

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 415 729**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/81** (2006.01)

**C12Q 1/02** (2006.01)

**G01N 33/50** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.06.2008 E 08766989 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.04.2013 EP 2162541**

54 Título: **Un método de cribado para compuestos que reducen el estrés del RE**

30 Prioridad:

**07.06.2007 GB 0710976**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**26.07.2013**

73 Titular/es:

**BIOALVO - SERVIÇOS, INVESTIGAÇÃO E  
DESENVOLVIMENTO EM BIOTECNOLOGIA S.A.  
(100.0%)  
Edifício ICAT - Campus de FCUL Campo Grande  
1749-016 Lisboa , PT**

72 Inventor/es:

**ROCA, CHRISTOPHE FRANÇOIS AIMÉ;  
SOUSA, JOSÉ MANUEL BERNARDO;  
CEREJO, MARTA ISABEL HEITOR;  
DOS SANTOS, ALEXANDRA MARIA BARROS;  
RODRIGUES, CÁTIA SANTANA REVERENDO;  
PINHEIRO, RICARDO FILIPE ANTUNES;  
CALADO, PATRÍCIA RAMALHETE MENDES DA  
SILVA;  
CHATTERJEE, SUKALYAN y  
VIEIRA, HELENA MARGARIDA MOREIRA DE  
OLIVEIRA**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 415 729 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

Un método de cribado para compuestos que reducen el estrés del RE

5 La presente invención se refiere a una célula de levadura que comprende un elemento de estrés del retículo endoplasmático (RE) ligado operablemente a un elemento indicador y un gen exógeno que codifica una proteína que induce el estrés del RE, donde el elemento de estrés del RE es una secuencia de ADN del elemento de respuesta a la proteína desplegada KAR2. Los métodos de cribado que utilizan la célula modificada y los métodos para producir la célula también forman parte de la invención.

10 La función biológica de células y, en última instancia, de tejidos, órganos y cuerpo, depende del plegamiento correcto de un sistema de miles de proteínas. La secuencia aminoacídica de una proteína dada contiene la información requerida para plegarla en una estructura tridimensional específica y funcional. En células sanas, las proteínas se pliegan adecuadamente en su conformación natural y, si no lo hacen, las proteínas chaperonas deben corregir el plegamiento incorrecto (Bukau B, Weissman J, Horwich A. *Cell*. 2006; 125(3):443-51). En los trastornos debidos al plegamiento incorrecto de las proteínas (PMD, por sus siglas en inglés) o los trastornos conformacionales (CD, por sus siglas en inglés), sin embargo, el plegamiento incorrecto de una proteína da como resultado su degradación (p. ej., fibrosis quística) o su agregación y acumulación en forma de depósitos proteicos cerca del sitio de su producción celular o en diversos tejidos (Soto C, Estrada LD. *Arch Neurol*. 2008;65(2):184-9; Winklhofer KF, Tatzelt J, Haass C. *EMBO J*. 2008;27(2):336-49; Gregersen N. *J Inherit Metab Dis*. 2006;29(2-3):456-70).

20 Hay ciertos mecanismos que son comunes a la gran mayoría de las enfermedades conformacionales proteicas que incluyen la formación de agregados, regulación transcripcional alterada, disfunción mitocondrial, inducción del estrés del RE y deficiencia del sistema ubiquitina-proteasoma. La inducción del estrés del RE es uno de los mecanismos más comunes asociados con las enfermedades conformacionales proteicas (Yoshida H. *FEBS J*. 2007; 274(3):630-58).

25 El RE es un importante compartimento de plegamiento proteico en la célula eucariota, tan solo superado por el citosol. El plegamiento proteico en el RE es más complejo que el plegamiento proteico en el citosol porque las proteínas se modifican postraduccionalmente. El plegamiento en el RE debe acoplar las rutas de síntesis proteica que operan fuera del compartimento con las rutas de plegamiento asistidas por el RE (ERAF, por sus siglas en inglés) en el lumen. La expresión de una versión mutante de una proteína o incluso algunas proteínas naturales, infección vírica, agotamiento de nutrientes o energía, condiciones ambientales extremas o estímulos que provocan una liberación excesiva del calcio del lumen de RE comprometen las reacciones de plegamiento proteico en el RE, lo que da lugar a la acumulación de las proteínas desplegadas e inicio de una cascada de señales que se transmiten al citoplasma y núcleo. Cuando la demanda de plegamiento proteico en el RE excede la capacidad de plegamiento del RE, se produce una condición denominada "estrés del RE" (Malhotra JD, Kaufman RJ. *Semin Cell Dev Biol*. 2007; 18(6):716-31). El estrés del RE también puede ser el resultado de otras condiciones, concretamente cuando una proteína que se traduce en el citosol se pliega de manera incorrecta e induce el reclutamiento de la maquinaria de plegamiento, lo que lleva a un déficit de asistencia en el plegamiento en el RE.

40 Los desequilibrios en el plegamiento mediado por chaperonas que están asociados con numerosas enfermedades debidas al plegamiento incorrecto (incluidas diabetes, enfermedad de Huntington, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, encefalopatías priónicas, fibrosis quística y muchas otras) desencadenan la respuesta a proteínas desplegadas (UPR, por sus siglas en inglés), utilizando tanto las rutas transcripcionales como las traduccionales para corregir el problema y aliviar el estrés del RE. Esta respuesta adaptativa incluye los siguientes pasos: 1) la activación transcripcional de genes que codifican chaperonas que residen en el RE y catalizadores de plegamiento; 2) complejos de degradación proteica que aumentan la capacidad de plegamiento del RE y 3) la atenuación traduccional para evitar una acumulación mayor de proteínas desplegadas en el RE. Las moléculas de bajo peso molecular moduladoras de las rutas de respuesta al plegamiento proporcionan nuevas herramientas farmacológicas para ajustar estos desequilibrios. La reprogramación de las rutas de estrés con fármacos proporciona una nueva estrategia potencial para equilibrar la cantidad de proteína del RE con la capacidad de plegamiento celular y de este modo se corrige la enfermedad subyacente.

50 Existen algunos métodos de cribado para identificar moduladores del estrés del RE, tales como los descritos en el documento WO2005/034737, el cual describe un cribado en mamíferos que implica la utilización del componente dependiente de inositol 1 (IRE1) y/o la proteína 1 de unión a la caja X (XBP-1) como marcadores específicos del estrés del RE. Sin embargo, estos cribados no suponen un sistema sensible, económico y de producción rápida para identificar moduladores del estrés del RE.

55 Dado que hay una necesidad urgente de agentes terapéuticos con el potencial de prevenir y/o tratar enfermedades relacionadas con el estrés del RE, hay una gran demanda de un método de cribado de producción rápida que mantenga la sensibilidad.

La presente invención proporciona una plataforma de cribado celular de este tipo, sensible, rápida y económica para compuestos que serán útiles en el tratamiento de enfermedades o trastornos relacionados con el estrés del RE.

La invención es tal y como se expone en las reivindicaciones.

5 El primer aspecto de la invención proporciona una célula de levadura que comprende un elemento sensor del estrés del RE ligado operablemente a un elemento indicador y que comprende un gen exógeno que codifica una proteína que induce el estrés del RE, donde el elemento sensor del estrés del RE es una secuencia de ADN del elemento de respuesta a la proteína desplegada KAR2.

En una realización, la célula es una célula de *Saccharomyces cerevisiae* o de cualquier otra cepa de levadura del orden de los Saccharomycetales.

10 El elemento KAR2 UPRE de la invención puede comprender i) la secuencia de ácido nucleico expuesta en la SEQ ID NO:1, una secuencia nucleica que sea homóloga a esta en más del 95% o a su ADN complementario o secuencia correspondiente de ARN, una variante, fragmento o la hebra complementaria a esta o ii) una secuencia de ácido nucleico, especialmente ADN o ARN, que se hibride con la secuencia de ADN de la SEQ ID NO:1, una secuencia de ácido nucleico que sea homóloga a esta en más del 95% o una variante o fragmento de esta.

15 Este aspecto de la invención se extiende al elemento KAR2 UPRE que comprende una secuencia de ácido nucleico que es homóloga en al menos el 96%, 97%, 98% o 99% a la secuencia de ADN de la SEQ ID NO:1 o a su ADN complementario o una secuencia correspondiente de RNA.

20 La hibridación puede tener lugar en condiciones sumamente rigurosas. Tal como se definen en la presente, las condiciones "sumamente rigurosas", pueden identificarse como aquellas que: (1) emplean una baja fuerza iónica y una temperatura elevada para lavar, por ejemplo, cloruro sódico 0,015 M/citrato sódico 0,0015 M/dodecilsulfato sódico al 0,1% a 50 °C; (2) emplean un agente desnaturante durante la hibridación, tal como formamida, por ejemplo, formamida al 50% (v/v) con albúmina de suero bovino al 0,1% (p/v)/Ficol al 0,1% (p/v)/polivinilpirrolidona al 0,1% (p/v)/tampón de fosfato sódico 50 mM a pH 6,5 con cloruro sódico 750 mM y citrato sódico 75 mM a 42 °C.; o  
25 (3) emplean formamida al 50% (v/v), 5xSSC (NaCl 0,75 M, citrato sódico 0,075 M), fosfato sódico 50 mM (pH 6,8), pirofosfato sódico al 0,1%, 5x solución de Denhardt, ADN de esperma de salmón sonificado (50 µg/mL), SDS al 0,1% (p/v) y sulfato de dextrano al 10% (p/v) a 42 °C, con lavados a 42 °C en 0,2xSSC (cloruro sódico/citrato sódico) y formamida al 50% a 55 °C, seguidos de un lavado sumamente riguroso que consiste en 0,1xSSC que contiene EDTA a 55 °C.

30 El porcentaje de identidad de las secuencias de ácido nucleico puede determinarse mediante la comparación de la información de las secuencias utilizando el programa informático GAP, versión 6.0, descrito por Devereux et al. (Nucl. Acids Res. 12:387, 1984) y ofrecido por el Grupo Informático de Genética de la Universidad de Wisconsin (UWGCG). El programa GAP utiliza el método de alineamiento de Needleman y Wunsch (J. Mol. Biol. 48:443, 1970), tal como lo revisaron Smith y Waterman (Adv. Appl. Math 2:482, 1981). Los parámetros por defecto preferidos para el programa GAP incluyen: (1) una matriz de comparación unaria (que contiene un valor de 1 para las identidades y 0 para las no identidades) para nucleótidos y la matriz de comparación ponderada de Gribskov y Burgess, Nucl. Acids Res. 14:6745, 1986, tal como la describen Schwartz y Dayhoff, eds., Atlas of Protein Sequence and Structure, National Biomedical Research Foundation, pp. 353-358, 1979; (2) una penalización de 3,0 para cada hueco y una penalización adicional de 0,10 para cada símbolo en cada hueco; y (3) ninguna penalización para los huecos finales. También se pueden usar otros programas que emplee un experto en la técnica de la comparación de secuencias.

40 El aislamiento de la secuencia de nucleótidos del elemento sensor del estrés del RE puede llevarse a cabo mediante cualquier método convencional adecuado conocido por aquellos expertos en la técnica, tal como amplificación por PCR o síntesis e hibridación de ADN comercial. Los elementos sensores del estrés del RE apropiados y los elementos indicadores son elementos conocidos por los expertos.

45 En levaduras, la acumulación de proteínas desplegadas en el RE activa la producción del factor de transcripción Hac1, responsable de la activación de los genes diana de la UPR. Un estudio exhaustivo ha definido que el alcance transcripcional de la UPR mediada por el factor Hac1 en levaduras comprende alrededor de 400 genes (~ el 5% del genoma de la levadura) (Travers KJ, Patil CK, Wodicka L, Lockhart DJ, Weissman JS, Walter P. Cell. 2000; 101(3):249-58). El elemento 1 de la respuesta a proteínas desplegadas (UPRE-1), la secuencia de activación en 5' mejor conocida a la que se une el factor Hac1, se ha identificado en el promotor de la diana Kar2 de la UPR. Sin embargo, menos del 5% de los genes que son diana de la UPR en levaduras contienen este elemento secuencia en sus promotores, dos UPRE adicionales (UPRE-2 y UPRE-3) también se unen a Hac-1, aunque no comparten ninguna similitud secuencial reconocible. El propio promotor Hac-1 contiene una secuencia UPRE y responde al  
50 estrés del RE para inducir la transcripción de su gen en 3'.

5 El elemento indicador comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido detectable de manera eficaz mediante métodos establecidos, que proporciona preferentemente una lectura que es compatible con un ensayo de cribado de alto rendimiento. El elemento indicador se expresa cuando el elemento sensor del estrés del RE, al cual está ligado operablemente, se activa. Los ejemplos de elementos indicadores incluyen, sin carácter limitante,  $\beta$ -galactosidasa, fosfatasa alcalina, luciferasa y proteínas etiquetadas. El elemento indicador puede codificar, por ejemplo, cualquier marcador basado en fluorescencia, p. ej., la proteína fluorescente verde mejorada, así como enzimas, marcadores inmunológicos o cualquier otro ejemplo de marcadores que puedan ser seleccionados y cribados muy conocidos en la técnica. El elemento indicador está ligado operablemente al elemento sensor del estrés del RE y, por tanto, está bajo el control del elemento sensor del estrés del RE.

10 El elemento sensor del estrés del RE puede insertarse en cualquier vector adecuado, tal como un plásmido integrativo, centromérico o episomal. El vector puede ser un vector de levaduras incluido un cósmido o un cromosoma artificial de levaduras.

La expresión del elemento indicador puede ser proporcional al nivel de estrés del RE al cual está sometida la célula de la invención.

15 El gen exógeno puede codificar cualquiera de las proteínas de enfermedades humanas que se sabe que inducen condiciones patológicas que están, al menos parcialmente, asociadas con la inducción del estrés del RE.

20 Un gen exógeno puede ser una secuencia de ADN exógena, p. ej., una secuencia de ADN que codifique una proteína que no esté presente de manera endógena en una célula particular, o una secuencia de ADN que esté presente de manera endógena en una célula particular pero que no esté presente normalmente en esa posición en el genoma o que normalmente no esté bajo el control de las mismas secuencias reguladoras o una secuencia de ADN que esté presente de manera endógena en una célula particular pero que se ha modificado con el fin de que porte una mutación que cause una enfermedad.

25 El gen exógeno puede codificar una proteína que incluya, sin carácter limitante, péptidos  $\beta$  (placas); factor natriurético atrial, CFTR (regulador transmembrana de la fibrosis quística), receptor insulínico, PS1 (Presenilina 1), transtiretina (TTR – más de 45 mutantes, completos o fragmentos), apolipoproteína AI, SOD1 (superóxido dismutasa 1), LDLR (receptor de lipoproteínas de baja densidad), gelsolina, tau (de tipo natural o mutante),  $\beta$ -galactosidasa,  $\beta$ 2-microglobulina, L2-microglobulina, cistatina c, lisozima, cadena  $\alpha$ -A del fibrinógeno, apolipoproteína AI, apolipoproteína AII, FAH, Htt (huntingtina), cadena ligera de la inmunoglobulina, insulina, calcitonina,  $\alpha$ -sinucleína (tipo natural o mutante), parkina, PLP1 (proteína proteolipídica 1), cadenas ligeras de Ig (completas o fragmentos), amiloide sérico A (completo o un fragmento de 76 residuos), hemoglobina, receptor androgénico, ataxinas, PrP (proteína priónica), APP (proteína del precursor amiloide), amilina, PERK, WFS1 o A1AT (alfa 1-antitripsina). El gen exógeno también puede codificar cualquier otra proteína con una mutación que se sepa que causa una enfermedad humana o una proteína con cualquier combinación de mutaciones de este tipo.

35 El gen de la transtiretina puede comprender i) la secuencia de ácido nucleico expuesta en la SEQ ID NO:2, una secuencia nucleica que sea homóloga a esta en más del 95% o a su ADN complementario o secuencia correspondiente de ARN, una variante, fragmento o la hebra complementaria a esta, ii) una secuencia de ácido nucleico, especialmente ADN o ARN, que se hibride con la secuencia de ADN de la SEQ ID NO:2, una secuencia de ácido nucleico que sea homóloga a esta en más del 95% o una variante o fragmento de esta o iii) una secuencia de ácido nucleico, especialmente ADN o ARN, que, si no fuera por la degeneración del código genético, se hibridaría con la secuencia de ADN de la SEQ ID NO:2.

40 El gen de la transtiretina de acuerdo con la invención también puede codificar una proteína que comprenda una mutación en forma de sustitución de valina por metionina en la posición 50 o una proteína que comprenda una mutación en forma de sustitución de leucina por prolina en la posición 75 de la proteína codificada por la SEQ ID NO:2. La mutación en la posición 50 corresponde a un cambio del codón GTG por el codón ATG en la secuencia de ADN y la mutación en la posición 75 corresponde a un cambio del codón CTG por el codón CCG en la secuencia de ADN.

Estos aspectos de la invención se extienden a un gen de la transtiretina que comprenda una secuencia de ácido nucleico que sea homóloga en al menos el 96%, 97%, 98% o 99% a la secuencia de ADN de la SEQ ID NO:2 o a su ADN complementario o una secuencia correspondiente de RNA.

50 El gen tau puede comprender i) la secuencia de ácido nucleico expuesta en la SEQ ID NO:3, una secuencia nucleica que sea homóloga a esta en más del 95% o a su ADN complementario o secuencia correspondiente de ARN, una variante, fragmento o la hebra complementaria a esta, ii) una secuencia de ácido nucleico, especialmente ADN o ARN, que se hibride con la secuencia de ADN de la SEQ ID NO:3, una secuencia de ácido nucleico que sea homóloga a esta en más del 95% o una variante o fragmento de esta o iii) una secuencia de ácido nucleico,

especialmente ADN o ARN, que, si no fuera por la degeneración del código genético, se hibridaría con la secuencia de ADN de la SEQ ID NO:3.

5 El gen tau de acuerdo con la invención también puede codificar una proteína que comprenda una mutación en forma de sustitución de prolina por serina, lo que corresponde a un cambio de citosina por timina en la posición 727 de la SEQ ID NO:3. La invención incluye además una proteína que comprenda una mutación en forma de sustitución de prolina por leucina, lo que corresponde a un cambio de citosina por timina en la posición 728 de la SEQ ID NO:3. La invención incluye también una proteína que comprenda una eliminación del residuo de lisina, lo que corresponde a una eliminación de los residuos de adenina, adenina y guanina (AAG) en las posiciones 664-666 de la SEQ ID NO:3.

10 El gen tau de la invención incluye también una proteína que comprenda una mutación en forma de sustitución de glicina por valina, lo que corresponde a un cambio de guanina por timina en la posición 641 de la SEQ ID NO:3, una mutación en forma de sustitución de prolina por leucina, lo que corresponde a un cambio de citosina por timina en la posición 728 de la SEQ ID NO:3, una mutación en forma de sustitución de valina por metionina, lo que corresponde a una mutación en forma de sustitución de guanina por adenina en la posición 835 de la SEQ ID NO:3 y una

15 mutación en forma de sustitución de arginina por triptófano, lo que corresponde a una mutación en forma de sustitución de citosina por timina en la posición 1042 de la SEQ ID NO:3.

Este aspecto de la invención se extiende a un gen tau que comprenda una secuencia de ácido nucleico que sea homóloga en al menos el 96%, 97%, 98% o 99% a la secuencia de ADN de la SEQ ID NO:3 o a su ADN complementario o a una secuencia correspondiente de RNA.

20 El gen CFTR puede comprender i) la secuencia de ácido nucleico expuesta en la SEQ ID NO:4, una secuencia nucleica que sea homóloga a esta en más del 95% o a su ADN complementario o secuencia correspondiente de ARN, una variante, fragmento o la hebra complementaria a esta, ii) una secuencia de ácido nucleico, especialmente ADN o ARN, que se hibride con la secuencia de ADN de la SEQ ID NO:4, una secuencia de ácido nucleico que sea homóloga a esta en más del 95% o una variante o fragmento de esta o iii) una secuencia de ácido nucleico, especialmente ADN o ARN, que, si no fuera por la degeneración del código genético, se hibridaría con la secuencia

25 de ADN de la SEQ ID NO:4.

El gen CFTR de acuerdo con la invención también puede codificar una proteína que comprenda una mutación en forma de eliminación del residuo de fenilalanina en la posición 508 de la proteína codificada por la SEQ ID NO:4. En una realización adicional, el gen CFTR también puede codificar una mutación en forma de sustitución de glicina por ácido aspártico en la posición 551, una proteína que comprenda una mutación en forma de sustitución de arginina por treonina en la posición 560 o una proteína que comprenda una mutación en forma de sustitución de alanina por ácido glutámico en la posición 561 de la proteína codificada por la SEQ ID NO:4.

30

Este aspecto de la invención se extiende a un gen CFTR que comprenda una secuencia de ácido nucleico que sea homóloga en al menos el 96%, 97%, 98% o 99% a la secuencia de ADN de la SEQ ID NO:4 o a su ADN complementario o a una secuencia correspondiente de RNA.

35 La expresión del gen exógeno genera una condición de estrés del RE en las células de la invención, que da como resultado todas o parte de las características de la enfermedad asociada con la expresión de esa proteína específica que ocurre dentro del sistema celular. El elemento sensor del estrés del RE se activa en respuesta al estrés del RE que es inducido por la expresión del gen exógeno. De este modo, la célula de la invención puede representar un sistema modelo de cualquier enfermedad o trastorno particular relacionado con el estrés del RE dependiendo del

40 gen exógeno que se exprese.

Esta célula permite la identificación selectiva de compuestos con una posible aplicación terapéutica. La expresión del gen exógeno (la proteína de la enfermedad) puede lograrse mediante la clonación del ADNc deseado en un vector apropiado utilizando la tecnología convencional de ADN recombinante, seguida de la introducción en el sistema celular modificado.

45 Las células de acuerdo con la invención pueden comprender además al menos un promotor. El promotor puede estar ligado operablemente al gen exógeno que codifica una proteína que induce el estrés del RE. El promotor puede ser constitutivo, inducible y/o específico para la expresión en una célula de la invención. Preferentemente, el promotor dirige la expresión del gen exógeno que codifica una proteína que induce el estrés del RE. En una realización, el promotor es un promotor gal inducible.

50 El estrés del RE se refiere a un desequilibrio entre la demanda que la expresión de proteínas produce en el RE y la capacidad de plegamiento real del RE para satisfacer esa demanda. Una respuesta que contrarresta el estrés del RE se denomina "respuesta a proteínas desplegadas" (UPR).

El segundo aspecto de la invención proporciona un método de cribado de un agente candidato por su capacidad para modular el estrés del RE que comprende los siguientes pasos:

- a) poner en contacto una célula del primer aspecto de la invención con un agente candidato y
- b) determinar el efecto del agente candidato en el nivel de expresión del elemento indicador.

En una realización, el cribado incluye el gen exógeno a la célula que se expresa.

5 La determinación del efecto del agente candidato en el nivel de expresión del elemento indicador puede llevarse a cabo, por ejemplo, mediante la comparación de la expresión del elemento indicador de la célula que se ha puesto en contacto con el agente candidato con la expresión de un elemento indicador en una segunda célula del primer aspecto de la invención, que no se ha puesto en contacto con el agente candidato, y donde también se expresa el gen exógeno de la segunda célula. De manera alternativa, la expresión del elemento indicador de la célula que se ha puesto en contacto con el agente candidato podría compararse con la expresión de un elemento indicador en una  
10 célula que se ha puesto en contacto con un agente cuyo efecto es conocido.

Un agente candidato es cualquier sustancia que se va a evaluar para determinar cualquier capacidad de aumentar o disminuir el estrés del RE en una célula de la invención. Estos agentes candidato incluyen compuestos conocidos o sin identificar aislados a partir de microorganismos, animales, plantas o cualquier otro organismo vivo que se use para extraer posibles agentes moduladores eficaces. Un agente candidato puede ser una molécula de bajo peso molecular, incluidas moléculas naturales o sintéticas, incluidos peptidomiméticos, péptidos o polipéptidos o fragmentos de estos, incluidos péptidos de unión o polipéptidos, anticuerpos o fragmentos de estos, ribozimas y ácidos nucleicos, incluidos ADN o ARN monocatenario o bicatenario, una modificación o derivado de estos, por ejemplo oligonucleótidos no codificantes, aptámeros, ARNip y ribozimas.  
15

Un candidato agente puede ser parte de una colección que se va a cribar, por ejemplo, una colección de compuestos químicos, una colección de productos naturales (incluidos compuestos no identificados aislados a partir de microorganismos, animales, plantas o cualquier otro organismo vivo que se usa para extraer posibles agentes moduladores eficaces), una colección de expresión en fagos, una colección de ADNc o una colección de ARNip.  
20

La cuantificación de la expresión del elemento indicador puede llevarse a cabo utilizando espectrofotometría, fluorimetría, luminiscencia, PCR cuantitativa con transcripción inversa, transferencia de tipo Northern, transferencia de tipo Western o cualquier otro método de detección conocido por un experto.  
25

La modulación del estrés del RE se refleja en un incremento o disminución de la expresión/actividad de un elemento indicador. La modulación del estrés del RE se puede representar mediante una disminución en la expresión del elemento indicador que esté causada por una disminución del estrés del RE. Un agente candidato que disminuya el estrés del RE puede tener un potencial directo para el tratamiento de trastornos o enfermedades asociados al estrés del RE.  
30

De manera alternativa, la modulación del estrés del RE puede representarse por un aumento en la expresión del elemento indicador que está causada por un aumento en el estrés del RE. Un agente candidato que aumente el estrés del RE puede utilizarse en el tratamiento de enfermedades infecciosas, tales como infecciones fúngicas, infecciones bacterianas y/u otras infecciones parasitarias siempre que el agente aumente el estrés del RE en el organismo causante de la enfermedad y no en el hospedador. Un agente candidato que aumente el estrés del RE también puede tener un potencial indirecto para el tratamiento de trastornos o enfermedades asociados al estrés del RE. Por ejemplo, un agente candidato de ARNip que cause un aumento en el estrés del RE se puede utilizar para identificar un gen que desempeñe una cierta función en la ruta de la enfermedad asociada al estrés del RE representada en la célula y, por tanto, podrá identificar una diana para otros agentes candidatos y/o cribados.  
35

Una vez que se ha identificado un agente candidato como modulador del estrés del RE, la especificidad del modulador respecto a una afección o particular que induce el estrés (es decir, la enfermedad/trastorno que se asocia con el gen exógeno que codifica la proteína que induce el estrés del RE) se hará evidente por comparación del efecto del mismo compuesto en una afección de inducción química general del estrés del RE (p. ej., tratamiento con tunicamicina o thapsigargina).  
40

De hecho, puede ser importante el poder excluir compuestos que actúen como moduladores generales del estrés del RE, ya que pueden interferir potencialmente con la fisiología normal de la célula y por tanto puede que no sean los mejores candidatos para aplicaciones terapéuticas.  
45

Como se usa en la presente, "poner en contacto" la célula con un compuesto se refiere a exponer, incubar, tocar, asociar o hacer el compuesto accesible a la célula.

50 Los métodos de cribado de la invención proporcionan un sistema para medir la toxicidad en forma de estrés del RE y, por tanto, no solo seleccionan agentes que reducen el estrés del RE. El estrés del RE es representativo de una disfunción celular, tal como la formación de agregados, la regulación transcripcional alterada, la disfunción

mitocondrial y la deficiencia del sistema ubiquitina-proteasoma, causada por enfermedades conformacionales proteicas. La incubación de la célula con un agente candidato que module el estrés del RE debería aliviar la disfunción celular y, en consecuencia, provocar una reducción medible del estrés del RE. Los agentes candidato pueden actuar en cualquier punto a lo largo de la ruta de la disfunción de la proteína mutante, bien antes, después o en un punto en el que se produce el estrés del RE. La medida del estrés del RE es un punto de control de la disfunción celular y refleja el estado general de la célula tras la expresión de una proteína que causa una enfermedad específica junto con el tratamiento con un agente candidato.

Una de las ventajas de los métodos de cribado de la invención es que, como se ha discutido anteriormente, mide la toxicidad en forma de estrés del RE. Este tipo de cribado tiene la ventaja de seleccionar ambas para compuestos que interaccionan con la proteína expresada por el gen exógeno también mediante dianas que actúan antes o después. Además la simplicidad del cribado significa que puede llevarse a cabo de una manera relativamente económica y rápida.

La utilización de una célula de levadura para el cribado significa que se puede generar una línea celular de mamíferos, por ejemplo, una línea celular humana, que puede expresar el mismo gen exógeno que la célula de la invención y esto puede utilizarse para verificar compuestos candidato obtenidos como resultado del cribado que utiliza la célula de levadura.

La eficacia de los compuestos candidato puede determinarse mediante procedimientos farmacéuticos estándar en esta plataforma de mamíferos de estados de estrés del RE, p. ej., para determinar la LD<sub>50</sub> (la dosis que es letal para el 50% de la población) y la ED<sub>50</sub> (la dosis que es terapéuticamente eficaz para el 50% de la población). El índice terapéutico es la relación entre los efectos tóxicos y terapéuticos y puede expresarse como LD<sub>50</sub>/ED<sub>50</sub>. Se dará preferencia a los compuestos que muestren índices terapéuticos altos.

Un agente candidato seleccionado por el método de cribado puede ser un activador o un inhibidor y/o un modulador transcripcional, un modulador traduccional, un modulador de plegamiento, un modulador de la interacción proteica, un modulador de la estabilidad proteica, un modulador de la agregación o cualquier otro modulador que mejore la disfunción celular causada por la expresión del gen exógeno que codifica una proteína que induce el estrés del RE. Los agentes candidato identificados por un método de cribado de la invención pueden tener un uso potencial en medicina, biotecnología, veterinaria, agricultura, industria y cualquier otro campo donde es relevante la aplicación de moduladores del estrés del RE.

El agente candidato identificado por el método de cribado de la invención puede utilizarse en medicina, por ejemplo, utilizarse en el tratamiento de trastornos o enfermedades relacionados con el estrés del RE. Un trastorno o enfermedad relacionado con el estrés del RE es un trastorno o enfermedad causado por niveles de estrés del RE o al que los niveles de estrés del RE han contribuido. Por ejemplo, enfermedad de Alzheimer, aterosclerosis, amiloidosis atrial, isquemia cerebral, fibrosis quística, diabetes mellitus, enfermedad de Alzheimer familiar, polineuropatía amiloide familiar I, polineuropatía amiloide familiar III, esclerosis lateral amiotrófica familiar (ELAF), hipercolesterolemia familiar, amiloidosis sistémica hereditaria finlandesa, demencias frontotemporales, gangliosidosis GM1, amiloidosis relacionada con la hemodiálisis, amiloidosis relacionada con la hemodiálisis, angiopatía amiloide cerebral hereditaria, amiloidosis sistémica no neuropática hereditaria, amiloidosis renal hereditaria, tirosinemia hereditaria del tipo I, enfermedad de Huntington, amiloidosis de la cadena ligera de la inmunoglobulina, inflamación, amiloidosis localizada en el sitio de inyección, carcinoma medular de la tiroides, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Pelizaeus-Merzbacher, amiloidosis sistémica primaria, amiloidosis sistémica secundaria, amiloidosis sistémica senil, anemia drepanocítica, tumores sólidos, atrofia muscular bulbar y espinal, ataxias espinocerebelosas, encefalopatía espongiiforme, miositis con cuerpos de inclusión esporádica, diabetes de tipo II, infecciones víricas, síndrome de Wolcott-Rallison, síndrome de Wolfram o deficiencia de Z alfa 1-antitripsina.

Se describe un método para tratar los trastornos o enfermedades relacionados con el estrés del RE en un sujeto que comprende el paso de administrar al sujeto un agente candidato identificado por el método de cribado de la invención. El sujeto necesita un tratamiento de este tipo o podría beneficiarse de un tratamiento de este tipo.

Al sujeto se le puede administrar más de un agente candidato identificado por el método de la invención. Los agentes candidato pueden administrarse de manera simultánea, separada o secuencial.

El término "tratamiento" se usa en la presente para referirse a cualquier régimen que puede beneficiar a un animal humano o no humano que necesite de un tratamiento de este tipo o que podría beneficiarse de un tratamiento de este tipo. Puede ser un tratamiento respecto a una condición que ya existe o puede ser profiláctico (tratamiento preventivo). El tratamiento puede incluir efectos curativos, paliativos o profilácticos.

Más específicamente, la referencia en la presente a las expresiones tratamiento "terapéutico" y "profiláctico" se ha de considerar en su contexto más amplio. El término "terapéutico" no implica necesariamente que se trate al sujeto

hasta su recuperación total. De manera similar, el término “profiláctico” no significa necesariamente que el sujeto no contraerá finalmente una enfermedad.

En consecuencia, el tratamiento profiláctico y terapéutico incluye el alivio de los síntomas de una afección particular o la prevención o la reducción del riesgo de desarrollar una afección particular. El término “profiláctico” puede considerarse como reductor de la gravedad o la afección de una condición particular. “Terapéutico” también puede reducir la gravedad de una condición existente.

Se administra una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente candidato identificado mediante el método de cribado de la invención. La expresión “cantidad terapéuticamente eficaz” tal como se usa en la presente significa una cantidad capaz de reducir o tratar un trastorno o enfermedad asociado al estrés del RE.

El agente candidato identificado mediante el método de cribado de la invención puede administrarse a un paciente que necesite de tratamiento a través de cualquier vía adecuada. La dosis precisa dependerá de varios factores, incluida la naturaleza precisa de la forma del agente candidato identificado por el método de cribado de la invención que se ha de administrar.

La presente invención es igualmente aplicable a medicina veterinaria y humana.

La vía de administración puede incluir: vía parenteral (incluida la subcutánea, intramuscular, intravenosa, por medio de, por ejemplo, un parche de goteo) algunas vías de administración más adecuadas incluyen (sin carácter limitante) la administración oral (incluida bucal y sublingual), rectal, nasal, tópica, por infusión, vaginal, intradérmica, intraperitoneal, intracraneal, intratecal y epidural o administración por vía oral o por inhalación nasal, por medio, por ejemplo, de un nebulizador o inhalador, o mediante un implante.

El agente candidato identificado por el método de cribado de la invención se puede suministrar en forma de composición inyectable, se administra oralmente o se administra a los pulmones como un aerosol a través de inhalación nasal u oral.

Para la administración por vía de inhalación nasal u oral, preferentemente, el agente candidato identificado mediante el método de cribado de la invención se presentará en una formulación farmacéutica adecuada y se podrá suministrar utilizando una forma mecánica incluido, pero sin carácter restrictivo, un dispositivo nebulizador o inhalador.

Además, cuando se usan las vías de inhalación nasal u oral, se puede usar la administración SPAG (generador de un aerosol de partículas pequeñas).

Para inyección intravenosa, el agente candidato identificado mediante el método de cribado de la invención se presentará en la forma de una solución acuosa aceptable para administración parenteral, que esté exenta de pirógenos y tenga un pH, isotonicidad y estabilidad adecuados. Aquellos expertos en la técnica están capacitados para preparar soluciones adecuadas utilizando, por ejemplo, vehículos isotónicos tales como cloruro sódico para inyección, inyección de Ringer, inyección de Ringer lactato. Se pueden incluir conservantes, estabilizadores, tampones, antioxidantes y/u otros aditivos, según sea necesario.

Un agente candidato identificado mediante el método de cribado de la invención para la administración oral puede presentarse en forma líquida, de comprimido, cápsula o polvo. Un comprimido puede comprender un portador sólido tal como gelatina. Las composiciones líquidas generalmente comprenden un portador líquido tal como agua, petróleo, aceites vegetales o animales, aceite mineral o aceite sintético. Puede incluirse solución salina fisiológica, dextrosa u otra solución de sacáridos o glicoles tales como etilenglicol, propilenglicol o polietilenglicol.

El agente candidato también se puede administrar a través de microesferas, liposomas, otros sistema de suministro de micropartículas o formulaciones de liberación sostenida situados en ciertos tejidos, incluida la sangre. Los ejemplos adecuados de portadores de liberación sostenida incluyen matrices poliméricas semipermeables en forma de artículos compartidos, p. ej., supositorios o microcápsulas. Las matrices de liberación sostenida microcapsuladas o implantables incluyen polilactidas (US 3,773,919; EP-A-0058481) copolímeros de ácido L-glutámico y gamma L-glutamato de etilo (Sidman et al., *Biopolymers* 22(1):547-556, 1985), poli(2-hidroxietilmetacrilato) o acetato de etileno y vinilo (Langer et al., *J. Biomed. Mater. Res.* 15: 167-277, 1981 y Langer, *Chem. Tech.* 12:98-105, 1982).

Los ejemplos de las técnicas y protocolos mencionados anteriormente y otras técnicas y protocolos que pueden usarse de acuerdo con la invención pueden encontrarse en los libros Remington's Pharmaceutical Sciences, 18.<sup>a</sup> edición, Gennaro, A.R., Lippincott Williams y Wilkins; 20.<sup>a</sup> edición (15 de diciembre de 2000) ISBN 0-912734-04-3 y Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems; Ansel, H. C. et al. 7.<sup>a</sup> edición ISBN 0-683305-72-7, cuyo contenido se incorpora en su totalidad en la presente por referencia.



5 La cantidad real administrada, la velocidad y evolución temporal de la administración dependerán de la naturaleza y gravedad de lo que se trata. La prescripción del tratamiento, p. ej., decisiones sobre la posología, etc., está, en última instancia, bajo la responsabilidad y a la discreción de los médicos de cabecera y otros médicos y, normalmente, tiene en cuenta el trastorno que se ha de tratar, el estado del paciente individual, el lugar de suministro, el método de administración y otros factores conocidos por los médicos.

Los médicos pueden determinar la dosis óptima basándose en varios parámetros incluidos, por ejemplo, edad, sexo, peso, gravedad de la afección que se trata, el principio activo que se administra y la vía de administración.

10 Un aspecto adicional de la invención proporciona un método para producir una célula de acuerdo con el primer aspecto de la invención que comprende la introducción en la célula de una secuencia nucleotídica que codifica un elemento sensor del estrés del RE, una secuencia nucleotídica que codifica un elemento indicador y una secuencia nucleotídica que codifica un gen exógeno. Por tanto, la célula es una célula transformada. En una realización, se introducen en la célula la secuencia nucleotídica que codifica un elemento sensor del estrés del RE y un nucleótido que codifica un elemento indicador en el mismo vector y la secuencia nucleotídica que codifica un gen exógeno se introduce en la célula en un vector diferente. En una realización adicional, todas las secuencias nucleotídicas se introducen en la célula en el mismo vector.

Los vectores que portan las moléculas de ácido nucleico deseadas pueden integrarse en el genoma de la célula receptora, bien a través de recombinación homóloga en un locus genómico específico o bien a través de recombinación no homóloga en cualquier sitio del genoma de la célula receptora.

20 La célula transformada puede validarse mediante el cultivo de la célula en presencia de la proteína que codifica el gen exógeno. La expresión del elemento indicador señala una transformación exitosa.

La invención también proporciona un vector que comprende una secuencia nucleotídica que codifica un elemento de estrés del RE, una secuencia nucleotídica que codifica un elemento indicador y una secuencia nucleotídica que codifica un gen que induce el estrés del RE.

25 Las características preferidas para el segundo y posteriores aspectos de la invención son tal como las del primer aspecto de la invención mutatis mutandis.

30 A lo largo de toda la memoria descriptiva, a menos que el contexto requiera lo contrario, se sobreentenderá que los términos “comprender” o “incluir”, o variaciones tales como “comprende” o “que comprende”, “incluye” o “que incluye” implican la inclusión de un número entero o un grupo de números enteros indicados, pero no la exclusión de cualquier otro número entero o grupo de números enteros. En cambio, la expresión “que consiste en” significa la inclusión de un número entero o un grupo de números indicados y la exclusión de cualquier otro número entero o grupo de números enteros. Se pretende que cuando se use la expresión “que comprende” también sea posible usar la expresión “que consiste en”.

La presente invención se describe haciendo referencia a los dibujos, en los cuales:

La Figura 1 muestra un fragmento de 141 pb del promotor de levadura KAR2 (SEQ ID NO:1).

35 La Figura 2 muestra un fragmento de 444 pb que contiene la región codificante del gen humano TTR (SEQ ID NO:2).

La Figura 3 muestra la región codificante de la proteína Tau humana (isoforma 3) (SEQ ID NO:3).

La Figura 4 muestra la región codificante del gen CFTR humano de tipo natural (SEQ ID NO:4).

40 La Figura 5 muestra el crecimiento y la señal de fluorescencia de las células DGI-TAUP301L en medio mínimo con un 2% de galactosa, con o sin un 2% de DMSO.

La Figura 6 muestra el crecimiento y la señal de fluorescencia de las células DGI-TAUP301L en medio mínimo con un 2% de galactosa, con o sin colina 0,4 M.

La Figura 7 muestra el crecimiento y la señal de fluorescencia de las células DGI-TAUP301L en medio mínimo con un 2% de galactosa, con o sin salubrial 100 µM.

45 La Figura 8 muestra el crecimiento y la señal de fluorescencia de las células DGI-TAUP301L en medio mínimo con un 2% de galactosa, con o sin DGI-T2008A 10 µM.

La Figura 9 muestra la acción del compuesto nuevo DGI-T2008A sobre la señal de estrés del RE en las células DGI-TAUP301L en comparación con los compuestos control.

La Figura 10 muestra el crecimiento y la señal de fluorescencia de las células DGI-TTR V30M en medio mínimo con un 2% de galactosa, con o sin DGI-TT2008A 10 µM.

5 En las figuras, donde se usa, el término “sin” indica “exento de”.

La invención se describirá a continuación en más detalle por referencia a los siguientes Ejemplos, los cuales se proporcionan únicamente a efectos ilustrativos y no han de interpretarse como limitantes de la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1

10 Cepa de levadura y transformación

En este estudio, se ha utilizado la cepa de levadura Y00000 (MATa; his3Δ1; leu2 Δ0; met15 Δ 0; ura3 Δ0) como célula receptora de todos los constructos y para el aislamiento del ADN cromosómico de levaduras. La transformación de las células de levadura se llevó a cabo de acuerdo con el método del acetato de litio (Gietz, D., A. St. Jean, R.A. Woods y R.H. Schiestl. 1992, Nucleic Acid Res. 20: 1425).

15 Construcción del plásmido indicador sensor del RE

Se amplificó por PCR un fragmento de 141 pb del promotor de levadura KAR2 (SEQ ID NO:1). El fragmento amplificado abarca desde el nucleótido -136 hasta el +5 (en referencia al sitio de iniciación de la transcripción, +1) y comprende un UPRE y dos secuencias TATA putativas. Los cebadores utilizados para la amplificación por PCR contenían sitios de restricción en las extremidades, de modo que el fragmento de ADN amplificado se digirió y clonó en el sitio de clonación múltiple del vector pGRU2, adyacente en dirección 5' a la secuencia que codifica la YEGFP.

20 En la levadura *Saccharomyces cerevisiae* la proteína Bip es el producto del gen KAR2. La inducción del estrés del RE por la presencia de una UPRE induce la producción de Bip a través de la unión de la proteína HAC1 al UPRE presente en el promotor del gen KAR2 y que actúa en cis. La clonación del UPRE de KAR2 y el promotor basal que está en dirección 5' respecto a la secuencia que codifica la YEGFP permite la producción de una señal fluorescente verde como una medida del estrés del RE.

25 Generación de cepa de levadura indicadora del estrés del RE

La cepa Y00000 se transformó con el plásmido sensor del estrés del RE y la validación de este sensor se llevó a cabo mediante el cultivo de la cepa transformada en presencia de tunicamicina. La inducción del estrés del RE se cuantificó mediante la medida de la señal de fluorescencia verde en comparación con las mismas células cultivadas en ausencia de tunicamicina. La cepa generada se denominó DISAGGREGATOR I (DGI).

30 Clonación de mutantes de la Tau humana

La secuencia codificante de la proteína Tau humana (SEQ ID NO:3) se obtuvo del consorcio IMAGE y se subclonó en el sitio de clonación múltiple de un vector episomal de levadura, bajo el control del promotor Gal1. Las Tau mutantes (P301L, P301S, ΔK280 y tetramutante) se generaron por mutagénesis dirigida. Tras la transformación de estos constructos, se indujo la expresión de las isoformas de la proteína Tau mediante el cultivo de las células en galactosa al 2%. La detección específica de la proteína Tau y la determinación del peso molecular correcto se verificó por transferencia de tipo Western mediante el empleo de un anticuerpo policlonal contra la proteína Tau.

35 Generación de la plataforma de levaduras para la identificación de moduladores del estrés del RE inducido por la expresión de la proteína Tau mutante

40 La cepa de levadura indicadora del estrés del RE se transformó con los plásmidos episomales que contenían las secuencias Tau de tipo natural y mutantes bajo el control del promotor Gal1.

Las cepas generadas se denominaron DISAGGREGATOR I – TAUWT (DGI-TAUWT), DISAGGREGATOR I – TAUP301L (DGI-TAUP301 L), DISAGGREGATOR 1 – TAUP301S (DGI-TAUP301S), DISAGGREGATOR I – TAUΔK280 (DGI-TAUΔK280) y DISAGGREGATOR I – TAUTETRA (DGI-TAUTETRA). La inducción del estrés del RE tras la expresión de las proteínas Tau se validó mediante el cultivo de las células en galactosa al 2% y mediante la determinación del aumento de la señal de fluorescencia verde.

## Validación del ensayo de cribado

El cribado se llevó a cabo con una célula de levadura DGI-TAUP301L que expresaba la proteína mutante TAU-P301L bajo el control del promotor GAL1 y que contenía el plásmido indicador sensor del estrés del RE con GFP como indicador, descrito anteriormente en la sección “Construcción del plásmido indicador sensor del RE”. La expresión de TAUP301L resultó en una respuesta citotóxica que desencadena el estrés del RE y por tanto la fluorescencia por parte del indicador. La señal fluorescente resultante se normalizó respecto a la densidad celular y la fluorescencia normalizada se utilizó como una medida directa del nivel de estrés del RE en las células.

Una colección comercial que contenía 50 080 moléculas de bajo peso molecular se cribó junto con 5 moléculas dipeptídicas procedentes de una colaboración académica y 208 extractos procedentes de una colección de extractos naturales patentada. Los compuestos activos, con el potencial de modular los efectos perjudiciales de la expresión de la TAU-P301L, se identificaron por su capacidad de disminuir la fluorescencia normalizada sin influenciar el crecimiento. El crecimiento se determinó mediante la medición de la densidad óptica (DO) de un cultivo.

Se dispensaron las células DGI-TAUP301L en placas de 96 pocillos en medio mínimo que contenía un 2% de galactosa para expresar totalmente la proteína mutante, junto con el compuesto candidato a 10  $\mu$ M. Todos los pasos de manipulación de líquidos se llevaron a cabo utilizando una estación de trabajo automática Janus (Perkin Elmer). Las placas se incubaron durante 2 días a 30 °C en agitación utilizando un incubador automático Liconic STX40. Se monitorizaron crecimiento y fluorescencia con un lector de microplacas Victor 3V (PE). Se cultivaron células en paralelo, en las mismas condiciones pero sin compuestos o con compuestos control diferentes.

Se eligieron como controles compuestos que ya habían demostrado ser capaces de aliviar el estrés del RE. En la actualidad no hay disponibles moléculas que sean activas directamente contra la proteína TAU-P301 L pero ya están presentes en el mercado inhibidores del estrés del RE, tales como las chaperonas químicas. Las chaperonas químicas (p. ej., colina o DMSO) mejoran la capacidad de adaptación del RE y su adición al medio de cultivo da como resultado una respuesta al estrés del RE atenuada. Otro compuesto usado normalmente es el salubrinal, identificado como un inhibidor de fosfatasa que actúan sobre la subunidad del factor de iniciación traduccional eucariótico 2 (eIF2). El mantenimiento de la fosforilación proteica resultante da como resultado una protección mejorada frente a los efectos adversos del estrés del RE, principalmente debido a que la fosforilación de eIF2 provoca una parada en la síntesis proteica. Estos compuestos se usaron para validar la respuesta celular del cribado y para estimar la actividad de los compuestos cribados.

## Ejemplo 2.1: Efecto de DMSO

Se precultivaron las células DGI-TAUP301 L en una mezcla de galactosa al 2% hasta que llegaron a la fase exponencial temprana (DO=1-2). Se lavaron las células por triplicado con agua y a continuación se resuspendieron a una DO de 0,1 en medio selectivo que contenía galactosa al 2%, con el fin de activar completamente la expresión de la TAU-P301L. Se dispensaron las células en placas de 96 pocillos y se añadieron 4  $\mu$ L de DMSO a los pocillos deseados, hasta llegar a una concentración final del 2%. En paralelo, no se añadió DMSO a los pocillos control. Se monitorizaron crecimiento y fluorescencia durante 2 días a 30 °C en agitación. La Figura 5 muestra los resultados.

La cantidad de DMSO añadida a los pocillos (es decir, 4  $\mu$ L por pocillo) se basó en la cantidad usada normalmente en la bibliografía para conseguir un alivio del estrés del RE.

## Ejemplo 2.2: Efecto de la colina

Se precultivaron las células DGI-TAUP301L en una mezcla de galactosa al 2% hasta que llegaron a la fase exponencial temprana (DO=1-2). Se lavaron las células una vez con agua y a continuación se resuspendieron a una DO de 0,1 en medio selectivo que contenía galactosa al 2%, con el fin de activar completamente la expresión de la TAU-P301L. Se dispensaron las células en placas de 96 pocillos y se añadió colina a los pocillos deseados, hasta llegar a una concentración final de 0,4 M. En paralelo, no se añadió colina a los pocillos control. Se monitorizaron crecimiento y fluorescencia durante 2 días a 30 °C en agitación. La Figura 6 muestra los resultados.

La cantidad de colina añadida a los pocillos (es decir, hasta llegar a una concentración final de 0,4 M por pocillo) se basó en la cantidad usada normalmente en la bibliografía para conseguir un alivio del estrés del RE.

## Ejemplo 2.3: Efecto del salubrinal

Se precultivaron las células DGI-TAUP301 L en una mezcla de galactosa al 2% hasta que llegaron a la fase exponencial temprana (DO=1-2). Se lavaron las células una vez con agua y a continuación se resuspendieron a una DO de 0,1 en medio selectivo que contenía galactosa al 2%, con el fin de activar completamente la expresión de la TAU-P301L. Se dispensaron las células en placas de 96 pocillos y se añadió salubrinal a los pocillos deseados,

hasta llegar a una concentración final de 100  $\mu\text{M}$ . En paralelo, no se añadió salubrinal a los pocillos control. Se monitorizaron crecimiento y fluorescencia durante 2 días a 30 °C en agitación. La figura 7 muestra los resultados.

La cantidad de salubrinal añadida a los pocillos (es decir, hasta llegar a una concentración final de 100  $\mu\text{M}$  por pocillo) se basó en la cantidad usada normalmente en la bibliografía para conseguir un alivio del estrés del RE.

5 Ejemplo 2.4: Efecto del nuevo compuesto DGI-T2008A

Se precultivaron las células DGI-TAUP301 L en una mezcla de galactosa al 2% hasta que llegaron a la fase exponencial temprana (DO=1-2). Se lavaron las células una vez con agua y a continuación se resuspendieron a una DO de 0,1 en medio selectivo que contenía galactosa al 2%, con el fin de activar completamente la expresión de la TAU-P301L. Se dispensaron las células en placas de 96 pocillos y se añadió el compuesto DGI-T2008A a los pocillos deseados, hasta llegar a una concentración final de 10  $\mu\text{M}$ . En paralelo, no se añadió DGI-T2008A a los pocillos control. Se monitorizaron crecimiento y fluorescencia durante 2 días a 30 °C en agitación. La Figura 8 muestra los resultados.

El compuesto DGI-T2008A fue capaz de reducir la señal del estrés del RE casi en un 50% a una concentración de 10  $\mu\text{M}$  (Figuras 8 y 9). Tal reducción solo se consiguió mediante la utilización de una concentración de salubrinal diez veces superior (100  $\mu\text{M}$ ) (véase la Figura 9). La colina y el DMSO dieron como resultado tan solo una reducción del estrés del RE de 35% incluso cuando se utilizaron a una concentración mucho mayor que la del compuesto evaluado. Estos resultados ilustran la solidez de la presente invención para el cribado de compuestos que alivian el estrés del RE.

20 Generación de líneas celulares estables de mamíferos que expresan la Tau de tipo natural y mutante y evaluación de la modulación del estrés del RE por parte de los compuestos candidato

Se cultivaron células de neuroblastoma humano SH-SY5Y (ATCC) en DMEM suplementado con un 10% de suero bovino fetal. Se subclonaron las secuencias codificantes de la Tau humana (tipo natural y mutantes) en el vector de expresión de mamíferos pcDNA3, que se linearizó y utilizó para transfectar células SH-SY5Y. Después del cultivo en medio selectivo G418, se obtuvieron lotes de células resistentes. La expresión de la proteína Tau y la determinación del peso molecular correcto se verificaron en cada lote mediante una transferencia de tipo Western utilizando un anticuerpo policlonal contra Tau. La inducción del estrés del RE tras la expresión de Tau se verificó por la detección de un aumento en la producción de los marcadores proteicos del estrés del RE Bip y ATF4 mediante transferencia de tipo Western. Como control, se generó un lote de células transfectadas con el vector vacío y se utilizó para todos los experimentos posteriores. Para la validación de los compuestos seleccionados tras el cribado con DGI-TAUP301L, se incubarán células SH-SY5Y que expresen de manera estable Tau P301L en presencia y ausencia de los compuestos candidato y se evaluará la modulación del estrés del RE por el aumento/disminución en el nivel proteico de los marcadores del estrés del RE.

Ejemplo 2

Cepa de levadura y transformación

35 En este estudio, se ha utilizado la cepa de levadura Y00000 (MATa; his3 $\Delta$ 1; leu2  $\Delta$ 0; met15  $\Delta$  0, ura3  $\Delta$ 0) como célula receptora de todos los constructos y para el aislamiento del ADN cromosómico de levadura. La transformación de las células de levadura se llevó a cabo de acuerdo con el método del acetato de litio (Gietz, D., A. St. Jean, R.A. Woods y R.H. Schiestl. 1992, Nucleic Acids Res. 20:1425).

Construcción del plásmido indicador sensor del RE

40 Se amplificó por PCR un fragmento de 141 pb del promotor de levadura KAR2 (SEQ ID NO:1). El fragmento amplificado abarca desde el nucleótido -136 hasta el + 5 (en referencia al sitio de iniciación de la transcripción +1) y comprende un UPRE y dos secuencias TATA putativas. Los cebadores utilizados para la amplificación por PCR contenían sitios de restricción en las extremidades, de modo que el fragmento de ADN amplificado se digirió y se clonó en el sitio de clonación múltiple del vector pGRU2, adyacente en dirección 5' a la secuencia que codifica la YEGFP (proteína fluorescente verde mejorada de levadura).

50 En la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, la proteína Bip es el producto del gen KAR2. La inducción del estrés del RE por cualquiera de las afecciones mencionadas anteriormente induce la producción de Bip a través de la unión de la proteína HAC1 al UPRE presente en el promotor del gen KAR2 y que actúa en cis. La clonación del UPRE de KAR2 y el promotor basal que está en dirección 5' respecto de la secuencia que codifica YEGFP permite la producción de una señal de fluorescencia verde como una medida del estrés del RE.

Generación de la cepa de levadura indicadora del estrés del RE

5 La cepa Y00000 se transformó con el plásmido sensor del estrés del RE y la validación de este sensor se llevó a cabo mediante el cultivo de la cepa transformada en presencia de tunicamicina. La inducción del estrés del RE se cuantificó mediante la medición de la señal de fluorescencia verde en comparación con las mismas células cultivadas en ausencia de tunicamicina. La cepa generada se denominó DISAGGREGATOR I (DGI).

Clonación de los mutantes de TTR humana

10 Se amplificó por PCR un fragmento de 444 pb que contenía la región codificante del gen humano TTR (SEQ ID 2) utilizando ADNc de células humanas HepG2 como molde. Los cebadores utilizados para la amplificación por PCR contenían sitios de restricción en las extremidades de modo que el fragmento de ADN amplificado se digirió y clonó en el sitio de clonación múltiple de un vector episomal de levadura, bajo el control del promotor GAL1. Los mutantes de TTR (V30M y L55P) se generaron por mutagénesis dirigida. Tras la transformación de los constructos, la expresión de los mutantes de TTR se indujo mediante el cultivo de las células en galactosa al 2%. La detección específica de la proteína TTR y la determinación del peso molecular correcto se verificaron por transferencia de tipo Western utilizando un anticuerpo policlonal contra TTR.

15 Generación de la plataforma de levadura para la identificación de moduladores del estrés del RE inducido por la expresión de TTR mutante

20 Se utilizaron los plásmidos episomales que contenían secuencias de TTR de tipo natural y mutantes bajo el control del promotor Gal1 para transformar la cepa de levadura indicadora del estrés del RE. La inducción del estrés del RE tras la expresión de las isoformas de TTR se validó mediante el cultivo de las células en galactosa al 2% y la determinación del aumento de la señal de fluorescencia verde.

Las cepas generadas se denominaron DISAGGREGATOR I – TTRWT (DGI-TTRWT), DISAGGREGATOR I – TTRV30M (DGI-TTRV30M) y DISAGGREGATOR I – TTRL55P (DGI-TTRL55P).

Validación del ensayo de cribado

25 El cribado se llevó a cabo utilizando la célula de levadura DGI-TTR V30M que expresaba la proteína mutante TTR V30M bajo el control del promotor GAL1 y que contenía el plásmido indicador sensor del estrés del RE con GFP como indicador, tal como se describe anteriormente en la sección “Construcción del plásmido indicador sensor del RE”. La expresión de TTR V30M da como resultado una respuesta citotóxica que desencadena el estrés del RE y, por tanto, la fluorescencia por parte del indicador. La señal fluorescente resultante se normaliza respecto a la densidad celular y la fluorescencia normalizada se usa como una medida directa del nivel de estrés del RE en las células. Los compuestos activos, con el potencial de modular los efectos perjudiciales de la expresión de TTR V30M, se identifican por su capacidad de disminuir la fluorescencia normalizada sin influenciar el crecimiento.

35 Se cultivaron células DGI-TTR V30M en medio mínimo que contenía galactosa al 2% para expresar completamente la proteína mutante, junto con el compuesto candidato a 10 µM. Todos los pasos de manipulación de líquidos se llevaron a cabo utilizando una estación de trabajo automática Janus (Perkin Elmer). Las placas se incubaron durante 2 días a 30 °C en agitación utilizando un incubador automático Liconic STX40. Se monitorizaron crecimiento y fluorescencia con el lector de microplacas Victor 3V (PE). Se cultivaron células en paralelo en las mismas condiciones sin los compuestos candidato.

A partir de una colección de moléculas de bajo peso molecular, se descubrió que el compuesto DGI-TT2008A reducía el estrés del RE inducido por la proteína mutante TTR V30M (Figura 10).

40 El compuesto DGI-TT2008A se mostró capaz de reducir la señal del estrés del RE en casi un 25% a una concentración final de 10 µM. Estos resultados muestran la eficacia de la presente invención para el cribado del estrés del RE inducido por la proteína mutante TTR V30M. Además, estos resultados validan la versatilidad de la invención para diferentes proteínas mutantes.

45 Generación de una línea celular estable de mamíferos que expresa TTR mutante y evaluación de la modulación de estrés del RE por parte de los compuestos candidato

50 Se cultivaron células hepatocíticas humanas HepG2 (ATCC) en RPMI 1640 suplementado con un 10% de suero bovino fetal. Se subclonaron las secuencias codificantes de la TTR humana (de tipo natural y mutantes) en el vector de expresión de mamíferos pcDNA3, que se linearizó y se utilizó para transfectar células HepG2. Después del cultivo en medio selectivo G418, se obtuvieron lotes de células resistentes. La expresión de la proteína TTR y la determinación del peso molecular correcto se verificaron mediante transferencia de tipo Western utilizando un

anticuerpo policlonal contra TTR. La inducción del estrés del RE tras la expresión de TTR se verificó por la detección de un aumento en la producción de los marcadores proteicos del estrés del RE Bip y ATF4 por transferencia de tipo Western. Como control, se generó un lote de células transfectadas con el vector vacío y se utilizó para todos los experimentos posteriores. Para la validación de los compuestos seleccionados tras el cribado con DGI-TTRV30M, se incubarán células HepG2 que expresen de manera estable TTR V30M en presencia y ausencia del compuesto candidato y la modulación del estrés del RE se evaluará por el aumento/disminución en el nivel proteico de los marcadores del estrés del RE.

### Ejemplo 3

#### Cepa de levadura y transformación

En este estudio se ha utilizado la cepa de levadura Y00000 (MATa; his3 $\Delta$ 1; leu2  $\Delta$ 0; met15  $\Delta$  0; ura3  $\Delta$ 0) como célula receptora de todos los constructos y para el aislamiento del ADN cromosómico de levadura. La transformación de las células de levadura se llevó a cabo de acuerdo con el método del acetato de litio (Gietz, D., A. St. Jean, R.A. Woods y R.H. Schiestl. 1992, Nucleic Acid Res. 20: 1425).

#### Construcción del plásmido indicador sensor del RE

Se amplificó por PCR un fragmento de 141 pb del promotor de levadura KAR2 (SEQ ID NO:1). El fragmento amplificado abarca desde el nucleótido -136 hasta el +5 (en referencia al sitio de iniciación de la transcripción +1) y comprende un UPRE y dos secuencias TATA putativas. Los cebadores utilizados para la amplificación por PCR contenían sitios de restricción en las extremidades, de modo que el fragmento de ADN amplificado se digirió y clonó en el sitio de clonación múltiple del vector pGRU2, adyacente en dirección 5' a la secuencia que codifica YEGFP (proteína fluorescente verde mejorada de levadura).

En la levadura *Saccharomyces cerevisiae* la proteína Bip es el producto del gen KAR2. La inducción del estrés del RE por cualquiera de las afecciones mencionadas anteriormente induce la producción de Bip a través de la unión de la proteína HAC1 al UPRE presente en el promotor del gen KAR2 y que actúa en cis. La clonación del UPRE de KAR2 y el promotor basal que está en dirección 5' respecto de la secuencia que codifica YEGFP permite la producción de una señal de fluorescencia verde como una medida del estrés del RE.

#### Generación de la cepa de levadura indicadora del estrés del RE

La cepa Y00000 se transformó con el plásmido sensor del estrés del RE y la validación de este sensor se llevó a cabo mediante el cultivo de la cepa transformada en presencia de tunicamicina. La inducción del estrés del RE se cuantificó mediante la medición de la señal de fluorescencia verde en comparación con las mismas células cultivadas en ausencia de tunicamicina. La cepa generada se denominó DISAGGREGATOR I (DGI).

#### Clonación de los mutantes de CFTR humana

Se subclonó un fragmento de 4720 pb que contenía la región codificante del gen humano CFTR de tipo natural (SEQ ID NO:4) del vector pNUT (Tabcharani JA, Chang XB, Riordan JR, Hanrahan JW. Nature. 1991; 352 (6336):628-31) en el sitio de clonación múltiple de un vector episomal de levadura, bajo el control del promotor GAL1. Además, se subclonaron cuatro mutantes de CFTR diferentes ( $\Delta$ F508, G551D, R560T y A561E) del pNUT en el vector episomal de levadura. Después de transformar los constructos, se indujo la expresión de las isoformas de CFTR mediante el cultivo de las células en galactosa al 2%. La detección específica de la proteína CFTR y la determinación del peso molecular correcto se verificaron por transferencia de tipo Western utilizando un anticuerpo contra CFTR.

#### Generación de la plataforma de levadura para la identificación de moduladores del estrés del RE inducido por la expresión de CFTR mutante

Se utilizaron los plásmidos episomales que contenían las secuencias de tipo natural y mutantes de CFTR bajo el control del promotor Gal1 para transformar la cepa de levadura indicadora del estrés del RE. La inducción del estrés del RE tras la expresión de las proteínas CFTR se validó mediante el cultivo de las células en galactosa al 2% y la determinación del aumento de la señal de fluorescencia verde.

Las cepas generadas se denominaron DISAGGREGATOR I – CFTRWT (DGI-CFTRWT), DISAGGREGATOR I – CFTR $\Delta$ F508 (DGI-CFTR $\Delta$ F508), DISAGGREGATOR I – CFTRG551D (DGI-CFTRG551D), DISAGGREGATOR I – CFTRR560T (DGI-CFTRR560T) y DISAGGREGATOR I – CFTRA561 E (DGI-CFTRA561 E).

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> BIOALVO-Services, Investigação e Desenvolvimento em Biotecnologia S.A.

<120> Un método de cribado para compuestos que reducen el estrés del RE

<130> 5679 PCT

5 <140> P42481WO  
<141> 2008-06-06

<150> GB 0710976.2  
<151> 2007-06-07

<160> 4

10 <170> PatentIn versión 3.3

<210> 1  
<211> 141  
<212> ADN  
<213> Saccharomyces cerevisiae

15 <400> 1

```

cccgaggaac tggacagcgt gtcgaaaaag ttgctttttt atataaagga cacgaaaagg 60
gttctctgga agatataaat atggctatgt aattctaaag attaacgtgt tactgtttta 120
cttttttaa gtcCCAaga g 141

```

<210> 2  
<211> 444  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

20 <400> 2

```

atggcttctc atcgtctgct cctcctctgc cttgctggac tggattttgt gtctgaggct 60
ggccctacgg gcaccgggta atccaagtgt cctctgatgg tcaaagttct agatgctgtc 120
cgaggcagtc ctgccatcaa tgtggccgtg catgtgttca gaaaggctgc tgatgacacc 180
tgggagccat ttgcctctgg gaaaaccagt gagtctggag agctgcatgg gctcacaact 240
gaggaggaat ttgtagaagg gatatacaaa gtggaaatag acaccaaatc ttactggaag 300
gcacttggca tctccccatt ccatgagcat gcagagggtg tattcacagc caacgactcc 360
ggcccccgcc gctacaccat tgccgccctg ctgagcccct actcctattc caccacggct 420
gtcgtcacca atCCAagga atga 444

```

25 <210> 3  
<211> 1152  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 3

```

atggctgagc cccgccagga gttcgaagtg atggaagatc acgctgggac gtacgggttg 60
ggggacagga aagatcaggg gggctacacc atgcaccaag accaagaggg tgacacggac 120
gctggcctga aagctgaaga agcaggcatt ggagacaccc ccagcctgga agacgaagct 180

```

ES 2 415 729 T3

gctggtcagc tgacceaaagc tcgcatggtc agtaaaagca aagacgggac tggaaagcgat 240  
gacaaaaaag ccaagggggc tgatggtaaa acgaagatcg ccacaccgag gggagcagcc 300  
cctccaggcc agaagggcca ggccaacgcc accaggatcc cagcaaaaac cccgcccgct 360  
ccaagacac caccagctc tggatgaacct ccaaaatcag gggatcgag cggctacagc 420  
agccccggct ccccaggcac tcccggcagc cgctcccga ccccgteccct tccaacccca 480  
cccaccggg agccaagaa ggtggcagtg gtccgtactc cacccaagtc gccgtcttcc 540  
gccaagagcc gcctgcagac agccccctg cccatgccag acctgaagaa tgtcaagtcc 600  
aagatcggct cactgagaa cctgaagcac cagccgggag gcgggaaggt gcagataatt 660  
aataagaagc tggatcttag caacgtccag tccaagtgtg gctcaaagga taatatcaaa 720  
cacgtcccgg gaggcggcag tgtgcaata gtctacaac cagttgacct gagcaagggtg 780  
acctccaagt gtggctcatt aggcaacatc catcataaac caggaggtgg ccaggtggaa 840  
gtaaatctg agaagcttga cttcaaggac agagtccagt cgaagattgg gtccctggac 900  
aatatcacc acgtccctgg cggaggaaat aaaaagattg aaaccacaa gctgaccttc 960  
cgcgagaacg ccaaagccaa gacagaccac gggcgggaga tcgtgtacaa gtcgccagtg 1020  
gtgtctgggg acacgtctcc acggcatctc agcaatgtct cctccaccgg cagcatcgac 1080  
atggtagact cgccccagct cgccacgcta gctgacgagg tgtctgcctc cctggccaag 1140  
cagggtttgt ga 1152

<210> 4  
<211> 2460  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

5

<400> 4

atgcagaggt cgcctctgga aaaggccagc gttgtctcca aactttttt cagctggacc 60  
agaccaattt tgaggaaagg atacagacag cgcctggaat tgtcagacat ataccaaatc 120  
ccttctgttg attctgctga caatctatct gaaaaattgg aaagagaatg ggatagagag 180  
ctggcttcaa agaaaaatcc taaactcatt aatgcccttc gccgatgttt tttctggaga 240  
tttatgttct atggaatctt tttatattta ggggaagtca ccaagcagc acagcctctc 300  
ttactgggaa gaatcatagc ttcctatgac ccggataaca aggaggaacg ctctatcgcg 360  
atztatctag gcataggctt atgccttctc tttattgtga ggacactgct cctacaccca 420  
gccatttttg gccttcatca cattggaatg cagatgagaa tagctatggt tagtttgatt 480  
tataagaaga ctttaaagct gtcaagccgt gttctagata aaataagtat tggacaactt 540  
gttagtctcc tttccaacaa cctgaacaaa tttgatgaag gacttgcatc ggcacatttc 600  
gtgtggatcg ctcccttgca agtggcactc ctcatggggc taatctggga gttgttacag 660  
gcgtctgcct tctgtggact tggtttcctg atagtccttg ccccttttca ggctgggcta 720  
gggagaatga tgatgaagta cagagatcag agagctggga agatcagtga aagacttgtg 780



ES 2 415 729 T3

attacctcag aaatgattga aaatatccaa tctgttaagg catactgctg ggaagaagca 840  
 atggaaaaaa tgattgaaaa cttaagacaa acagaactga aactgactcg gaaggcagcc 900  
 tatgtgagat acttcaatag ctcagccttc ttcttctcag ggttctttgt ggtgttttta 960  
 tctgtgcttc cctatgcact aatcaaagga atcatcctcc ggaaaatatt caccaccatc 1020  
 tcattctgca ttgttctgcg catggcggtc actcggcaat ttccctgggc tgtacaaaca 1080  
 tggatgact ctcttggagc aataaaciaa atacaggatt tcttaciaaa gcaagaatat 1140  
 aagacattgg aatataactt aacgactaca gaagtagtga tggagaatgt aacagccttc 1200  
 tgggaggagg gatttgggga attattgag aaagcaaac aaaacaataa caatagaaaa 1260  
 acttctaata gtgatgacag cctcttcttc agtaatttct cacttcttgg tactcctgtc 1320  
 ctgaagata ttaatttcaa gatagaaaga ggacagtgtg tggcggttgc tggatccact 1380  
 ggagcaggca agacttcact tctaattggtg attatgggag aactggagcc ttcagagggg 1440  
 aaaattaagc acagtggaag aatttcattc tgttctcagt tttcttggat tatgcctggc 1500  
 accattaagc aaaatatcat ctttgggtgt tcctatgatg aatatagata cagaagcgtc 1560  
 atcaaagcat gccaaactaga agaggacatc tccaagtgtg cagagaaaga caatatagtt 1620  
 cttggagaag gtggaatcac actgagtgga ggtcaacgag caagaatttc tttagcaaga 1680  
 gcagtataca aagatgctga tttgtattta ttagactctc cttttggata cctagatggt 1740  
 ttaacagaaa aagaaatatt tgaaagctgt gtctgtaaac tgatggctaa caaaactagg 1800  
 attttgggtca cttctaaaat ggaacattta aagaaagctg acaaaatatt aattttgcat 1860  
 gaaggtagca gctattttta tgggacattt tcagaactcc aaaatctaca gccagacttt 1920  
 agctcaaac tcatgggatg tgattctttc gaccaattta gtgcagaaag aagaaattca 1980  
 atcctaactg agaccttaca ccgtttctca ttagaaggag atgctcctgt ctcttgaca 2040  
 gaacaaaaaa aacaatcttt taaacagact ggagagtgtg gggaaaaaag gaagaattct 2100  
 attctcaatc caatcaactc tatacgaaaa ttttccattg tgcaaaaagac tcccttacia 2160  
 atgaatggca tcgaagagga ttctgatgag cttttagaga gaaggctgtc cttagtacca 2220  
 gattctgagc agggagaggc gatactgcct cgcatacagc tgatcagcac tggccccacg 2280  
 cttcaggcac gaaggaggca gtctgtcctg aacctgatga cacactcagt taaccaaggt 2340  
 cagaacattc accgaaagac aacagcatcc acacgaaaag tgtcactggc ccctcaggca 2400  
 aacttgactg aactggatat atattcaaga aggttatctc aagaaactgg cttggaaata 2460

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Una célula de levadura que comprende un elemento sensor del estrés del retículo endoplasmático (RE) ligado operablemente a un elemento indicador y que comprende un gen exógeno que codifica una proteína que induce el estrés del RE, donde el elemento sensor del estrés del RE es una secuencia de ADN del elemento de respuesta a la proteína desplegada KAR2.
- 10 2. La célula tal como se reivindica en la reivindicación 1, donde el gen exógeno codifica un péptido; el factor natriurético atrial, regulador transmembrana de la fibrosis quística (CFTR), receptor insulínico, Presenilina 1 (PS1), transtiretina incluidos más de 45 mutantes, enteros o fragmentos, apolipoproteína AI, superóxido dismutasa 1 (SOD1), receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDLR), gelsolina, tau incluido el tipo natural o el mutante,  $\beta$ -galactosidasa,  $\beta$ 2-microglobulina, L2-microglobulina, cistatina c, lisozima, cadena  $\alpha$ -A del fibrinógeno, apolipoproteína AI, apolipoproteína AII, FAH, huntingtina (Htt), cadena ligera de la inmunoglobulina, insulina, calcitonina,  $\alpha$ -sinucleína incluido el tipo natural o el mutante, parkina, proteína proteolipídica 1 (PLP1), cadenas ligeras de Ig incluida la cadena entera o fragmentos, amiloide sérico A incluido el amiloide entero o un fragmento de 15 76 residuos, hemoglobina, receptor androgénico, ataxinas, proteína priónica (PrP), proteína precursora del amiloide (APP), amilina, PERK, WFS1 o alfa 1-antitripsina (AIAT).
- 20 3. La célula de la reivindicación 1 o reivindicación 2, donde la secuencia de ADN del elemento de respuesta a la proteína desplegada KAR2 es la secuencia de ácido nucleico expuesta en la SEQ ID NO:1.
- 20 4. Un método para cribar un agente candidato por su habilidad para modular el estrés del RE que comprende los siguientes pasos:
- a) poner en contacto una célula tal como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1-3 con un agente candidato y
  - b) determinar el efecto del agente candidato en el nivel de expresión del elemento indicador.
- 25 5. Un método para producir una célula tal como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1-3 que comprende la introducción de una secuencia nucleotídica que codifica un elemento sensor del estrés del RE, una secuencia nucleotídica que codifica un elemento indicador y una secuencia nucleotídica que codifica un gen exógeno en una célula.

SEQ ID 1 (141bp)

CCCGAGGAACTGGACAGCGTGTGCGAAAAAGTTGCTTTTTTATATAAAGGA  
CACGAAAAGGGTTCTCTGGAAGATATAAATATGGCTATGTAATTCTAAAG  
ATTAACGTGTTACTGTTTTACTTTTTTAAAGTCCCCAAGAG

**FIG. 1**

SEQ ID 2 (444 bp) NM\_000371

ATGGCTTCTCATCGTCTGCTCCTCCTCTGCCTTGCTGGACTGGTATTTGTG  
TCTGAGGCTGGCCCTACGGGCACCGGTGAATCCAAGTGCCTCTGATGGT  
CAAAGTTCTAGATGCTGTCCGAGGCAGTCCTGCCATCAATGTGGCCGTGC  
ATGTGTTCAGAAAGGCTGCTGATGACACCTGGGAGCCATTGCCTCTGGG  
AAAACCAGTGAGTCTGGAGAGCTGCATGGGCTCACAACCTGAGGAGGAAT  
TTGTAGAAGGGATATACAAAGTGGAAATAGACACCAAATCTTACTGGAA  
GGCACTTGGCATCTCCCCATTCCATGAGCATGCAGAGGTGGTATTCACAG  
CCAACGACTCCGGCCCCCGCCGCTACACCATTGCCGCCCTGCTGAGCCCC  
TACTCCTATTCCACCACGGCTGTCGTCACCAATCCCAAGGAATGA

**FIG. 2**

SEQ ID 3 (1152 bp) NM\_016843

ATGGCTGAGCCCCGCCAGGAGTTCGAAGTGATGGAAGATCACGCTGGGAC  
GTACGGGTTGGGGGACAGGAAAGATCAGGGGGGCTACACCATGCACCAA  
GACCAAGAGGGTGACACGGACGCTGGCCTGAAAGCTGAAGAAGCAGGCA  
TTGGAGACACCCCCAGCCTGGAAGACGAAGCTGCTGGTCACGTGACCCAA  
GCTCGCATGGTCAGTAAAAGCAAAGACGGGACTGGAAGCGATGACAAAA  
AAGCCAAGGGGGCTGATGGTAAAACGAAGATCGCCACACCGCGGGGAGC  
AGCCCCTCCAGGCCAGAAGGGCCAGGCCAACGCCACCAGGATTCCAGCA  
AAAACCCCGCCCGCTCCAAAGACACCACCCAGCTCTGGTGAACCTCCAAA  
ATCAGGGGATCGCAGCGGCTACAGCAGCCCCGGCTCCCCAGGCACTCCCG  
GCAGCCGCTCCCGCACCCCGTCCCTTCCAACCCACCCACCCGGGAGCCC  
AAGAAGGTGGCAGTGGTCCGTA CTCCACCCAAGTCGCCGTCTTCCGCCAA  
GAGCCGCCTGCAGACAGCCCCCGTGCCCATGCCAGACCTGAAGAATGTCA  
AGTCCAAGATCGGCTCCACTGAGAACCTGAAGCACCAGCCGGGAGGCGG  
GAAGGTGCAGATAATTAATAAGAAGCTGGATCTTAGCAACGTCCAGTCCA  
AGTGTGGCTCAAAGGATAATATCAAACACGTCCCGGGAGGCGGCAGTGTG  
CAAATAGTCTACAAACCAGTTGACCTGAGCAAGGTGACCTCCAAGTGTGG  
CTCATTAGGCAACATCCATCATAAACCAGGAGGTGGCCAGGTGGAAGTAA  
AATCTGAGAAGCTTGACTTCAAGGACAGAGTCCAGTCGAAGATTGGGTCC  
CTGGACAATATCACCCACGTCCCTGGCGGAGGAAATAAAAAGATTGAAAC  
CCACAAGCTGACCTTCCGCGAGAACGCCAAAGCCAAGACAGACCACGGG  
GCGGAGATCGTGTACAAGTCGCCAGTGGTGTCTGGGGACACGTCTCCACG  
GCATCTCAGCAATGTCTCTCCACCGGCAGCATCGACATGGTAGACTCGC  
CCCAGCTCGCCACGCTAGCTGACGAGGTGTCTGCCTCCCTGGCCAAGCAG  
GGTTTGTGA

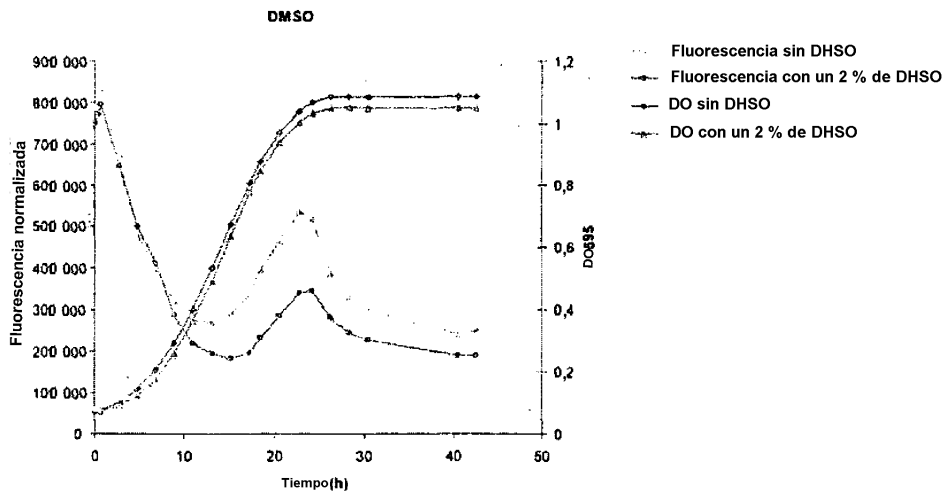
FIG. 3

SEQ ID 4 (4443 bp) NM\_000492

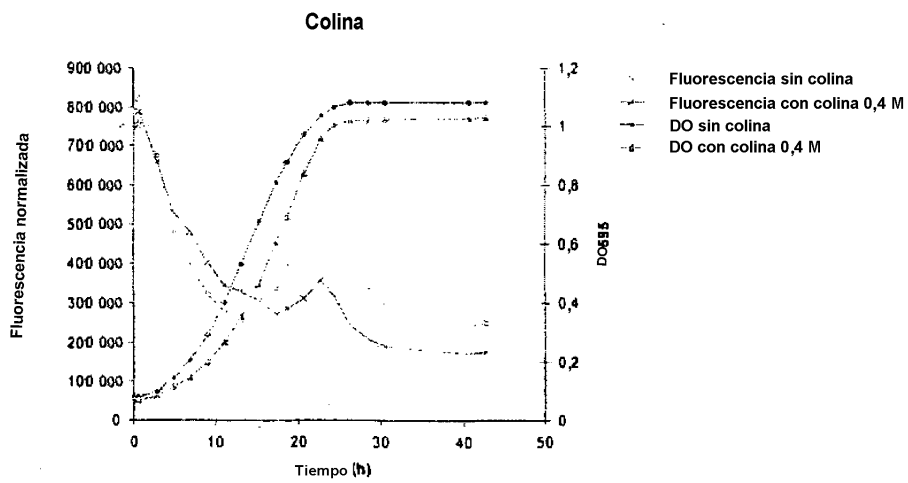
ATGCAGAGGTCGCCTCTGGAAAAGGCCAGCGTTGTCTCCAAACTTTTTTT  
 CAGCTGGACCAGACCAATTTTTGAGGAAAGGATACAGACAGCGCCTGGAA  
 TTGTCAGACATATACCAAATCCCTTCTGTTGATTCTGCTGACAATCTATCT  
 GAAAAATTGGAAAGAGAATGGGATAGAGAGCTGGCTTCAAAGAAAAATC  
 CTAAACTCATTAATGCCCTTCGGCGATGTTTTTTCTGGAGATTTATGTTCT  
 ATGGAATCTTTTTATATTTAGGGGAAGTCACCAAAGCAGTACAGCCTCTC  
 TTA CTGGGAAGAATCATAGCTTCTATGACCCGGATAACAAGGAGGAAC  
 GCTCTATCGCGATTTATCTAGGCATAGGCTTATGCCTTCTCTTTATTGTGA  
 GGACTGCTCCTACACCCAGCCATTTTTGGCCTTCATCACATTGGAATG  
 CAGATGAGAATAGCTATGTTTAGTTGATTTATAAGAAGACTTTAAAGCT  
 GTC AAGCCGTGTTCTAGATAAAAATAAGTATTGGACAACCTGTTAGTCTCC  
 TTTCCAACAACCTGAACAAATTTGATGAAGGACTTGCATTGGCACATTTCT  
 GTGTGGATCGCTCCTTTGCAAGTGGCACTCCTCATGGGGCTAATCTGGGA  
 GTTGTACAGGCGTCTGCCTTCTGTGGACTTGGTTTCTGATAGTCTTGC  
 CCTTTTTCAGGCTGGGCTAGGGAGAATGATGATGAAGTACAGAGATCAG  
 AGAGCTGGGAAGATCAGTGAAAGACTTGTGATTACCTCAGAAATGATTG  
 AAAATATCCAATCTGTTAAGGCATACTGCTGGGAAGAAGCAATGGAAAA  
 AATGATTGAAACTTAAGACAAACAGAACTGAAACTGACTCGGAAGGCA  
 GCCTATGTGAGATACTTCAATAGCTCAGCCTTCTTCTCTCAGGGTCTTT  
 GTGGTGTTTTTATCTGTGCTTCCCTATGCACTAATCAAAGGAATCATCCTC  
 CGGAAAAATTTACCACCATCTCATTCTGCATTGTTCTGCGCATGGCGGT  
 CACTCGCAATTTCCCTGGGCTGTACAAACATGGTATGACTCTCTTGGAG  
 CAATAAACAAAATACAGGATTTCTTACAAAAGCAAGAATATAAGACATT  
 GGAATATAACTTAACGACTACAGAAGTAGTGATGGAGAATGTAACAGCC  
 TTCTGGGAGGAGGGATTTGGGGAATTATTTGAGAAAGCAAAAACAAAACA  
 ATAACAATAGAAAACTTCTAATGGTGATGACAGCCTCTTCTTCAGTAAT  
 TTCTCACTTCTTGGTACTCCTGTCTGAAAGATATTAATTTCAAGATAGAA  
 AGAGGACAGTTGTTGGCGGTTGCTGGATCCACTGGAGCAGGCAAGACTT  
 CACTTCTAATGGTGATTATGGGAGAACTGGAGCCTTCAGAGGGTAAAATT  
 AAGCACAGTGGAAAGAATTTCACTCTGTTCTCAGTTTTCTGGATTATGCCT  
 GGCACCATTAAGAAAAATATCATCTTTGGTGTTTCTATGATGAATATAG  
 ATACAGAAGCGTCATCAAAGCATGCCAACTAGAAGAGGACATCTCCAAG  
 TTTGCAGAGAAAGACAATATAGTTCTTGGAGAAGGTGGAATCACACTGA  
 GTGGAGGTCAACGAGCAAGAATTTCTTTAGCAAGAGCAGTATACAAAGA  
 TGCTGATTTGTATTTATTAGACTCTCCTTTTGGATACCTAGATGTTTTAAC  
 AGAAAAAGAAATATTTGAAAGCTGTGTCTGTAAACTGATGGCTAACAAA  
 ACTAGGATTTGGTCACTTCTAAAATGGAACATTTAAAGAAAGCTGACAA  
 AATATTAATTTGTCATGAAGGTAGCAGCTATTTTTATGGGACATTTTCAG  
 AACTCCAAAATCTACAGCCAGACTTTAGCTCAAAAATCATGGGATGTGAT  
 TCTTTTCGACCAATTTAGTGCAGAAAGAAGAAATTCATCCTAACTGAGAC  
 CTTACACCGTTTCTCATTAGAAGGAGATGCTCCTGTCTCCTGGACAGAAA  
 CAAAAAACAATCTTTTAAACAGACTGGAGAGTTTGGGGAAAAAAGGAA  
 GAATTCTATTCTCAATCCAATCAACTCTATACGAAAATTTTCCATTGTGCA  
 AAAGACTCCCTTACAAATGAATGGCATCGAAGAGGATTCTGATGAGCCTT  
 TAGAGAGAAGGCTGTCCTTAGTACCAGATTCTGAGCAGGGAGAGGCGAT  
 ACTGCCTCGCATCAGCGTGATCAGCACTGGCCCCACGCTTCAGGCACGAA  
 GGAGGCAGTCTGTCTGAACCTGATGACACACTCAGTTAACCAAGGTCAG  
 AACATTCACCGAAAGACAACAGCATCCACACGAAAAGTGTCACTGGCCC

CTCAGGCAAACCTTGACTGAACTGGATATATATTCAAGAAGGTTATCTCAA  
 GAAACTGGCTTGGAATAAGTGAAGAAATTAACGAAGAAGACTTAAAGG  
 AGTGCTTTTTTGGATGATATGGAGAGCATACCAGCAGTGACTACATGGAAC  
 ACATACCTTCGATATATTACTGTCCACAAGAGCTTAATTTTTGTGCTAATT  
 TGGTGCTTAGTAATTTTTCTGGCAGAGGTGGCTGCTTCTTTGGTTGTGCTG  
 TGGCTCCTTGGAACACTCCTCTTCAAGACAAAGGGAATAGTACTCATAG  
 TAGAAATAACAGCTATGCAGTGATTATCACCAGCACCAGTTCGTATTATG  
 TGTTTTACATTTACGTGGGAGTAGCCGACACTTTGCTTGCTATGGGATTCT  
 TCAGAGGTCTACCACTGGTGCATACTCTAATCACAGTGTGAAAATTTTA  
 CACCACAAAATGTTACATTCTGTTCTTCAAGCACCTATGTCAACCCTCAA  
 CACGTTGAAAGCAGGTGGGATTCTTAATAGATTCTCCAAAGATATAGCAA  
 TTTTGGATGACCTTCTGCCTCTTACCATATTTGACTTCATCCAGTTGTTATT  
 AATTGTGATTGGAGCTATAGCAGTTGTGCGAGTTTTACAACCCTACATCTT  
 TGTTGCAACAGTGCCAGTGATAGTGGCTTTTATTATGTTGAGAGCATATTT  
 CCTCCAAACCTCACAGCAACTCAAACAACCTGGAATCTGAAGGCAGGAGT  
 CCAATTTTCACTCATCTTGTTACAAGCTTAAAAGGACTATGGACACTTCGT  
 GCCTTCGGACGGCAGCCTTACTTTGAAACTCTGTTCCACAAAGCTCTGAA  
 TTTACATACTGCCAACTGGTTCTTGTACCTGTCAACACTGCGCTGGTTCCA  
 AATGAGAATAGAAATGATTTTTGTCATCTTCTTCATTGCTGTTACCTTCAT  
 TTCCATTTTAACAACAGGAGAAGGAGAAGGAAGAGTTGGTATTATCCTG  
 ACTTTAGCCATGAATATCATGAGTACATTGCAGTGGGCTGTAACTCCAG  
 CATAGATGTGGATAGCTTGATGCGATCTGTGAGCCGAGTCTTTAAGTTCA  
 TTGACATGCCAACAGAAGGTAAACCTACCAAGTCAACCAAACCATACAA  
 GAATGGCCAACTCTCGAAAGTTATGATTATTGAGAATTCACACGTGAAGA  
 AAGATGACATCTGGCCCTCAGGGGGCCAAATGACTGTCAAAGATCTCAC  
 AGCAAAATACACAGAAGGTGGAATGCCATATTAGAGAACATTTCTTCT  
 CAATAAGTCTGGCCAGAGGGTGGGCCTCTTGGGAAGAAGTGGATCAGG  
 GAAGAGTACTTTGTTATCAGCTTTTTTGGAGTACTGAACACTGAAGGAG  
 AAATCCAGATCGATGGTGTGCTTGGGATTCAATAACTTTGCAACAGTGG  
 AGGAAAGCCTTTGGAGTGATACCACAGAAAGTATTTATTTTTCTGGAAC  
 ATTTAGAAAAAACTTGATCCCTATGAACAGTGGAGTGATCAAGAAATA  
 TGGAAAGTTGCAGATGAGGTTGGGCTCAGATCTGTGATAGAACAGTTTCC  
 TGGGAAGCTTGACTTTGTCTTGTGGATGGGGGCTGTGTCTTAAGCCATG  
 GCCACAAGCAGTTGATGTGCTTGGCTAGATCTGTTCTCAGTAAGGCGAAG  
 ATCTTGCTGCTTGATGAACCCAGTGCTCATTGGATCCAGTAACATACCA  
 AATAATTAGAAGAACTCTAAAACAAGCATTGCTGATTGCACAGTAATTC  
 TCTGTGAACACAGGATAGAAGCAATGCTGGAATGCCAACAAATTTTTGGTC  
 ATAGAAGAGAACAAAGTGCGGCAGTACGATTCCATCCAGAAACTGCTGA  
 ACGAGAGGAGCCTCTTCCGGCAAGCCATCAGCCCCTCCGACAGGGTGAA  
 GCTCTTTCCCCACCGGAACTCAAGCAAGTGCAAGTCTAAGCCCCAGATTG  
 CTGCTCTGAAAGAGGAGACAGAAGAAGAGGTGCAAGATACAAGGCTTTA  
 G

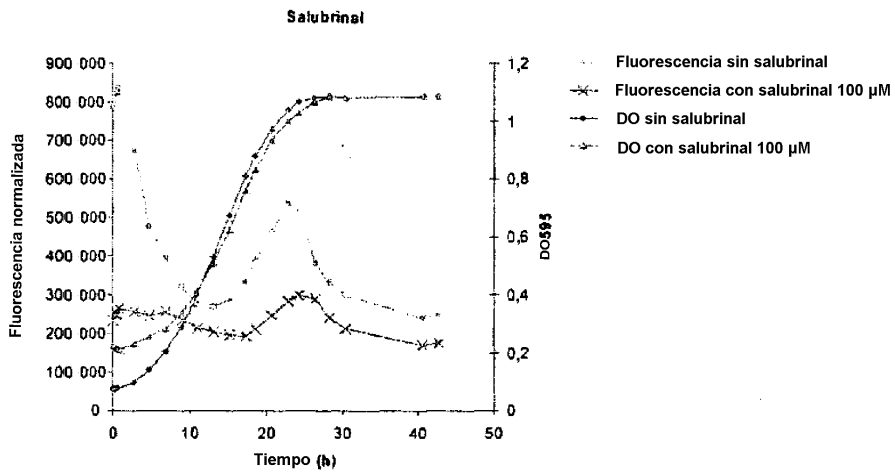
FIG 4



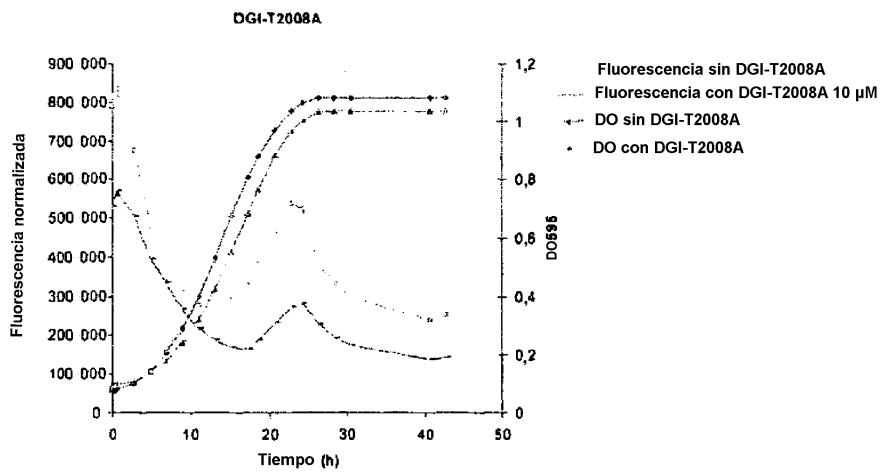
**FIG. 5**



**FIG. 6**



**FIG. 7**



**FIG. 8**



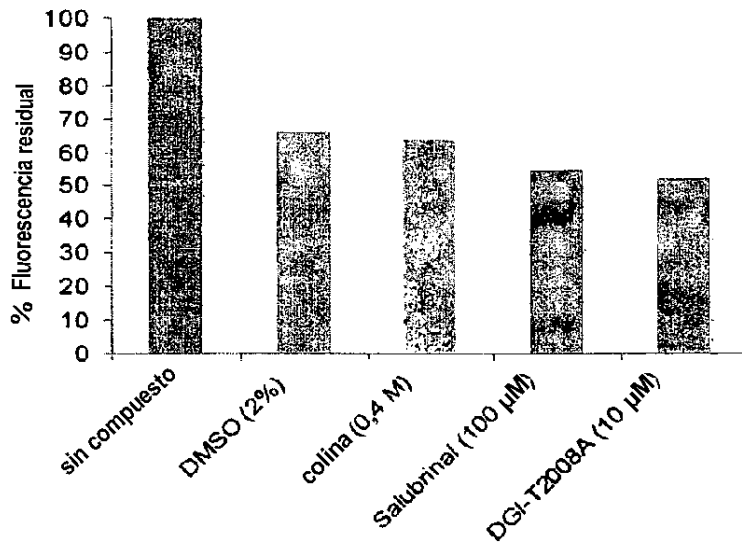


FIG. 9

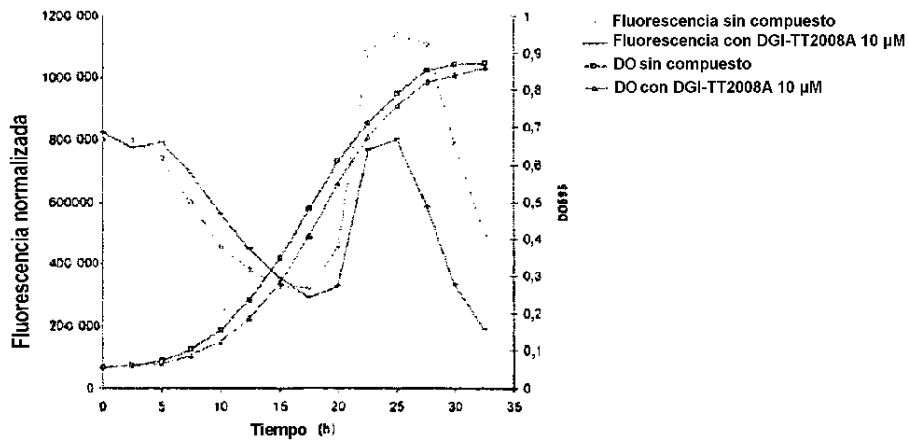


FIG. 10