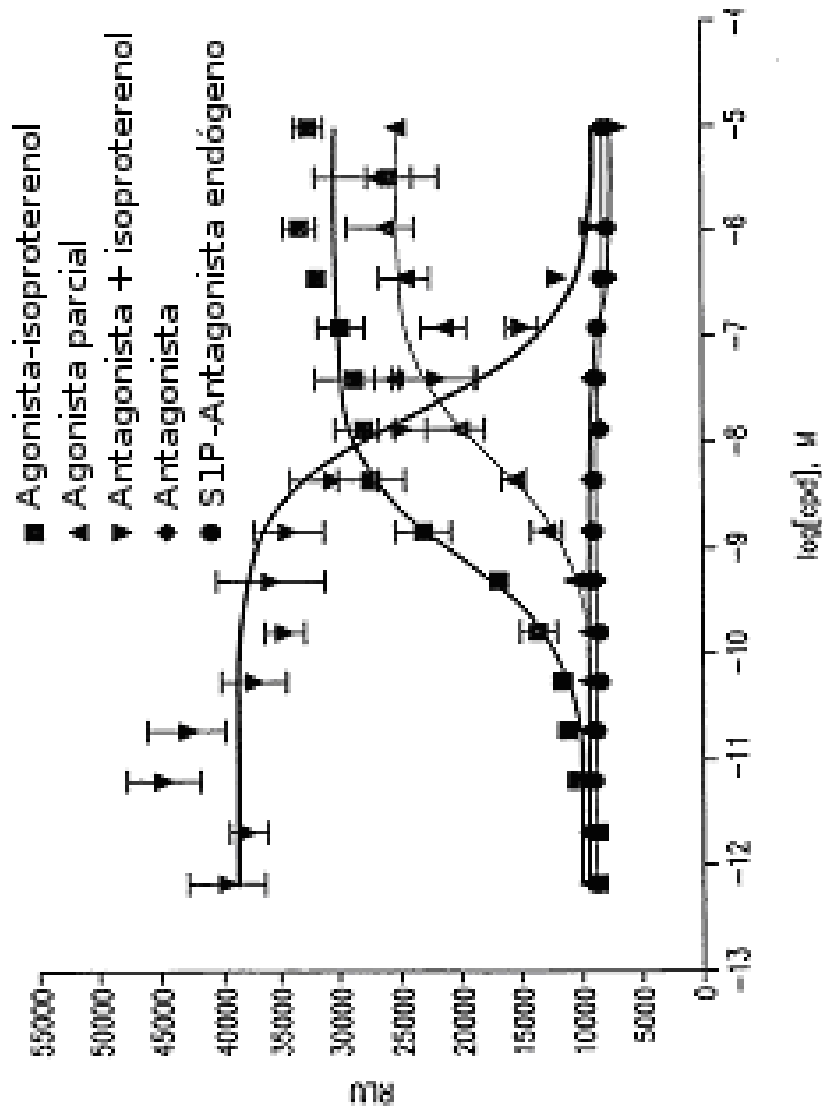


FIG. 10

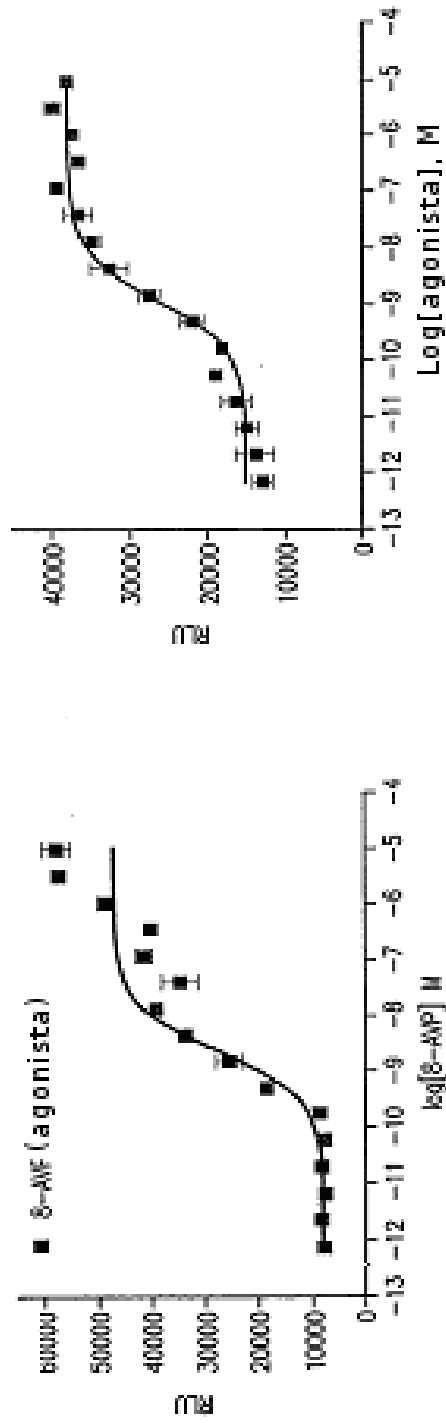


FIG. 11

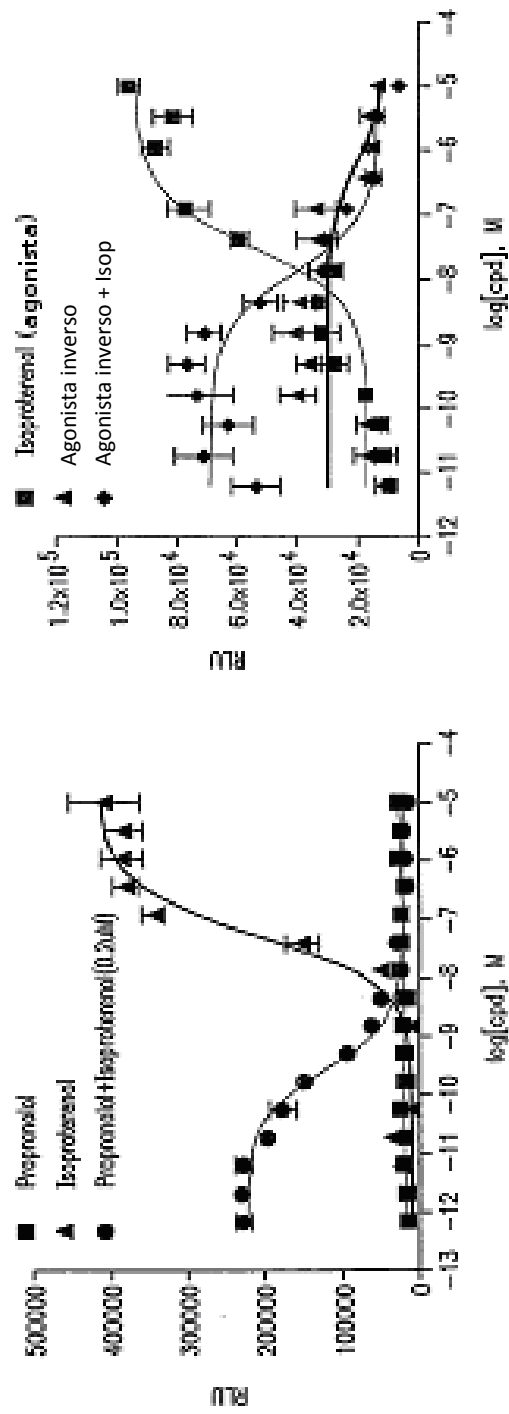


FIG. 12

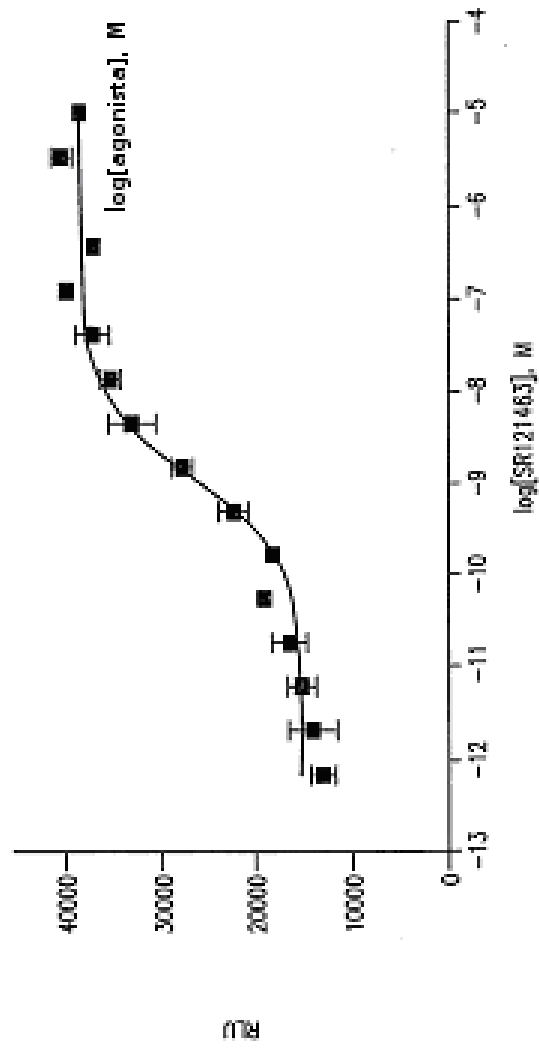


FIG. 13

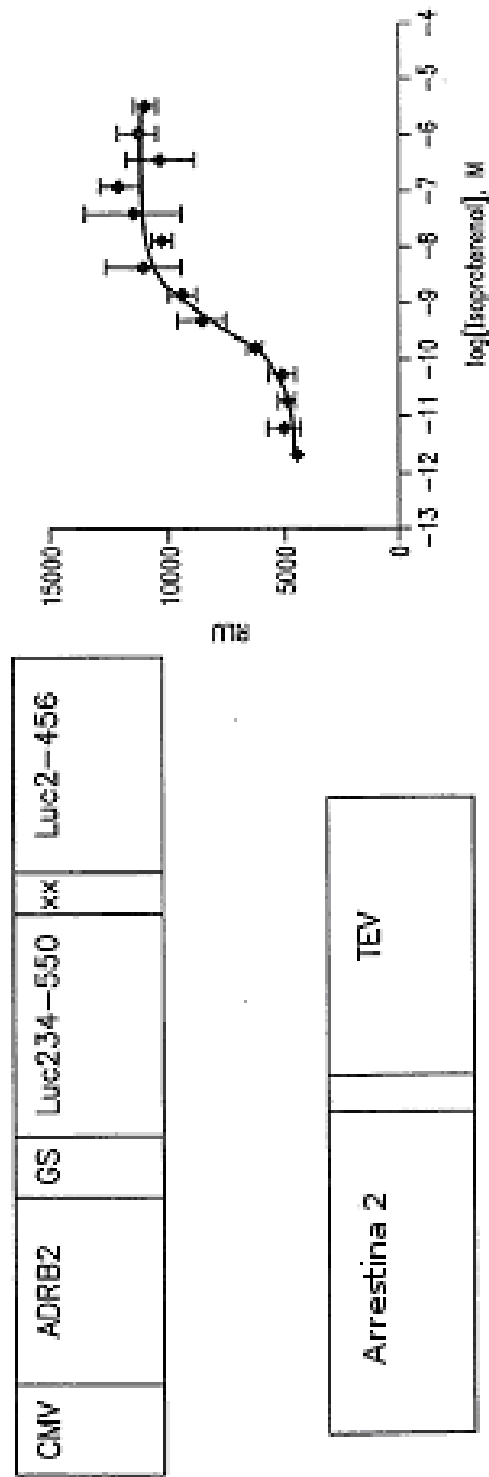


FIG. 14

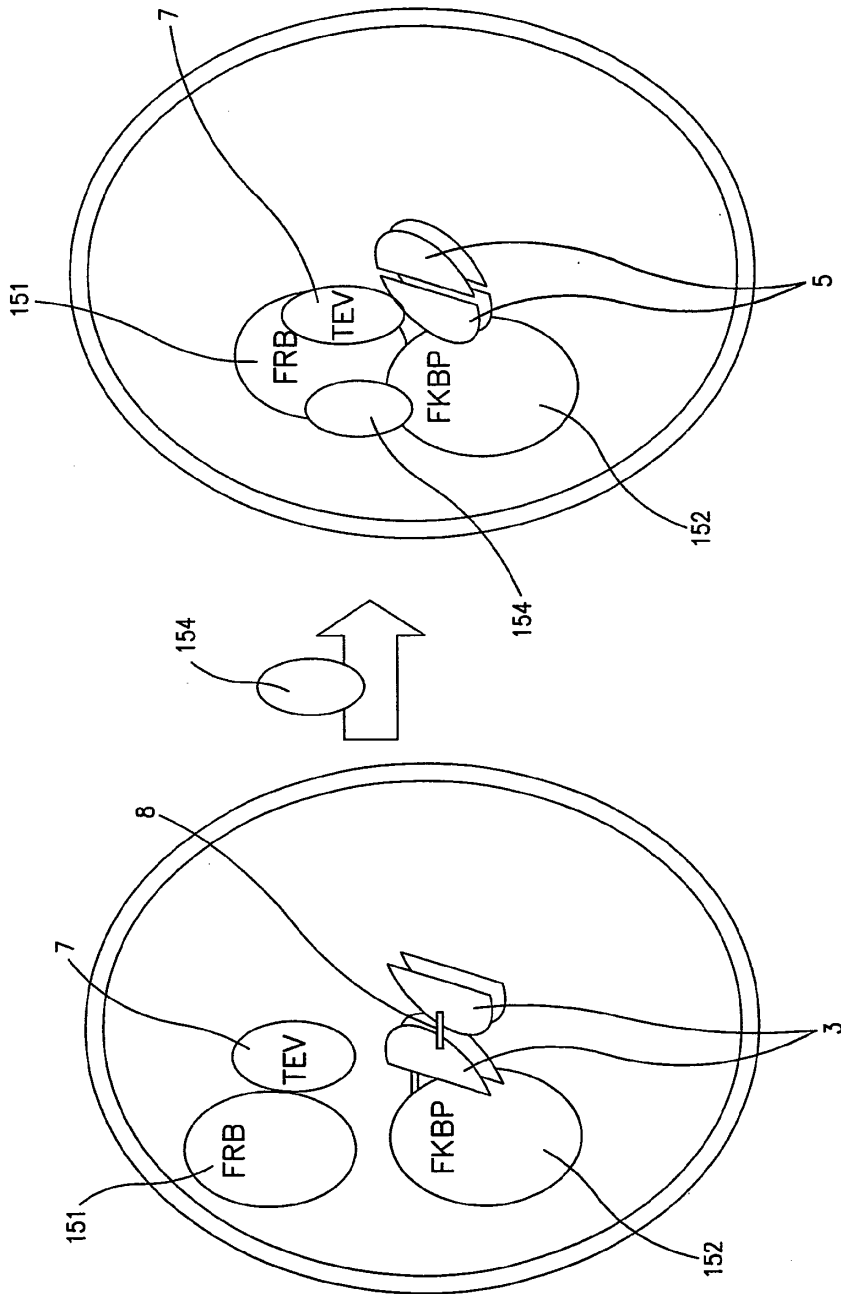


FIG. 15

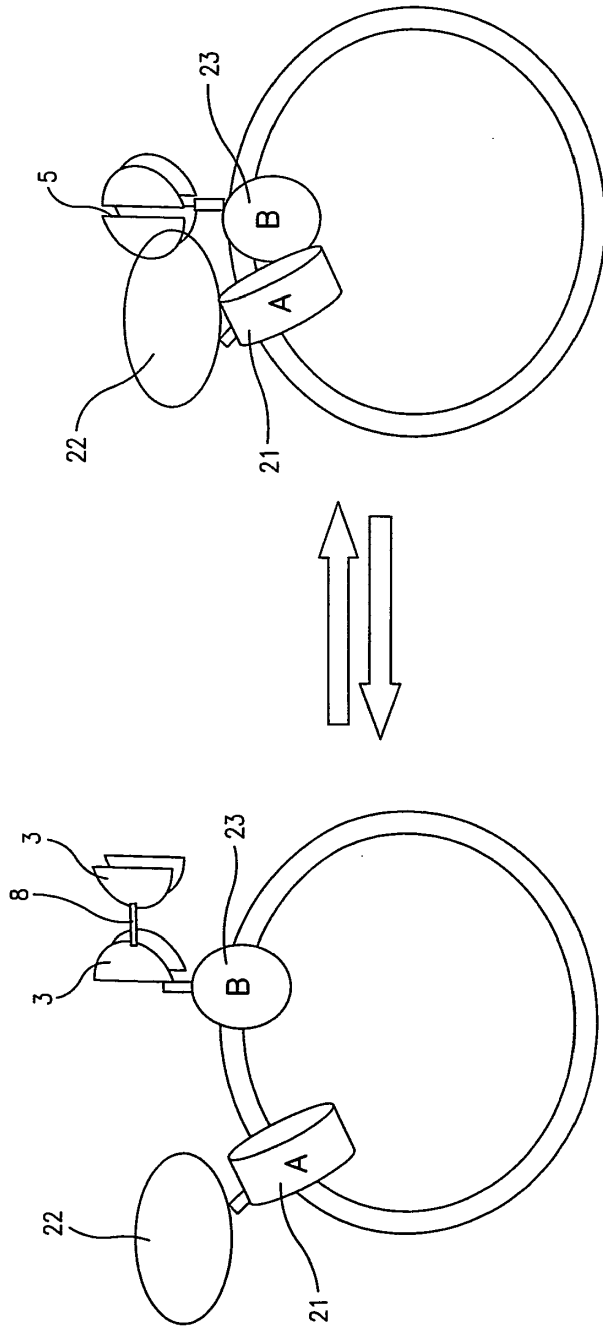


FIG. 16

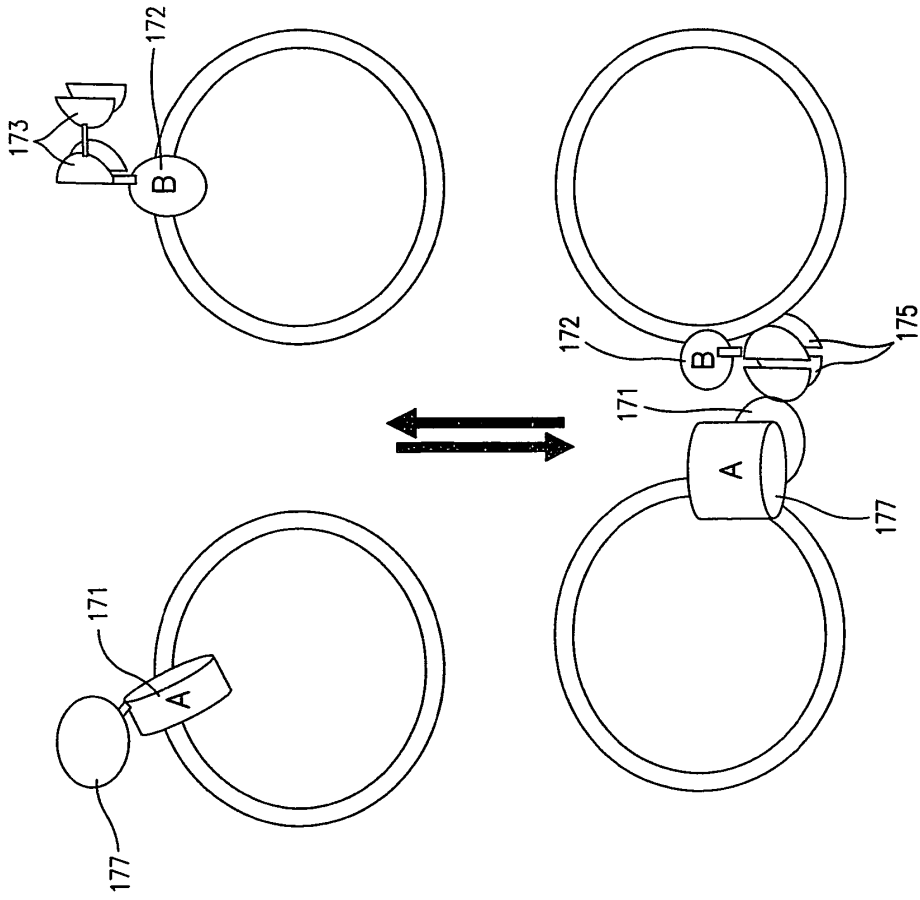


FIG. 17