

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 568 879**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/50** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.01.2012 E 12704380 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.01.2016 EP 2810064**

54 Título: **Sensor basado en células**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**05.05.2016**

73 Titular/es:

**CANVAX BIOTECH, S.L. (100.0%)**  
**Parque Científico Tecnológico, Rabanales 21,**  
**C/ Astrónoma Cecilia Payne**  
**14014 Córdoba, ES**

72 Inventor/es:

**PAZ ROJAS, ELIER;**  
**GARCÍA MACEIRA, FÉ ISABEL;**  
**LUNA GUERRERO, VERÓNICA INMACULADA;**  
**MONTERO PEÑALVO, MARÍA GRACIA;**  
**GARCÍA MACEIRA, TANIA;**  
**MORALES MARTÍNEZ, JOSÉ ANDRÉS;**  
**ARAGÓN GÓMEZ, ANA BELÉN;**  
**QUESADA MOLINA, ANA y**  
**MÁRQUEZ MORALES, AURORA MARÍA**

74 Agente/Representante:

**ILLESCAS TABOADA, Manuel**

**ES 2 568 879 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

**Campo de la invención**

La presente invención se engloba en el campo biotecnológico y farmacéutico. Se refiere a un sensor basado en células de utilidad para el descubrimiento de fármacos, el diagnóstico y la determinación de analitos que comprende una línea celular con exocitosis regulada profesional de los gránulos de secreción que sobreexpresan una hidrolasa no proteasa seleccionada, preferiblemente, de un grupo que comprende una proteína de fusión a *Gaussia luciferasa* con una proteína de direccionamiento al gránulo, una fosfatasa alcalina secretable y una cadena beta de la beta-hexosaminidasa, como posibles polipéptidos indicadores, almacenados en los gránulos de secreción regulada de la línea celular con exocitosis regulada profesional y que tiene una molécula endógena o una molécula heteróloga como un modulador de la exocitosis regulada de los gránulos de secreción, de tal modo que el indicador hidrolasa no proteasa almacenado en dicho gránulo tiene por lo menos: una alta resistencia a las condiciones que ya están presentes en el interior de los gránulos, tales como pH bajo y proteólisis por proteasas; actividad enzimática después de la exocitosis; un sustrato altamente específico; ausencia de toxicidad, especialmente después de la descongelación de las células; un nivel muy bajo de secreción en condiciones no estimuladas o basales y una elevada señal respecto a la actividad de fondo en un medio compatible con la viabilidad del cultivo celular y la exocitosis de los gránulos para una detección de alto rendimiento robusta y sensible.

Cuando el sensor basado en células se incuba con un ligando específico del modulador de la exocitosis, el polipéptido indicador se libera de los gránulos en el medio extracelular y la actividad enzimática de ese polipéptido indicador de tipo hidrolasa no proteasa liberado, se detecta con un sustrato específico.

Dicho sensor basado en células sensible es útil para analizar las interacciones entre al menos dos moléculas, una que actúa como modulador de la exocitosis y la otra como el ligando específico del modulador de la exocitosis. Ejemplos de usos de tales sensores son: analizar las interacciones entre moléculas en el descubrimiento de fármacos, cuantificar moléculas tales como proteínas o compuestos orgánicos volátiles para el diagnóstico y para la detección de fármacos o moléculas en varias muestras, por ejemplo, en la industria alimentaria, en muestras ambientales y en la industria farmacéutica.

**Estado de la técnica**

La superfamilia del receptor acoplado a la proteína G (GPCR) representa la principal parte de los más de 1000 receptores de superficie que se expresan en la membrana de las células eucariotas.

Los GPCR son fundamentales para la comunicación de las células con sus medios extracelulares, pero también para la visión, el gusto y el olfato. Así, los métodos para medir y/o cuantificar la activación o inhibición de la actividad de los GPCR por compuestos, son fundamentales para el descubrimiento de fármacos y también para el diagnóstico de enfermedades.

La exocitosis de las células hematopoyéticas con exocitosis regulada profesional es muy bien conocida en el estado de la técnica, así como la exocitosis inducida por la unión de un agonista al GPCR. Pero tales exocitosis siempre se miden como un porcentaje porque hay una fuerte variabilidad en la cantidad de enzima almacenada en los gránulos de las células, por ejemplo, la cantidad de beta-hexosaminidasa. Con el fin de determinar un porcentaje de exocitosis, se hace una primera medida para cuantificar la cantidad de liberación inducida por el ligando de la enzima almacenada en el gránulo después de la unión del ligando y el receptor y, a continuación, las células se someten a lisis con detergentes, se incuban de nuevo y se determina la enzima total almacenada dentro de las células. El valor de fondo de las células no estimuladas se resta tanto de la liberación inducida por el ligando, como de la liberación total, siendo por lo tanto el porcentaje de exocitosis la relación entre la liberación específica inducida por el ligando y la liberación específica total. Pero esta determinación del porcentaje de liberación tiene varios pasos que aumentan el coste de los ensayos, aumentan el tiempo de ensayo y, por lo tanto, reducen el rendimiento. Además, el porcentaje de la exocitosis es en muchos casos muy bajo y, por lo tanto, este ensayo tiene una baja sensibilidad.

Se había demostrado previamente en el documento PCT/EP2010/004619 por los inventores de la presente solicitud de patente, que ciertas proteasas, tales como la granzima B humana, pueden estar sobreexpresadas en el interior de dichos gránulos de células hematopoyéticas con exocitosis profesional, teniendo dicho ensayo una mejor relación entre la señal y el fondo, y que no hay una producción estable de la proteasa dentro de los gránulos, de manera que no es necesario el porcentaje de exocitosis para comparar la exocitosis entre dos experimentos. Como se cita en el documento PCT/EP2010/004619, el indicador más ampliamente utilizado para la secreción de gránulos es la beta-hexosaminidasa endógena, pero esta proteína se ha considerado tradicionalmente un indicador de baja sensibilidad con una baja relación entre la señal y el fondo y una fuerte variabilidad entre los experimentos debido a una gran variación de la cantidad de enzima almacenada en los gránulos a lo largo del tiempo. En consecuencia, aunque el documento PCT/EP2010/004619 divulga el posible uso de la beta-hexosaminidasa como indicador, esta no puede ser considerada como una divulgación suficiente de la presente invención porque las enseñanzas de

PCT/EP2010/004619 no permiten a la persona experta en la materia el uso de beta-hexosaminidasa como indicador porque de hecho la divulgación hecha en esa técnica anterior, se aparta de dicho uso explicando por qué la beta-hexosaminidasa no es un indicador fiable. Por otra parte, en la presente invención, la beta-hexosaminidasa no se utiliza como tal indicador, sino sólo la cadena beta de la enzima y sobreexpresada.

Además, la sobreexpresión de las proteasas, tales como la granzima B, en el interior de los gránulos de las células hematopoyéticas, es tóxica para las células, en particular después de la descongelación de las células, donde alrededor del 30 al 40 por ciento de las células murieron 24 horas después de la descongelación.

La presente invención se centra en el desarrollo de un sensor basado en células, que comprende indicadores que son diferentes a los indicadores usados en los sensores basados en células conocidos en la técnica anterior.

## Descripción de la invención

### Breve descripción de la invención

La presente invención supera los problemas citados anteriormente demostrando que otras hidrolasas, que no son proteasas, no son tóxicas cuando se sobreexpresan en el interior de los gránulos de células descongeladas y permiten el desarrollo de sensores muy sensibles. En particular, algunas glicosidasas, tales como la cadena B de la beta-hexosaminidasa y fosfatasa tales como la fosfatasa alcalina secretada, se almacenan en niveles altos en el interior de los gránulos de células hematopoyéticas con exocitosis regulada profesional y son detectadas por la exocitosis inducida mediante un ligando con una alta relación entre la señal y el fondo, y con baja variabilidad interensayo. Además, la presente invención también demuestra que las anteriores realizaciones específicas de la invención se pueden generalizar a otras hidrolasas no proteasas que normalmente no están almacenadas dentro de los gránulos y que pueden ser redirigidas a los gránulos por medio de polipéptidos de direccionamiento al gránulo. Por ejemplo, la Gaussia luciferasa es una hidrolasa no proteasa que normalmente no se almacena dentro de gránulos y que puede ser redirigida al gránulo por medio de un polipéptido de direccionamiento al gránulo, tal como la granzima B, sobreexpresada y almacenada en los gránulos y liberada como beta-hexosaminidasa por exocitosis inducida por ligando. De este modo, las células hematopoyéticas que sobreexpresan hidrolasas no proteasa tóxicas se convierten en sensores sensibles basados en células con baja variabilidad para medir la exocitosis.

Los siguientes términos y expresiones se definen a los efectos de la presente invención:

- **Sensor:** Es un tipo de transductor. **Transductor** se define como cualquier dispositivo que convierte una señal de una forma a otra. Los sensores que transducen una señal biológica son llamados biosensores.
- **Exocitosis regulada:** Se refiere a un proceso en el que células especializadas secretan neurotransmisores, hormonas, enzimas, péptidos o sustancias de bajo peso molecular (por ejemplo, catecolaminas, glutamato, etc.). Normalmente, un aumento de la concentración intracelular de  $Ca^{2+}$  es el detonante de la exocitosis, pero hay otras señales intracelulares, incluyendo AMPc, diacilglicerol (DAG), fosfolípidos y ATP, que también regulan o modulan la exocitosis desencadenada por  $Ca^{2+}$ . Células con **exocitosis regulada profesional** se refiere a las células que normalmente almacenan metabolitos o polipéptidos dentro de sus gránulos y que liberan dichos metabolitos o polipéptidos almacenados en los gránulos como respuesta a una señal extracelular.
- **Gránulos de secreción o vesículas secretoras o lisosomas secretores:** Son orgánulos intracelulares especializados que sirven como un grupo de orgánulos de almacenamiento para productos de secreción seleccionados. Los gránulos de secreción se mueven hacia la periferia de la célula por un estímulo o un modulador, sus membranas se fusionan con la membrana celular y se libera su carga de contenido. Aunque en la mayoría de los tipos de células, los gránulos de secreción parecen representar una clase completamente nueva de orgánulos, los gránulos de varias células hematopoyéticas y de otros tipos de células comparten varias propiedades con los lisosomas.
- **Células hematopoyéticas:** Son células derivadas de células madre de la médula ósea y comprenden todos los tipos de células sanguíneas que incluyen los linajes mieloide (monocitos y macrófagos, neutrófilos, basófilos, eosinófilos, eritrocitos, megacariocitos/plaquetas y algunas células dendríticas) y linfoide (linfocitos T, linfocitos B, células NK, algunas células dendríticas).
- **Línea celular con exocitosis regulada:** Tal como se usa en la presente memoria, las expresiones "célula con exocitosis regulada", "línea celular secretora profesional" y "línea celular con exocitosis regulada profesional" se pueden usar indistintamente. Para los métodos de la presente invención, las líneas celulares importantes son líneas de células hematopoyéticas con exocitosis regulada profesional.
- **Polipéptido indicador o indicador:** Es un gen que los investigadores unen a otro gen de interés en un cultivo celular, de animales o plantas. Ciertos genes son elegidos como indicadores porque las características que confieren a los organismos que los expresan se identifican y miden fácilmente, o porque son marcadores seleccionables. Los genes indicadores se utilizan generalmente para determinar si el gen de interés ha sido incorporado por o expresado en la población de células u el organismo. Los genes indicadores en la presente memoria son polipéptidos almacenados dentro de los gránulos de secreción de las líneas de células secretoras

profesionales como ciertas células hematopoyéticas, y se liberan en el medio extracelular debido a un estímulo o un modulador de la exocitosis.

- 5 • **Polipéptido de direccionamiento al gránulo:** Es un polipéptido que se almacena de forma natural en el interior de los gránulos de las células con exocitosis regulada. Tales polipéptidos contienen tanto secuencias conocidas como desconocidas que dirigen las proteínas a los gránulos. Ejemplos de tales polipéptidos de direccionamiento al gránulo comprenden beta-hexosaminidasa, p-selectina, granzimas tales como A, B, M, H, K, catepsinas. Las proteínas que normalmente no se almacenan en gránulos pueden ser almacenadas en gránulos construyendo una proteína de fusión con polipéptidos de direccionamiento al gránulo. En la presente invención se utiliza el término “redirigir” para describir el hecho de que una proteína que normalmente no se almacena en gránulos se puede fusionar con otra y la proteína resultante se puede almacenar también en gránulos.
- 10 • **Hidrolasa:** Es una enzima que cataliza la hidrólisis de un enlace químico. Las hidrolasas se clasifican en el grupo 3 en la clasificación número EC de las enzimas y pueden ser clasificadas a su vez en varias subclases, en base a los enlaces sobre los que actúan: estererasas que escinden un enlace éster como las nucleasas, fosfodiesterasas, lipasa, fosfatasa; glicosilasas que escinden azúcares y proteasas, que comprendan granzimas, o peptidasas, que escinden un enlace peptídico.
- 15 • **Hidrolasa no proteasa:** Es una enzima que cataliza la hidrólisis de un enlace químico diferente a un enlace peptídico.
- 20 • **Modulador de la exocitosis regulada:** Se refiere a un compuesto, molécula, o composición que es capaz de alterar una o más vías de transducción de señales en etapas posteriores implicadas en el proceso de exocitosis regulada. Esta alteración en la actividad abarca la inhibición (es decir, el compuesto, molécula o composición es un “inhibidor” de la exocitosis), así como la estimulación, la inducción o la mejora (es decir, el compuesto, molécula o composición es un “estimulador”, “inductor” o “potenciador” de la exocitosis). Estos moduladores se identifican utilizando ensayos in vitro y/o in vivo. En estos ensayos, los controles se utilizan con el fin de permitir las comparaciones entre muestras.
- 25 • **Descubrimiento de fármacos:** Se refiere a un proceso mediante el cual se describen y/o diseñan fármacos. Como se usa en la presente memoria, el descubrimiento de fármacos comprende la identificación de fármacos y modificaciones para afinidad, efectos secundarios, biodisponibilidad y también para probar el efecto de un fármaco previamente lanzado al mercado en una nueva indicación terapéutica, un proceso también conocido como reperfilado.
- 30 • **Gen:** Es la unidad física y funcional fundamental de la herencia. En términos bioquímicos, un gen es una secuencia ordenada de nucleótidos localizados en una posición particular en un cromosoma particular que codifica un producto funcional específico (es decir, una proteína o una molécula de ARN). En la presente memoria, un gen se compone no sólo de las secuencias codificantes, sino que también puede comprender regiones de ADN adyacentes implicadas en el control de la transcripción de las secuencias codificantes (por ejemplo, promotores, potenciadores) e intrones. Las secuencias que están localizadas en 5' de la región codificante y que están presentes en el ARNm se denominan secuencias 5' no traducidas. Las secuencias que están localizadas en 3' o en dirección 3' de la región codificante y que están presentes en el ARNm se denominan secuencias 3' no traducidas. El término “gen” abarca tanto el ADNc como las formas genómicas de un gen. Una forma genómica o clon de un gen contiene la región codificante interrumpida con secuencias no codificantes denominadas “intrones” o “regiones intercaladas” o “secuencias intercaladas”. Los intrones son segmentos de un gen que se transcriben en ARN nuclear heterogéneo (ARNnh); los intrones pueden contener elementos reguladores tales como potenciadores. Los intrones se eliminan o “se cortan” del transcrito nuclear o primario; por tanto, los intrones están ausentes en el transcrito de ARN mensajero (ARNm). El ARNm actúa durante la traducción para especificar la secuencia o el orden de los aminoácidos en un polipéptido naciente.
- 35 • **“Introducido de forma estable” o “transformado de forma estable” o “transducido de forma estable” o “transfectado de forma estable” o “electroporado de forma estable”.** Se refiere a la fracción de células con el ADN extraño deseable integrado en su genoma. Dependiendo del vector de expresión y de la técnica de transfección utilizada, sólo una fracción de las células puede integrar ADN extraño en su genoma. Con el fin de identificar y seleccionar estos integrantes, un gen que codifica un marcador seleccionable (por ejemplo, resistencia a antibióticos) se introduce generalmente en las células hospedadoras junto con el gen de interés. Los marcadores seleccionables preferidos incluyen aquellos que confieren resistencia a fármacos, tales como G418, higromicina y puromicina. El ácido nucleico que codifica un marcador seleccionable puede introducirse en una célula hospedadora en el mismo vector que el que codifica un producto de traducción detectable, o puede introducirse en un vector separado. Las células transfectadas de forma estable con el ácido nucleico introducido pueden identificarse por selección de fármacos (por ejemplo, las células que han incorporado el gen marcador seleccionable sobrevivirán, mientras que las otras células morirán).
- 45 • **Receptor de superficie:** Se refiere a moléculas que existen en la superficie de las células, interactúan con el medio ambiente extracelular y transmiten o transducen la información relativa al medio ambiente intracelularmente de una manera que en última instancia modulan la transcripción de promotores específicos, lo que tiene como resultado la transcripción de genes específicos. Ejemplos de receptor de superficie son receptores tirosina quinasa, los receptores de canales iónicos, receptores de citocinas, receptores de quimiocinas o receptores acoplados a la proteína G (GPCR), tales como receptores quimioatrayentes de péptidos, receptores de neuropéptidos, fotorreceptores, receptores de neurotransmisores o receptores de hormonas polipeptídicas.
- 60 • **Receptores acoplados a la proteína G (GPCR),** también conocidos como **receptores de siete dominios**
- 65

**transmembrana, receptores 7TM, receptores heptahelicoidales y receptores ligados a la proteína G (GPLR):** Son una gran familia de proteínas de receptores transmembrana caracterizados por siete dominios que atraviesan la membrana con un extremo N-terminal extracelular y un extremo C-terminal citoplasmático. La unión del ligando a los GPCR promueve cambios conformacionales que conducen al acoplamiento de la proteína G pequeña, a la iniciación de las vías de transducción de señales y en última instancia a las respuestas celulares. Los ligandos que se unen y activan a estos receptores incluyen compuestos sensibles a la luz, olores, feromonas, hormonas y neurotransmisores, y varían en tamaño desde pequeñas moléculas, pasando por péptidos, hasta proteínas grandes. Los receptores acoplados a la proteína G se encuentran sólo en eucariotas superiores, incluyendo levaduras, plantas y, especialmente, animales. Los receptores acoplados a la proteína G no solo están implicados en muchas enfermedades, sino que también son la diana de cerca de la mitad de todos los fármacos modernos.

- **GPCR:** Operan a través de un mecanismo molecular similar. La activación del GPCR por estímulos extracelulares provoca cambios conformacionales en el receptor, lo que tiene como resultado el acoplamiento intermedio y la activación de las proteínas de unión a GTP (proteínas G). Las proteínas G son de naturaleza heterotrimérica y están compuestas de subunidades alfa ( $\alpha$ ), beta ( $\beta$ ) y gamma ( $\gamma$ ) codificadas por genes distintos. La subunidad alfa es responsable de la unión de GDP y GTP. La unión de un ligando a un GPCR tiene como resultado una transición de la subunidad alfa ( $\alpha$ ) de una forma unida a GDP a una forma unida a GTP y conduce a la activación del heterotrímero a través de la disociación del  $\alpha$ -GTP del dímero  $\beta\gamma$ . Tanto  $\alpha$ -GTP como el dímero  $\beta\gamma$  regulan las actividades de una variedad de efectores que transmiten la señal al interior de la célula a través de la producción de moléculas de tipo segundo mensajero (por ejemplo, calcio, AMPc, etc.). Existen por lo menos 17 genes Galfa ( $G\alpha$ ) y los miembros de las proteínas G se pueden agrupar en cuatro clases principales denominadas  $G\alpha_i$ ,  $G\alpha_q/11$ ,  $G\alpha_s$  y  $G\alpha_{12/13}$ . (Véase, por ejemplo, Preinger AM y Hamm HE. *Sci. STKE* 2004, re3 y Cabrera-Vera TM et al. *Endocr Rev.* 2003 Dec; 24(6):765-81). Como se usa en la presente memoria, un GPCR comprende receptores acoplados a cualquiera de  $G\alpha_i$ ,  $G\alpha_q/11$ ,  $G\alpha_s$  y  $G\alpha_{12/13}$ .
- **Receptor con actividad enzimática tirosina quinasa (RTK) intrínseca:** Son receptores de superficie celular de alta afinidad de muchos factores de crecimiento polipeptídicos, citocinas y hormonas. De los noventa genes de tirosina quinasa identificados en el genoma humano, 58 codifican para los receptores proteicos tirosina quinasa. La mayoría de los RTK son receptores de una subunidad, pero algunos, por ejemplo, el receptor de la insulina existe en forma de complejos multiméricos. Cada monómero tiene un único dominio transmembrana, una región N-terminal extracelular y una región C-terminal intracelular. La región N-terminal extracelular se compone de un dominio de proteína muy grande que se une a ligandos extracelulares (por ejemplo, un factor de crecimiento particular). La región C-terminal intracelular está comprendida por dominios reguladores y dominios reguladores responsables de la actividad quinasa de estos receptores, los cuales fosforilan específicamente los aminoácidos tirosina.
- **Receptores quiméricos:** Estos se basan en un receptor artificial que combina partes de un receptor con partes de otro receptor, fragmentos de proteínas, etiquetas y cualquier combinación de los mismos, incluyendo tanto los dominios completos como porciones de los mismos. En general, una **proteína quimérica** o "**proteína de fusión**" es un polipéptido que comprende al menos una porción del producto de proteína deseado fusionado con al menos otra secuencia de péptido o a otro polipéptido.
- **Vector o vector plasmídico o plásmido:** El término "vector" se utiliza para referirse a una molécula de ácido nucleico portadora, en la que se puede insertar una secuencia de ácido nucleico, para introducirse en una célula en la que se puede replicar. Una secuencia de ácido nucleico puede ser "exógena", lo que significa que es extraña a la célula en la que se está introduciendo el vector o que la secuencia es homóloga a una secuencia de la célula, pero en una posición dentro del ácido nucleico de la célula hospedadora en la que no se encuentra la secuencia normalmente. Los vectores incluyen plásmidos, cósmidos, virus (bacteriófagos, virus animales y virus de plantas) y cromosomas artificiales (por ejemplo, YAC). Un experto en la materia estará bien equipado para construir un vector mediante técnicas recombinantes estándar (véase, por ejemplo, Maniatis, et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor, 1990) y Ausubel, et al., 1994, *Current Protocols In Molecular Biology* (John Wiley & Sons, 1996), ambos incorporados en la presente memoria por referencia).
- **Vector de expresión:** El término "vector de expresión" se refiere a cualquier tipo de construcción genética que comprende un ácido nucleico que codifica un ARN capaz de ser transcrito. Los vectores de expresión normalmente comprenden al menos un promotor y una señal poli-A. Un promotor es una secuencia de control que es una región de una secuencia de ácido nucleico en la que se controlan la iniciación y la velocidad de la transcripción. Una **señal poli-A o señal de terminación** comprende una secuencia de ADN implicada en la terminación específica de un transcrito de ARN por una ARN polimerasa. Un terminador puede ser necesario in vivo para lograr niveles de mensaje deseables.
- **Promotores:** Los promotores son secuencias de ADN que contienen regiones implicadas en el control de la transcripción de las secuencias codificantes adyacentes. Las secuencias reguladoras de ADN específicas localizadas lejos del sitio de inicio de la transcripción del promotor son denominadas potenciadores. Otras secuencias de los promotores comprenden la secuencia caja TATA que se une a las proteínas de unión a TATA que ayudan a la formación del complejo transcripcional de la ARN polimerasa. Sin embargo, las secuencias relevantes tienen una gran variabilidad entre los diferentes promotores. Por comparación de diferentes promotores se han determinado secuencias de consenso. El grado en que un promotor dado se ajusta a la secuencia consenso determina la fuerza de ese promotor. Cuanto más se aproxima la secuencia a la secuencia consenso, más fuerte será el promotor y más frecuentemente ocurrirá la transcripción en ese promotor. La fuerza

del promotor es importante porque determina la frecuencia con la que se transcribe una secuencia dada de ARNm, dando efectivamente una mayor prioridad a la transcripción de algunos genes sobre otros. Por ejemplo, en el caso de un gen que codifica una proteína que se requiere en grandes cantidades, cabe esperar que tenga un promotor relativamente fuerte. Por lo tanto, la clasificación de los promotores como fuertes o débiles es una clasificación relativa, donde los promotores fuertes son aquellos transcritos con más frecuencia que los promotores débiles. Por lo tanto, como se usa en la presente memoria, un promotor fuerte es uno transcrito con más frecuencia relativamente que otros promotores y que produce niveles de proteína más altos que los promotores débiles. Ejemplos de promotores fuertes son el promotor de CMV, el promotor del factor de elongación 1 alfa y un promotor quimérico entre el CMV y el promotor MoMLV5'LTR.

- 5 • **Sobreexpresión:** una proteína puede ser sobreexpresada en una línea celular mediante el uso de un vector de expresión ya sea para aumentar los niveles previamente existentes de una proteína en dicha línea celular o para producir grandes cantidades de una proteína en dicha línea celular. Por lo general, los vectores de expresión utilizados para la sobreexpresión de proteínas son promotores constitutivos fuertes o promotores inducibles fuertes.
- 10 • **Péptido señal** o una **secuencia señal: Un péptido señal** es una cadena peptídica corta (de 3 a 60 aminoácidos de longitud) que dirige el transporte posterior a la traducción de una proteína. Los péptidos señal también son denominados **señales de direccionamiento, secuencias señal, péptidos de tránsito o señales de localización**. Las secuencias de aminoácidos de los péptidos señal dirigen a las proteínas (que se sintetizan en el citosol) hasta ciertos orgánulos tales como el núcleo, matriz mitocondrial, retículo endoplasmático, cloroplasto, apoplasto y peroxisoma. Algunos péptidos señal son escindidos de la proteína mediante la peptidasa señal después de transportarse las proteínas.
- 15 • **Etiqueta peptídica:** Las etiquetas peptídicas son péptidos cortos que se pueden utilizar para detectar proteínas, por ejemplo, con anticuerpos cuando los anticuerpos específicos de la proteína no están disponibles, o para la purificación de proteínas. Ejemplos de etiquetas peptídicas conocidas que podrían ser utilizadas para la detección de la superficie celular y separación son la etiqueta c-myc, la etiqueta HA y la etiqueta FLAG™. En general, para la detección en la superficie y separación se podría utilizar cualquier etiqueta peptídica para la cual haya disponible una proteína de unión específica, siempre que dicha proteína de unión específica esté marcada directa o indirectamente con un fluoróforo o, por ejemplo, con una esfera para la separación de la superficie.
- 20 • **Secreción basal:** Secreción basal se refiere a la cantidad relativa de proteína secretada por las células en ausencia de un modulador de la exocitosis celular. En casi todos los tipos de células secretoras, se puede detectar un nivel de secreción basal. No se sabe si la secreción basal resulta de la liberación de la proteína almacenada en gránulos o de una fracción de la proteína recién sintetizada que se separa de los gránulos de secreción. (Véase, por ejemplo, Burgoyne RD y Morgan A. *Physiol Rev* (2003) 83: 581-632).
- 25 • **Molécula de ADN recombinante (ADNr):** Se refiere a una molécula de ADN producida uniendo operativamente una secuencia de ácido nucleico, tal como un gen, a una secuencia de una molécula de ADN.
- 30 • **Transformación o transfección:** Se refiere, como se usa en la presente memoria, a la introducción de ADN extraño en las células (por ejemplo, células procariontas o eucariotas). La transformación puede llevarse a cabo mediante una variedad de medios conocidos en la técnica, incluyendo la co-precipitación de ADN con fosfato de calcio, la transfección mediada por DEAE-dextrano, la transfección mediada por polibreno, electroporación, microinyección, fusión de liposomas, lipofección, fusión de protoplastos, infección retroviral y biolística. En particular, la transfección en células eucariotas puede ser transitoria cuando no está incluido un antibiótico adecuado en los medios de cultivo celular para la selección de las células que llevan una integración estable del ADN en los cromosomas. Los vectores plasmídicos para la selección estable deben tener un marcador seleccionable que se exprese en las células que han de ser seleccionadas con un antibiótico.
- 35 • **Que comprende:** Esta expresión, a lo largo de la presente memoria descriptiva de la patente, incluye, específicamente, la expresión "que consiste en", cuando se refiere, en particular, a las secuencias biológicas, como secuencias de aminoácidos o de nucleótidos. Se entiende que la secuencia puede comprender o bien un fragmento en el que reside principalmente la invención, tomada como la actividad biológica o efecto técnico, opcionalmente conjuntamente con otros fragmentos de secuencias o partes de secuencias; o simplemente, limitarse precisamente al fragmento como tal.
- 40
- 45
- 50

#### Breve descripción de los dibujos

55 **Figura 1.** Se muestra el concepto general de la presente invención, usando una hidrolasa no proteasa como un indicador de un gránulo almacenado, el receptor de IgE como el receptor de superficie celular que modula la exocitosis del gránulo y un sustrato que es escindido por el indicador hidrolasa no proteasa almacenado en el gránulo secretado para detección. El tratamiento de las células con un antígeno multimérico (por ejemplo, un alérgeno) que se une al receptor de alta afinidad unido a IgE, induce la liberación de la hidrolasa no proteasa almacenada en el gránulo y dicha hidrolasa no proteasa escinde el sustrato para producir un producto final fluorescente. Usando este sustrato específico de la enzima indicadora secretada, se puede determinar la interacción ligando-receptor.

65 **Figura 2.** Dibujo del concepto general de la presente invención, utilizando una hidrolasa no proteasa como indicadora almacenada en el gránulo, un GPCR como el receptor de superficie celular que modula la exocitosis

del gránulo y un sustrato fluorescente escindido por el indicador hidrolasa almacenado en el gránulo, secretado para la detección. El tratamiento de las células con un agonista del GPCR induce la liberación de la hidrolasa almacenada en el gránulo y dicha hidrolasa escinde el sustrato para producir un producto final fluorescente. Usando un sustrato específico de la enzima indicadora secretada, se puede determinar la interacción ligando-receptor.

**Figura 3.** Estructura general de vectores plasmídicos representativos de la presente invención. Mapa del vector plasmídico con resistencia a higromicina utilizado para expresar de forma estable la cadena beta de la HEXB, la fosfatasa alcalina secretable (SEAP) o una proteína quimérica producida como una fusión de la granzima B con la Gaussia luciferasa bajo el control de un promotor constitutivo fuerte quimérico hCMV-MoMLV5'-LTR (A) o del promotor inducible de tetraciclina (B).

### Descripción detallada de la invención

Como se cita anteriormente, la presente invención se refiere a un sensor basado en células, de utilidad para el descubrimiento de fármacos, el diagnóstico y la determinación de analitos. que comprende una línea celular con exocitosis regulada profesional de los gránulos de secreción, que sobreexpresan una hidrolasa no proteasa seleccionada, preferiblemente de un grupo que comprende una proteína de fusión de Gaussia luciferasa con una proteína de direccionamiento al gránulo, una fosfatasa alcalina secretable y una cadena beta de la beta-hexosaminidasa, como posibles polipéptidos indicadores, almacenados en los gránulos de secreción regulada de la línea celular con exocitosis regulada profesional, y que tiene o una molécula endógena o una molécula heteróloga como un modulador de la exocitosis regulada de los gránulos de secreción. Dicho indicador hidrolasa no proteasa almacenado en dicho gránulo tiene por lo menos: una alta resistencia a las condiciones que ya están presentes en el interior de los gránulos, tales como pH bajo y proteólisis por proteasas; actividad enzimática después de la exocitosis; un sustrato altamente específico; ausencia de toxicidad, especialmente después de la descongelación de las células; un nivel muy bajo de secreción en condiciones no estimuladas o basales y una elevada señal respecto a la actividad de fondo en un medio compatible con la viabilidad del cultivo celular y la exocitosis de los gránulos para una detección de alto rendimiento robusta y sensible.

Cuando se incuba el sensor basado en células con un ligando específico del modulador de la exocitosis, el polipéptido indicador se libera de los gránulos en el medio extracelular y la actividad enzimática de dicho polipéptido indicador liberado se detecta con un sustrato específico.

El sensor basado en células de la presente invención comprende, por lo tanto: una línea celular hematopoyética con exocitosis regulada profesional; un indicador hidrolasa no proteasa almacenado en el gránulo transfectado y sobreexpresado en dicha línea celular hematopoyética, estando dicho indicador almacenado en el gránulo bajo el control de un promotor adecuado; un modulador de la exocitosis, por ejemplo, un receptor de superficie, como un GPCR, bajo el control de un promotor adecuado, y un sustrato específico para la detección del indicador hidrolasa no proteasa almacenado en el gránulo secretado.

Dicho sensor sensible basado en células es útil para analizar las interacciones entre al menos dos moléculas, una que actúa como modulador de la exocitosis y la otra como el ligando específico del modulador de la exocitosis. Ejemplos de usos de tales sensores son: analizar las interacciones entre moléculas en el descubrimiento de fármacos, cuantificar moléculas tales como proteínas para el diagnóstico y la detección de fármacos o moléculas en varias muestras, por ejemplo, en la industria alimentaria, en muestras ambientales y en la industria farmacéutica.

El sensor de la presente invención es muy sensible y por lo tanto utiliza una menor cantidad de células que los sensores disponibles en la actualidad, su respuesta es más rápida que los sensores basados en promotores inducibles, no se necesita lisis para la liberación de los indicadores, la señal puede ser medida, ya sea en modo de punto final o en modo cinético, todos los reactivos se pueden mezclar y luego leer, no son necesarias etapas de lavado o detención, aumentando por lo tanto el rendimiento, se obtiene una señal estable y alta frente al fondo para un ensayo robusto con baja variabilidad entre los experimentos interensayo y se observa ausencia de toxicidad, especialmente después de la descongelación de las células.

La presente invención demuestra que otras hidrolasas, que no son proteasas, no son tóxicas cuando se sobreexpresan en el interior de los gránulos de las células descongeladas, y permiten el desarrollo de sensores muy sensibles. En particular, algunas glicosidasas, tales como la cadena  $\beta$  de la beta-hexosaminidasa y fosfatasas tales como la fosfatasa alcalina secretable, se almacenan en niveles altos en el interior de los gránulos de las células hematopoyéticas con exocitosis regulada profesional y son detectadas por exocitosis inducida por ligando con una alta relación entre la señal y el fondo y con baja variabilidad interensayo. Además, la presente invención también demuestra que las anteriores realizaciones específicas de la invención se pueden generalizar a otras hidrolasas no proteasas que normalmente no están almacenadas dentro de los gránulos y que pueden ser redirigidas a los gránulos por medio de polipéptidos de direccionamiento al gránulo. Por ejemplo, la Gaussia luciferasa es una hidrolasa no proteasa que normalmente no se almacena dentro de gránulos y que puede ser redirigida al gránulo por medio de un polipéptido de direccionamiento al gránulo, tal como la granzima B, sobreexpresada y almacenada en los gránulos y liberada como beta-hexosaminidasa por exocitosis inducida por ligando. De este modo, las células

hematopoyéticas que sobreexpresan hidrolasas no proteasas tóxicas se convierten en sensores sensibles basados en células con baja variabilidad para medir la exocitosis.

5 Por lo tanto, esta invención se basa en el descubrimiento de que las hidrolasas no proteasa pueden ser sobreexpresadas sin toxicidad en los gránulos de células de mamífero con exocitosis regulada profesional para producir sensores basados en células altamente sensibles útiles para medir la exocitosis con baja variabilidad.

10 La presente invención se beneficia de una solicitud de patente anterior PCT/EP2010/004619 y todas las enseñanzas relacionadas con las células, promotores, moduladores de la exocitosis se incorporan aquí por referencia.

### CÉLULAS UTILIZADAS EN LA PRESENTE INVENCÓN

15 La presente invención se refiere a un sensor basado en células de utilidad para el descubrimiento de fármacos, el diagnóstico y la determinación de analitos, que comprende una línea celular con exocitosis regulada profesional de los gránulos de secreción, transfectada con una hidrolasa no proteasa como un polipéptido indicador almacenado en los gránulos de secreción regulados de la línea celular con exocitosis regulada profesional y que tiene una molécula endógena o una molécula heteróloga como un modulador de la exocitosis regulada de los gránulos de secreción, teniendo dicho indicador hidrolasa no proteasa almacenado en dicho gránulo por lo menos: una alta resistencia a las condiciones que ya están presentes en el interior de los gránulos, tales como pH bajo y proteólisis por otras proteasas; actividad enzimática después de la exocitosis; ausencia de toxicidad, especialmente después de la descongelación de las células; un sustrato altamente específico; un nivel muy bajo de secreción en condiciones no estimuladas o basales y una elevada señal respecto a la actividad de fondo en un medio compatible con la viabilidad del cultivo celular y la exocitosis de los gránulos para una detección de alto rendimiento robusta y sensible.

25 Los gránulos de secreción y su exocitosis regulada son bien conocidos en el estado de la técnica y se han estudiado más extensamente en unos pocos tipos celulares elegidos bien como sistemas modelo debido a determinadas ventajas experimentales, o bien debido a su interés fisiológico o fisiopatológico fundamental (véase, por ejemplo, Burgoyne, RD and Morgan, A. Physiological Reviews, Vol. 83, No. 2, Abril 2003, pp. 581-632). Probablemente los tipos celulares más estudiados han sido la célula suprarrenal cromafin (y su línea celular tumoral homóloga PC12), las células beta pancreáticas y las células hematopoyéticas como mastocitos, plaquetas y neutrófilos, aunque también ocurre exocitosis de gránulos de secreción en muchos tipos de células neuroendocrinas y endocrinas diferentes para la secreción de péptidos y de otras hormonas, y en las células exocrinas para la secreción de enzimas digestivas. Además, se ha demostrado que, incluso en las líneas celulares secretoras no profesionales, tales como las líneas celulares fibroblastoides (células CHO), existe una vía para la exocitosis regulada por Ca<sup>2+</sup>, y probablemente todos estos tipos de células podrían poseer una vía de exocitosis regulada, es decir, los lisosomas convencionales que pueden ser activados por Ca<sup>2+</sup> para experimentar exocitosis. Pero los lisosomas secretores son una clase distinta de orgánulos secretores regulados y esta capacidad exocítica los distingue claramente de los lisosomas convencionales. Aunque los lisosomas convencionales también pueden fusionarse con la membrana plasmática y liberar su contenido soluble después de la estimulación (1), el alcance de la secreción de las enzimas lisosómicas de células tales como fibroblastos y células epiteliales, desencadenada por Ca<sup>2+</sup>, tiende a ser sólo del 10-20% (2). En comparación, hasta el 80% de los marcadores lisosomales se liberan tras un desencadenante fisiológico de las células que poseen lisosomas secretores, denominadas en la presente memoria, células con exocitosis regulada profesional. Así, las células preferidas para los métodos de la presente invención se seleccionan de un grupo que comprende células con exocitosis regulada profesional. Uno de los grupos más diversos de células con exocitosis regulada profesional es el que comprende células hematopoyéticas tales como neutrófilos, basófilos, eosinófilos, linfocitos T, tales como linfocitos T citotóxicos y células asesinas naturales (células NK). Es fundamental para el funcionamiento normal de todas las células, la exocitosis regulada de grandes cantidades de componentes almacenados como hidrolasas, tales como proteasas, glicosidasas y fosfatasas. Así, las células hematopoyéticas con exocitosis regulada profesional son células altamente relevantes para los métodos de la presente invención.

55 En una realización de la presente invención, las células se seleccionan de un grupo de líneas celulares hematopoyéticas con exocitosis regulada profesional seleccionadas a partir de células tales como linfocitos T citotóxicos, neutrófilos, mastocitos, y basófilos, que utilizan sus lisosomas secretores para almacenar componentes especializados tales como hidrolasas como glicosidasas y fosfatasas.

60 En otra realización de la presente invención las células preferidas se seleccionan de RBL-2H3, una línea celular de leucemia basófila de rata, la línea celular hematopoyética de médula ósea de ratón 32D, la línea celular humana de linfocitos citolíticos naturales NK92, la línea celular humana de linfocitos citolíticos naturales YT y la línea celular de mastocitos de ratón MC/9. Una línea celular particularmente preferida para los métodos de la presente invención es RBL-2H3 porque esta línea celular tiene un nivel muy bajo de secreción constitutiva y una elevada secreción inducida de indicadores hidrolasa no proteasa preferidos de la presente invención como una cadena beta de la beta-hexosaminidasa, fosfatasa alcalina secretada o una proteína de fusión entre una luciferasa de Gaussia y una proteína de direccionamiento al gránulo que da lugar a un sensor con una elevada relación entre señal y el fondo.

65

**MODULADORES DE LA EXOCITOSIS USADOS EN LA INVENCION**

La presente invención comprende también moduladores de la exocitosis. En una realización de la presente invención, los moduladores de la exocitosis se seleccionan a partir de compuestos o polipéptidos que inducen un cambio en el nivel de calcio intracelular. En otra realización de la invención, los moduladores de la exocitosis se seleccionan a partir de compuestos o polipéptidos que inducen un cambio en los niveles de AMPc, diacilglicerol (DAG), fosfolípidos o ATP, que a su vez regulan o modulan la exocitosis desencadenada por calcio.

**INDICADORES DE GRÁNULOS ALMACENADOS USADOS EN LA INVENCION**

El indicador más ampliamente utilizado para la secreción de gránulos es la beta-hexosaminidasa endógena, pero esta proteína, como se utiliza, expresada y divulgada en el estado de la técnica, se ha considerado tradicionalmente un indicador de baja sensibilidad con una baja relación entre la señal y el fondo, y una fuerte variabilidad entre los experimentos debido a una gran variación en el tiempo de la cantidad de enzima almacenada en los gránulos (véase el documento PCT/EP2010/004619). Sin embargo, la presente invención demuestra sorprendentemente que la sobreexpresión de la cadena beta de la beta-hexosaminidasa da como resultado un sensor con baja variabilidad y una alta señal respecto al fondo. Además, como se explicó anteriormente, la sobreexpresión de esta glicosidasa no es tóxica para las células cuando se descongelan.

La clasificación de las proteínas solubles entre las vías constitutiva y regulada es claramente compleja y hay suficientes evidencias sobre la especificidad según el tipo celular en la ruta de las proteínas solubles hacia los gránulos de almacenamiento, independientemente del nivel de expresión. Por ejemplo, la amilasa es un constituyente normal del gránulo en células pancreáticas exocrinas y es llevada a los gránulos cuando se transfecta en líneas de células pancreáticas exocrinas, aunque es secretada constitutivamente en las líneas celulares endocrinas transfectadas (véase, por ejemplo, El Meskini, R et al. *Endocrinology* (2001) Vol.142, No. 2 864-873). La especificidad del tipo celular puede explicar algunos de los resultados contradictorios utilizando porciones del extremo amino terminal de la molécula de POMC para estudiar el enrutamiento en varias líneas de células endocrinas y neuronales (véase, por ejemplo, Tam WWH et al. *Eur J Cell Biol* (1993), 62:294-306; Roy P et al. *Mol Cell Endocrinol* (1991), 82:237-250 y Cool DR et al. *J Biol Chem* (1995) 270:8723-8729. La especificidad celular de la clasificación de las proteínas va más allá de las líneas de células, incluyendo cultivos primarios, ya que se pueden manipular los mismos constructos de manera muy diferente en células endocrinas y neuronales primarias. Por lo tanto, los expertos en la materia, podrían utilizar otras células diferentes de las células hematopoyéticas con exocitosis regulada en los métodos de la presente invención, pero la selección de otros tipos de células tiene que hacerse en paralelo con un indicador específico almacenado en alta concentración en los gránulos de secreción de la línea celular seleccionada y con un bajo nivel de secreción basal.

Una propiedad importante para que un indicador almacenado en gránulos de secreción sea útil en los métodos de la presente invención, especialmente en los gránulos de secreción de células de origen hematopoyético, es la resistencia a las duras condiciones ambientales que tiene que soportar este indicador en el interior de los gránulos. Los gránulos de secreción de las células hematopoyéticas están relacionados con los lisosomas, orgánulos que almacenan en su interior un amplio conjunto de hidrolasas tales como catepsinas, triptasas y quimasas a un pH muy ácido y este entorno no es ideal para que una proteína se almacene de forma no natural en dichos orgánulos, por lo tanto un indicador lábil a las proteasas o un indicador lábil al pH, probablemente se degradará dentro de los gránulos de secreción, reduciendo así la sensibilidad de dicha proteína indicadora lábil. Por ejemplo, las proteasas son el principal constituyente proteico exocitado de los mastocitos activados (véase, por ejemplo, Huang et al, *J Clin Immunol*.18:169-183, 1998). Las triptasas, quimasas y carboxipeptidasas son las tres principales familias de proteasas almacenadas en los gránulos de secreción de los mastocitos. Por lo tanto, los indicadores preferidos de la presente invención son polipéptidos con una alta resistencia a la proteólisis y bajo pH en el interior de los gránulos de las células hematopoyéticas de la presente invención. Aunque la coexistencia de las enzimas lisosomales y las serin proteasas hematopoyéticas con varias proteínas antibióticas en los lisosomas secretores indica que es posible el co-almacenamiento sin la degradación, no todos los polipéptidos dirigidos artificialmente a los gránulos de secreción resistirán este duro ambiente. Por ejemplo, Kaur J y Cutler DF (véase Kaur, J and Cutler DF. *J. Biol. Chem.*, (2002) Vol. 277, número 12, 10.498-10.505) han encontrado que una HRP-P-selectina quimérica puede dirigirse tanto a los lisosomas secretores como a los convencionales, pero hasta el 70% de la proteína objetivo fue proteolíticamente degradada.

Los gránulos de secreción de las células hematopoyéticas utilizados en los métodos de la presente invención comparten propiedades con los lisosomas, que son orgánulos que almacenan en su interior un gran grupo de hidrolasas tales como catepsinas, triptasas y quimasas en un entorno de pH muy ácido y, por lo tanto, los indicadores útiles para los métodos de la presente invención deben ser polipéptidos resistentes al medio ambiente dentro de los gránulos de células hematopoyéticas adecuadas.

En una realización de la presente invención, los indicadores útiles se seleccionan de polipéptidos resistentes al medio ambiente en el interior de los gránulos de las células hematopoyéticas, tales como la proteólisis y el bajo pH.

## PROMOTORES PARA LA EXPRESIÓN DEL INDICADOR

Esta invención también comprende promotores adecuados para la expresión de los indicadores. Promotores útiles para la expresión de indicadores almacenados en gránulos de la presente invención son promotores adecuados para la expresión de proteínas en células hematopoyéticas, en particular promotores adecuados para la expresión media a alta de proteínas. Otra propiedad relevante de los promotores adecuados es que la expresión de las proteínas debe ser estable durante el cultivo. Ciertos promotores heterólogos están regulados a la baja durante el cultivo, especialmente en las células hematopoyéticas y este proceso se llama "silenciamiento del promotor". Los promotores preferidos para los métodos de la presente invención son, por lo tanto, promotores no silenciados.

## TECNOLOGÍAS DE DETECCIÓN Y SUSTRATOS

Además de la resistencia al medio ambiente dentro de los gránulos de secreción, la expresión de alto nivel, la baja secreción basal y la elevada secreción inducida, para que un indicador sea útil en los métodos de la presente invención, otras propiedades importantes de los indicadores para la exocitosis regulada para los métodos de detección sensibles de la presente invención, es el tipo de tecnología de detección utilizada para medir el indicador secretado y la eficiencia catalítica de tal indicador para el sustrato específico utilizado para la detección. Tanto las tecnologías de detección altamente sensibles como un indicador con una alta eficiencia catalítica para un sustrato específico son beneficiosos para los métodos de la presente invención.

En una realización de la presente invención, el sustrato utilizado para detectar la hidrolasa no proteasa secretada puede seleccionarse de un sustrato colorimétrico, un sustrato fluorescente o un sustrato quimioluminiscente. Un ejemplo de sustrato para HEXB es 4-Metilumbeliferil N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminida (4MU-Nglc), pero se pueden probar y ensayar otros sustratos de glicosidasas. Ejemplos de sustratos de fosfatasas son el fosfato de 4-metilumbeliferilo y el difosfato de fluoresceína, aunque también pueden ser útiles otros sustratos. Los sustratos para la *Gaussia luciferasa* pueden seleccionarse de coelenterazinas y sus derivados.

## APLICACIONES DEL SENSOR BASADO EN CÉLULAS DE LA PRESENTE INVENCION

Los sensores basados en células de la presente invención son en general útiles para analizar las interacciones entre al menos dos moléculas, una que actúa como el modulador de la exocitosis y otra como ligando específico del modulador de la exocitosis. Por ejemplo, en el descubrimiento de fármacos, se ensayan miles o incluso millones de moléculas pequeñas frente a una diana para encontrar moléculas pequeñas que modifican la actividad de dicha diana. En un ejemplo particular, los compuestos son examinados para detectar agonistas o antagonistas de los receptores acoplados a la proteína G, una clase de receptores muy adecuados para ser reconocidos por fármacos. Pero el mismo sensor tiene aplicaciones en la detección y cuantificación de compuestos que modulan la exocitosis de gránulos, por ejemplo, drogas de abuso en varias muestras, por ejemplo, en la industria alimentaria, muestras ambientales y para el diagnóstico. Los usos del sensor no se limitan a cualquiera de los receptores de la superficie celular o a los pequeños moduladores de los receptores de la superficie. Por ejemplo, con un par de dos moléculas que se unen a una proteína a determinar, se podría llevar a cabo una detección rápida, específica y sensible utilizando el sensor de la presente invención siempre que una de las moléculas que se unen a la proteína a determinar sea una inmunoglobulina E específica y la otra molécula que se une a la proteína a determinar induzca la oligomerización de la proteína a determinar. Otros usos del sensor anterior son para probar compuestos anti-alérgicos y para la detección de alérgenos.

## KITS PARA PROBAR SI UN COMPUESTO MODULA LA EXOCITOSIS

La presente invención comprende también kits para probar si un compuesto modula la exocitosis. Tal kit comprende al menos: una línea celular hematopoyética con exocitosis regulada profesional transfectada con al menos un indicador hidrolasa no proteasa heterólogo bajo el control de un promotor adecuado y un sustrato específico para la detección del indicador proteasa heterólogo secretado. Además, podría utilizarse la línea celular hematopoyética con exocitosis regulada profesional transfectada con un modulador de la exocitosis heterólogo bajo el control de un promotor adecuado, como un GPCR, un receptor Fc gamma I heterólogo o un receptor Fc epsilon I heterólogo o un modulador endógeno de la exocitosis como el receptor Fc epsilon I endógeno (el receptor de IgE). Los kits que utilizan el receptor de IgE como modulador de la exocitosis pueden contener una IgE específica para el analito a determinar y una segunda molécula para inducir la oligomerización del analito unido a la IgE.

Por lo tanto, la primera realización de la presente invención se refiere a un sensor basado en células que comprende:

- a. Una línea de celular hematopoyética con exocitosis regulada de gránulos de secreción;
- b. Un indicador hidrolasa no proteasa almacenado en el gránulo transfectado en la línea celular de (a) y sobreexpresado bajo el control de un promotor constitutivo fuerte o de un promotor inducible fuerte;
- c. Un modulador endógeno o un modulador heterólogo transfectado de la exocitosis regulada de los gránulos de secreción de la línea celular de (a);
- d. Un sustrato impermeable a la célula seleccionado del grupo que comprende: un sustrato colorimétrico, un

sustrato fluorescente o un sustrato luminiscente específico para la detección de una actividad hidrolasa no proteasa secretada;

que permite medir el efecto de un ligando específico sobre el modulador de la exocitosis regulada.

5 En una realización preferida, la hidrolasa no proteasa se selecciona de entre la fosfatasa alcalina secretada (SEAP) de la SEQ ID NO: 1, la cadena beta de la beta-hexosaminidasa (HEXB) (Gene Bank BC017378.2 con fecha 26.01.2012) o una proteína de fusión entre *Gaussia luciferasa* (GLuc) y una proteína de direccionamiento al gránulo (SEQ ID NO: 2); las células se seleccionan del grupo que comprende: la línea celular de leucemia basófila de rata RBL2H3, la línea celular hematopoyética de médula ósea de ratón 32D, la línea celular humana de linfocitos citotóxicos naturales NK92, la línea celular humana de linfocitos citotóxicos naturales YT y la línea celular de mastocitos de ratón MC/9 y el modulador de la exocitosis regulada de los gránulos de secreción es un receptor de superficie endógeno o un receptor de superficie heterólogo transfectado seleccionado del grupo que comprende: receptores acoplados a la proteína G (GPCR), receptores que llevan un motivo ITAM, receptores que llevan un motivo ITIM y receptores proteicos proteína quinasa.

20 La segunda realización de la presente invención se refiere a un método para obtener el biosensor anteriormente mencionado, que comprende transformar una línea celular hematopoyética que lleva un modulador endógeno de la exocitosis regulada de los gránulos de secreción, o que lleva un receptor de superficie heterólogo transfectado bajo el control de un promotor adecuado con un vector que codifica el indicador almacenado en el gránulo bajo el control de un promotor adecuado. En una realización preferida, el vector que codifica el modulador de la exocitosis regulada de los gránulos de secreción también comprende un péptido señal útil para la sobreexpresión de los receptores en la superficie de las células y/o una etiqueta para la detección en la superficie y/o la separación de células positivas.

25 En otra realización preferida, el promotor para la sobreexpresión constitutiva del modulador de la exocitosis regulada de los gránulos de secreción, se selecciona del grupo que comprende el promotor del factor de elongación 1 alfa de mamífero (hEF1alfa) (SEQ ID NO: 3) y el 5'LTR del promotor MoMLV-LTR del virus de la leucemia murina de Moloney (SEQ ID NO: 4). En otra realización preferida, el promotor útil para la sobreexpresión del modulador de la exocitosis regulada de los gránulos de secreción, es un promotor inducible seleccionado del grupo que comprende el promotor inducible de tetraciclina, el promotor inducible de ecdisona, el promotor inducible de cumato y el promotor inducible de progesterona.

35 En otra realización más preferida, el vector para la sobreexpresión de un modulador de la exocitosis regulada de los gránulos de secreción, comprende una secuencia derivada de GPCR viral (VGS), de SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 6 para la sobreexpresión en la superficie.

En otra realización más preferida, el vector para la sobreexpresión constitutiva de un modulador de la exocitosis regulada de los gránulos de secreción es P-MoMLV-5'LTR-SP-cmyc-tag-VGS-MCS-poliA (SEQ ID NO: 7).

40 En otra realización preferida, el promotor para la sobreexpresión constitutiva fuerte de los indicadores almacenados en el gránulo se selecciona del grupo que comprende un promotor quimérico de hCMV y el promotor MoMLV-5'LTR (SEQ ID NO: 4) y el promotor del factor de elongación 1-alfa (SEQ ID NO: 3).

45 En una realización todavía más preferida, el indicador almacenado en el gránulo se sobreexpresa bajo el control de un promotor inducible seleccionado del grupo que comprende promotor inducible de tetraciclina, promotor inducible de ecdisona, promotor inducible de cumato y promotor inducible de progesterona.

50 La tercera realización de la presente invención se refiere a un método de ensayo o de cuantificación de las interacciones entre al menos dos moléculas, una que actúa como el modulador de la exocitosis y la otra como el ligando específico del modulador de la exocitosis, que comprende las etapas de:

- a) incubar el sensor basado en células descrito anteriormente en un medio compatible con la viabilidad celular, la exocitosis y la actividad enzimática de los indicadores almacenados en los gránulos secretados,
- b) añadir un ligando específico del modulador de la exocitosis,
- 55 c) añadir un sustrato específico del indicador almacenado en el gránulo y
- d) detectar la actividad enzimática de hidrolasa no proteasa del polipéptido indicador, liberado de los gránulos en el medio extracelular, con un sustrato específico de dicho indicador liberado.

60 La cuarta realización de la presente invención se refiere al uso del sensor basado en células mencionado anteriormente para la detección de una proteína a la que se unen un par de dos moléculas, en el que una de las moléculas que se unen a la proteína para detectar es una inmunoglobulina G específica o una inmunoglobulina E específica, o una inmunoglobulina A específica y la segunda molécula que se une a la proteína para detectar induce la oligomerización de dicha proteína para detectar, tras la unión.

65 La quinta realización de la presente invención se refiere al uso del sensor basado en células anteriormente citado para analizar las interacciones entre las moléculas en el descubrimiento de fármacos o para cuantificar moléculas

tales como proteínas para diagnóstico o para la detección de fármacos o moléculas en las muestras de la industria alimentaria, en muestras ambientales y en la industria farmacéutica, para el análisis de las interacciones IgE-alérgeno, para analizar los compuestos anti-alérgicos y/o para la detección de alérgenos.

- 5 La sexta realización de la presente invención se refiere a un kit que comprende el sensor basado en células anteriormente citado, para analizar si un compuesto modula la exocitosis o para cuantificar el grado de tal exocitosis. En una realización preferida, el kit comprende al menos un sustrato específico para la detección del indicador heterólogo secretado.

10

## Ejemplos

### 15 **EJEMPLO 1. Desarrollo de líneas celulares estables que expresan la cadena beta de la HEXB humana bajo el control del promotor quimérico hCMV-MoLV5'LTR.**

Se desarrollaron vectores para la expresión estable de la cadena beta de la HEXB humana bajo el control del promotor quimérico hCMV-MoLV5'LTR. En la estructura del vector se incluyó un casete de resistencia a higromicina para la selección de las poblaciones de células estables. El vector incluía también un casete IRES-NGFR clonado en dirección 3' de la HEXB humana y, por tanto, bajo el control del mismo promotor para citometría de flujo y/o la selección de células estables que expresan HEXB.

20 Cada vector se electroporó por separado en RBL-2H3 utilizando un microporador (Digital Bio Technology, Corea del Sur) y después de 48 horas se añadió al cultivo higromicina 1500 µg/ml para la selección. Después de la selección durante aproximadamente 2 semanas, las células se analizaron por citometría de flujo (Guava Technologies, EE.UU.) con un anticuerpo contra NGFR acoplado a FITC. La población positiva fue separada magnéticamente por MACS utilizando anti-NGFR MACS® (Miltenyi Biotec, Alemania). Las poblaciones seleccionadas se analizaron de nuevo mediante citometría de flujo para comprobar la eficacia de la selección. Las células positivas se clonaron mediante dilución limitante a 0,3 células por pocillo de microplacas de 96 pocillos. Los pocillos con colonias en crecimiento se analizaron para la expresión de NGFR mediante citometría de flujo. Tres clones, denominados 1B7-HEXB, 1C4-HEXB y 1F10-HEXB, con expresión positiva para NGFR se expandieron a placas de 6 pocillos junto con las RBL2H3 no transformadas y la población entera de células transfectadas de forma estable (RBL2H3-HEXB).

25 Las células se recogieron con una pipeta, se centrifugaron, se resuspendieron en tampón HBSS, se contaron usando una cámara Neubauer y se ajustaron a 500.000 células por ml. El sustrato utilizado para la determinación de la actividad HEXB fue 4-Metilumbeliferil N-acetil-β-D-glucosaminida (4MU-NGlc) (Sigma-Aldrich, M2133) y se diluyó en HBSS hasta una concentración final de 1 mM en el pocillo de ensayo.

30 Se purificó un anticuerpo monoclonal IgE de ratón contra el hapteno trinitrofenilo a partir del hibridoma IgELb4 adquirido de la ATCC (TIB-141), y se utilizó para inducir la exocitosis a través del entrecruzamiento del receptor de IgE por la IgE unida a TNP conjugado con BSA. El éster TNP-N-hidroxisuccinimida se adquirió en Biosearch Technologies Inc y se conjugó con seroalbúmina bovina (BSA) usando un protocolo estándar. La conjugación se determinó a pH 7,0 midiendo la absorbancia de TNP a 348 nm utilizando 15400 unidades por mol por longitud de paso de luz de 10 mm como el coeficiente de extinción de TNP. La relación molar entre TNP y BSA en el conjugado TNP-BSA fue 18:1 y se calculó asumiendo que el peso molecular de la BSA es 60.000.

35 Se utilizó una microplaca de pared negra de 384 pocillos para el ensayo. Para medir la exocitosis se utilizó una primera mezcla en HBSS de 2 microgramos por ml de anticuerpo IgE IgELb4 y 2 microgramos por ml de TNP-BSA junto con 4MU-NGlc 2 mM. Se utilizó una segunda mezcla como control y esta contenía solo 4MU-NGlc 2 mM sin IgE y sin TNP-BSA. Se utilizó como control ionomicina 10 µM. Los pocillos sin células se utilizaron como blanco. Se añadieron 10 microlitros de células (1B7-HEXB, 1C4-HEXB y 1F10-HEXB, RBL2H3 no transformadas y RBL2H3-HEXB) a cada uno de los 12 pocillos. Se añadieron a seis pocillos 10 microlitros de la mezcla que contiene IgE+TNP-BSA y 4MU-NGlc, mientras que en los otros seis pocillos sólo se añadió 4MU-NGlc. Las placas se incubaron a 37°C y la fluorescencia se leyó a 360 nm de excitación y 470 nm como longitud de onda de emisión en un lector de fluorescencia BMG-Labtech Optima. La lectura se tomó a los 0, 15, 30, 45 y 60 minutos. Se seleccionó 30 minutos como el tiempo para obtener resultados óptimos. Los resultados a los 30 minutos fueron los presentados en la siguiente Tabla 1:

60

Tabla 1

CÉLULAS	FLUORESCENCIA (IgE+ TNP-BSA, exocitosis específica)	FLUORESCENCIA (sin IgE+TNP-BSA, liberación de fondo)
RBL2H3	6,424 +/- 584	2,056 +/- 30
RBL2H3-HEXB (población estable completa)	14,149 +/- 309	2,908 +/- 77
clon 1C4-HEXB	39,185 +/- 1,024	6,302 +/- 132
clon 1F10-HEXB	17,378 +/- 362	4,394 +/- 83
clon 1B7-HEXB	28,554 +/- 790	2,611 +/- 61
Sin células	1,203 +/- 42	1,176 +/- 47

Los resultados anteriores indican que la sobreexpresión de la cadena beta de la HEXB en células RBL2H3, produce una enzima funcional, tal como se mide con 4MU-NGlc, que se almacena en el interior de los gránulos y se libera específicamente por exocitosis. A partir de los datos anteriores se calcula la liberación específica y el fondo restando la fluorescencia de los pocillos sin células. En toda la población transfectada de forma estable, la señal específica se incrementa 2,48 veces con respecto a las células RBL2H3 parentales, mientras que el fondo aumentaba 1,97 veces, es decir, la señal específica aumentó más que la liberación de fondo y esto indica que los usos de las células transfectadas como sensores es mejor que el uso de células parentales. La señal específica respecto al fondo (S/F) de las células RBL2H3 en este experimento era 5,9 veces, mientras que la S/F para las células RBL2H3-HEXB era 8,2 veces. Los clones seleccionados por dilución limitante de toda la población RBL2H3-HEXB ha aumentado la liberación específica, pero también en algunos casos ha aumentado la liberación de fondo, como por ejemplo en el clon 1C4-HEXB, donde la señal específica se incrementa 7,40 veces con respecto a RBL2H3, mientras que para el fondo se incrementa 5,82 veces con respecto a RBL2H3. Por lo tanto, el clon 1C4-HEXB tiene una S/F de 7,53 veces. Pero clones como 1B7-HEXB tiene 1,63 veces más fondo que RBL2H3, mientras que la liberación específica es 5,24 veces mayor que la de RBL2H3. De este modo, la S/F del clon 1B7-HEXB es 19. Aún más importante es el hecho de que la producción de 1B7-HEXB y la liberación de HEXB es extremadamente regular, mientras que la de RBL2H3 tiene una variabilidad muy fuerte a lo largo del tiempo. Usando las mismas condiciones que antes, se cultivaron RBL2H3 y 1B7-HEXB durante 2 meses y la exocitosis se midió como antes cada mes. La señal respecto al fondo (S/F) de RBL2H3 fue del 5,9 (mes 0), 2,8 (1 mes) y 4,3 (mes 2), mientras que la señal de fondo de 1B7-HEXB fue de 19 (mes 0), 17 (mes 1) y 22 (mes 2). Los resultados anteriores confirman por qué la exocitosis de las células RBL2H3 siempre se mide como un porcentaje para la normalización de la fuerte variabilidad natural que se observa en las células RBL2H3 (en los resultados anteriores no había una reducción del 63% de S/F entre el mes 0 y el mes 1). Pero las células 1B7-HEXB se comportaron mucho mejor y la relación S/F, aunque todavía variable como corresponde a las células vivas, es más estable (en los resultados anteriores la máxima variabilidad fue un 22% entre el mes 2 y el mes 3).

Por lo tanto, los resultados anteriores confirman que las células que sobreexpresan la cadena beta de la HEXB son útiles como sensores para medir la exocitosis y que esos sensores que sobreexpresan la HEXB son mejores que los sensores del estado actual de la técnica que comprenden las células RBL2H3 no transfectadas naturales.

**EJEMPLO 2. Desarrollo de líneas celulares estables que expresan otras hidrolasas no proteasas bajo el control del promotor quimérico hCMV-MoLV5'LTR.**

Con el fin de demostrar que la sobreexpresión de las hidrolasas no proteasas es un concepto general que no se limita a la HEXB, sino que otras proteínas pueden redirigirse a gránulos y utilizarse para medir la exocitosis, se desarrollaron vectores para la expresión estable de la fosfatasa alcalina secretable (SEAP) humana, bajo el control del promotor quimérico hCMV-MoLV5'LTR, y también se desarrollaron vectores para la expresión estable de la *Gussia luciferasa princeps* clonada en fase como una proteína de fusión en dirección 3' de la granzima B (GZB-GLuc) utilizada como una proteína de direccionamiento hacia el gránulo, con la serina de la posición 193 mutada a alanina para la inactivación de la actividad. En la estructura del vector se incluyó un casete de resistencia a higromicina para la selección de las poblaciones de células estables. El vector incluía también un casete IRES-NGFR clonado en dirección 3' de la SEAP humana o GZB-Luc y, por tanto, bajo el control del mismo promotor para citometría de flujo y/o la selección de células estables que expresan SEAP y/o GZB-gLuc.

Cada vector se electroporó en RBL-2H3 por separado utilizando un microporador (Digital Bio Technology, Corea del Sur) y después de 48 horas se añadió al cultivo higromicina 1500 µg/ml para la selección. Después de la selección durante aproximadamente 2 semanas, las células se analizaron por citometría de flujo (Guava Technologies, EE.UU.) con un anticuerpo contra NGFR acoplado a FITC. La población positiva fue separada magnéticamente por MACS utilizando anti-NGFR MACS® (Miltenyi Biotec, Alemania). Las poblaciones seleccionadas se analizaron de nuevo mediante citometría de flujo para comprobar la eficacia de la selección.

Para la SEAP, las células positivas se clonaron mediante dilución limitante a 0,3 células por pocillo de microplacas de 96 pocillos. Los pocillos con colonias en crecimiento se analizaron para la expresión de NGFR por citometría de flujo. Un clon, 2D1-SEAP, se seleccionó mediante citometría de flujo y actividad de la SEAP usando el sustrato de

fosfatasa 4-MUP (Sigma-Aldrich, M3168). La actividad de la SEAP debida a la exocitosis se midió como en el ejemplo 1, es decir, mezclando 10 microlitros de células en suspensión (5.000 células) con 10 microlitros de difosfato de fluoresceína (Marker Gene Technologies, M1034) que contiene tanto IgELb4 como TNP-BSA. Se utilizaron células RBL2H3 como control y los pocillos sin células se utilizaron también como blanco. Como control positivo se usó ionomicina.

Las placas se incubaron a 37°C y la fluorescencia se leyó a una longitud de onda de 485 nm de excitación y de 535 nm de emisión en un lector de fluorescencia BMG-Labtech Optima. Se hicieron lecturas a los 0, 15, 30, 45 y 60 minutos. Se seleccionó 30 minutos como el tiempo para obtener resultados óptimos. Los resultados a los 30 minutos fueron los presentados en la siguiente Tabla 2:

Tabla 2

CÉLULAS	FLUORESCENCIA (IgE+ TNP-BSA, exocitosis específica)	FLUORESCENCIA (sin IgE+TNP-BSA, liberación de fondo)
RBL2H3	29,913 +/- 1,132	6,882 +/- 68
clon 2D1-SEAP	62,898 +/- 3,254	8,496 +/- 111
SIN CÉLULAS	5,982 +/- 42	6,142 +/- 54

Los resultados anteriores indican que normalmente las células RBL2H3 producen altos niveles de fosfatasa y que la sobreexpresión aumenta tales niveles, ya que la fluorescencia específica a los 30 minutos es 2,38 veces mayor en el clon 2D1 que en las células RBL2H3. También el fondo aumenta y es 3,18 veces mayor en 2D1 que en las células RBL2H3. De hecho, en el experimento anterior la relación S/F es mejor en las células RBL2H3 (S/F = 32,3) que en las células 2D1 (S/F = 24,2). Pero cuando S/F se mide en el transcurso de 60 días, la S/F de 2D1 era casi constante (S/F = 25,1 en el mes 1 y 24,9 en el mes 2), mientras que S/F para RBL2H3 era muy variable (S/F = 17,9 en el mes 1 y 5,34 en el mes 2). Los resultados anteriores ilustran el hecho de que el efecto de la sobreexpresión de la proteína es no sólo aumentar la cantidad de enzimas almacenadas en los gránulos, sino también reducir la variabilidad normalmente asociada con la exocitosis en RBL2H3 y, por lo tanto, se pueden desarrollar mejores sensores mediante la sobreexpresión de hidrolasas no proteasas en gránulos de células con exocitosis profesional. Este ejemplo también indica que una enzima que normalmente no se almacena en gránulos, tal como la fosfatasa alcalina secretable, que se secreta en otras líneas celulares como HEK293, Jurkat y células CHO-K1, se puede almacenar de forma natural en el interior de los gránulos cuando se transfecta en células con exocitosis profesional.

Con el fin de ampliar aún más el concepto general de que la sobreexpresión de hidrolasas no proteasas produce mejores sensores, el vector de expresión de *Gaussia luciferasa* clonado en fase en dirección 3' de la granzima B humana, inactivada por mutación de la serina de la posición 193 a alanina, se transfectó en RBL2H3 y se seleccionaron las células con higomicina. Normalmente *Gaussia luciferasa* es una enzima secretable incluso cuando se transfecta sola en células RBL2H3 (datos no mostrados). Pero cuando se fusionaba con la granzima B, la *Gaussia luciferasa* se almacenaba en gránulos. Un vector similar, pero usando *luciferasa de luciérnaga* fusionada en dirección 3' de la granzima B no produjo actividad *luciferasa* ni en el sobrenadante ni en los medios de exocitosis (datos no presentados), lo que indica que las enzimas que pueden ser almacenadas en los gránulos deben ser enzimas que resisten a los medios intracelulares con bajo pH y a varias proteasas que están presentes dentro de dichos gránulos. La población completa de células transfectadas con GZB-gluc fue 56% positivo para NGFR. Como la señal de la *Gaussia luciferasa* es un flash (no una señal estable), se realizó la exocitosis durante 30 minutos utilizando IgELb4 y TNP-BSA o BSS solo y el sobrenadante correspondiente a 100.000, 50.000, 25.000 y 12.500 células se incubó en una placa de pared negra de 384 pocillos con coelenterazina nativa a una concentración final de 16,6 micromolar como sustrato (Biosynth AG, C-7000). El tampón de ensayo fue Tris-HCl 10 mM pH = 7,8, EDTA 1 mM y NaCl 600 mM. Los resultados se midieron con un FL Fluoroskan Ascent de Thermo Labsystems. Ver Tabla 3.

Tabla 3

CÉLULAS	LUMINISCENCIA (IgE+ TNP-BSA, exocitosis específica)	LUMINISCENCIA (sin IgE+TNP-BSA, liberación de fondo)
100.000 GZB-gluc	6,281	534
50.000 GZB-gluc	4,707	213
25.000 GZB-gluc	3,775	137
12.500 GZB-gluc	997	71
Sin células	24.2	28,6

Los resultados anteriores demuestran que las hidrolasas no proteasas que normalmente no se almacenan en los gránulos de células con exocitosis regulada profesional pueden ser redirigidos artificialmente al gránulo mediante el uso de un polipéptido de direccionamiento al gránulo tal como la granzima B y que dichas hidrolasas no proteasas almacenadas en el gránulo producen sensores útiles para medir la exocitosis. Utilizando 12.500 células, la señal de fondo era 22,94. Por lo tanto, la sobreexpresión de las hidrolasas no proteasas en el interior de los gránulos produce sensores que son mejores para medir la exocitosis que los sensores disponibles actuales.

**EJEMPLO 3. Congelación y descongelación de líneas celulares que sobreexpresan hidrolasas no proteasas en el interior de los gránulos.**

5 Este ejemplo ha sido diseñado para demostrar la estabilidad de los sensores que llevan diferentes hidrolasas no proteasas. El clon 1B7-HEXB, el clon 2D1-SEAP, las células parentales RBL2H3 y RBL2H3-GRZB se congelaron a razón de 4 millones de células por crio tubo en 1 ml de medio de congelación (medios de cultivo celular + DMSO 10%). Las células se congelaron en un recipiente de crio-congelación "Mr Frosty" (Nalgene, ahora Thermo, 5100-0001) con alcohol isopropílico y un congelador de -80°C durante 24 horas y después se almacenaron en fase de vapor de nitrógeno líquido. La descongelación se hizo de la siguiente manera: el criotubo se colocó en un baño de agua a 37°C hasta que las células se descongelaron y se añadieron 9 ml de medio de cultivo a cada vial de células. 10 Las células se centrifugaron a continuación y se determinó la viabilidad por exclusión del azul de tripano. Se cultivaron las células y se estimó otra vez la viabilidad después de 24 horas de cultivo, ya que las células viables sanas eran adherentes mientras que las células desprendidas no eran sanas. Los resultados fueron los siguientes: la viabilidad inmediatamente después de la descongelación fue más del 95% para 1B7-HEXB, 2D1-SEAP y RBL2H3 15 y las células eran brillantes y las membranas eran regulares y redondas. La viabilidad de RBL2H3-GRZB era más del 90% pero alrededor del 30-40 por ciento de las células presentaban protuberancias irregulares en la membrana plasmática indicativas de apoptosis temprana. De hecho, más del 90% de las células de 1B7-HEXB, 2D1-SEAP y RBL2H3 estaban unidas a la parte inferior de los frascos de cultivo de plástico (una medida de la salud de las células) y vivas mientras que alrededor del 30-40% de las células RBL2H3-GZB murieron y estaban en suspensión. 20 En realidad, el nivel de unión de las células al matraz es una indicación de la tasa de supervivencia de las células (viabilidad). Este ejemplo, ilustra el hecho de que las hidrolasas no proteasa tienen menor toxicidad que las hidrolasas no proteasa cuando las células se descongelaban y que tienen una ventaja sobre las proteasas para el desarrollo de sensores sensibles y estables.

25

**LISTADO DE SECUENCIAS**

30 <110> Canvax Biotech S.L.  
 <120> Sensor basado en células  
 <130> PCT-05155  
 35 <160> 7  
 <170> BiSSAP 1.0  
 40 <210> 1  
 <211> 1560  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 45 <220>  
 <221 > fuente  
 <222> 1..1560  
 <223> /mol\_type="ADN" /note="fosfatasa alcalina secretable (SEAP)" /organism="Secuencia artificial"  
 50 <400> 1

ES 2 568 879 T3

atgctgctgc tgctgctgct gctgggcctg aggctacagc tctccctggg catcatccca 60  
gttgaggagg agaaccggga cttctggaac cgcgaggcag ccgaggccct gggtgccgcc 120  
aagaagctgc agcctgcaca gacagccgcc aagaacctca tcatcttccct gggcgatggg 180  
atgggggtgt ctacggtgac agctgccagg atcctaaaag ggcagaagaa ggacaaactg 240  
gggcctgaga taccocctggc catggaccgc ttcccatatg tggctctgtc caagacatac 300  
aatgtagaca aacatgtgcc agacagtgga gccacagcca cggcctacct gtgcggggtc 360  
aagggcaact tccagacat tggttgagt gcagccgccc gctttaacca gtgcaacacg 420  
acacgaggca acgaggtcat ctccgtgatg aatcgggcca agaaagcagg gaagtcatgt 480  
ggagtggtaa ccaccacacg agtgcagcac gcctcgccag ccggcaccta cgcaccacacg 540  
gtgaaccgca actggtactc ggacgcccgc gtgcctgcct cggcccgcga ggagggtgtc 600  
caggacatcg ctacgcagct catctccaac atggacattg acgtgatcct aggtggaggc 660  
cgaaagtaca tgtttcgcat gggaaaccca gaccctgagt acccagatga ctacagccaa 720  
ggtgggacca ggctggacgg gaagaatctg gtgcaggaat ggctggcgaa gcgccagggt 780  
gcccggtatg tgtggaaccg cactgagctc atgcaggctt cctgggacc gtctgtgacc 840  
catctcatgg gtctctttga gcctggagac atgaaatag agatccaccg agactccaca 900  
ctggaccct cctgatgga gatgacagag gctgccctgc gcctgctgag caggaacccc 960  
cgcggttct tctcttctgt ggagggtggt cgcctcgacc atggtcatca tgaagcagg 1020  
gcttaccggg cactgactga gacgatcatg ttgacgacg ccattgagag ggcgggccag 1080  
ctcaccagcg aggaggacac gctgagcctc gtcactgcc accactccca cgtcttctcc 1140  
ttcggaggct accccctgcg agggagctcc atcttcgggc tggccctgg caaggcccg 1200  
gacaggaagg cctacacggt cctcctatac ggaaacggtc caggctatgt getcaaggac 1260  
ggcgcccggc cggatgttac cgagagcgag agcgggagcc ccgagtatcg gcagcagtca 1320  
gcagtgcccc tggacgaaga gaccacgca ggcgaggacg tggcgggtgtt cgcgcgcggc 1380  
ccgcaggcgc acctggttca cggcgtgag gagcagacct tcatagcgca cgtcatggcc 1440  
ttcgccgect gcctggagcc ctacaccgcc tgcgacctgg cgcctccgc cggcaccacc 1500  
gacgcgcgcg acccgggtta ctctagagtc ggggdcggccg gccgcttca gcagacatga 1560

<210>2  
<211> 1254  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

5

<220>  
<221 > fuente  
<222> 1..1254  
<223> /mol\_type="ADN" /note="fusión entre Gaussia lucifera (GLuc) y una proteína de dirección a gránulos"  
/organism="Secuencia artificial"

10

<400>2

15

ES 2 568 879 T3

```

atgcaaccaa tcttgcctct gctggccttc ctctgctgc ccagggcaga tgcaggggag      60
atcatcgggg gacatgaggg caagccccac tcccgcctct acatggctta tcttatgato      120
tgggatcaga agtctctgaa gaggtgcggg ggcttcctga tacaagacga ettctgctg      180
acagctgctc actgttgggg aagctccata aatgtcacct tgggggcccc caatatcaaa      240
gaacaggagc cgaccagca gtttatccct gtgaaaagac ccatccccc tccagcctat      300
aatcctaaga acttctccaa cgacatcatg ctactgcagc tggagagaaa ggccaagcgg      360
accagagctg tgcagcccct caggctacct agcaacaagg cccaggtgaa gccagggcag      420
acatgcagtg tggccggctg ggggcagacg gccccctgg gaaaacactc acacacacta      480
caagaggaga agatgacagt gcaggaagat cgaaagtgcg aatctgactt acgccattat      540
tacgacagta ccattgagtt gtgcgtgggg gaccagaga ttaaaaagac ttcctttaag      600
ggggatgctg gagggcccct tgtgtgtaac aaggtggccc agggcattgt ctctatgga      660
cgaaacaatg gcatgcctcc acgagcctgc accaaagtct caagctttgt aactggata      720
aagaaaacca tgaacgcta caccggtaag ccaacagaga acaatgagga cttcaacatc      780
gtggccgtgg caagcaactt cgccacaacc gacctggatg ctgacagggg caagttgccc      840
ggaaagaagc tgcccctgga ggtgctgaag gagatggagg ccaacgccag gaaggctggc      900
tgcaccaggg gctgtctgat ctgcctgtcc cacatcaagt gcaccccca gatgaagaag      960
ttcatcccag gaagatgcca cacctacgag ggagacaagg agagcgcccc gggcggcatc     1020
ggagaggcca tctgtgacat ccctgagatc cccggttca aggacctgga gcccatggag     1080
cagttcatcg cccaggtgga cctgtgcgtg gactgcacca ccggctgcct gaagggcctg     1140

gccaacgtgc agtgctccga tctgctgaag aagtggctgc cccagagatg cgccaccttc     1200
gccagcaaga tccagggcca ggtggacaag atcaaggcgg ccggcggcga ctaa             1254

```

```

5 <210>3
  <211> 1205
  <212> ADN
  <213> Secuencia artificial

10 <220>
  <221> > fuente
  <222> 1..1205
  <223> /mol_type="ADN" /note="Promotor alfa del factor de elongación humano 1" /organism="Secuencia
    artificial"

15 <400> 3

```

ES 2 568 879 T3

```

ttgctgactt gcgtgaggct ccggtgcccg tcagtgggca gagcgacat cccccacagt      60
ccccgagaag ttggggggag gggtcggcaa ttgaaccggt gcctagagaa ggtggcgagg      120
ggtaaacctgg gaaagtgatg tcgtgtactg gctccgcctt tttcccgagg gtgggggaga      180
accgtatata agtgcagtag tcgccgtgaa cgttcttttt cgcaacgggt ttgccgccag      240
aacacaggta agtgcctgtg gtggttcccg cgggcctggc ctctttacgg gttatggccc      300
ttgctgcctt tgaattactt ccacgccctt ggctgcagta cgtgattcct gatcccgagc      360
ttcgggttgg aagtgggtgg gagagtcca ggccttgcgc ttaaggagcc ccttcgctc      420
gtgcttgagt tgaggcctgg cctgggcctt ggggccgccg cgtgcgaatc tggtgccacc      480
ttcgcgcctg tctcgtctgt ttcgataagt ctctagccat ttaaattttt tgatgacctg      540
ctgcgacgct tttttctgg caagatagtc ttgtaaatgc gggccaagat ctgcacactg      600
gtatttcggt ttttggggcc gcgggcggcg acggggcccc tgcgtcccag cgcacatggt      660
cggcgaggcg gggcctgcga gcgcggccac cgagaatcgg acgggggtag tctcaagctg      720
gccggcctgc tctggtgctt ggcctcgcgc cgcctgtat cccccgcc tggcgggcaa      780
ggctggcccc gtcggcacca gttgcgtgag cggaaagatg gccgcttccc ggcctgctg      840
cagggagctc aaaatggagg acgcggcctt cgggagagcg ggcgggtgag tcacccacac      900
aaagaaaag ggcctttccg tcctcagccg tcgcttcagc tgactccacg gactaccggg      960
cgccgtccag gcacctcgat tagttctcga gcttttggag taogtcgtct ttaggttggg     1020
gggaggggtt ttatgcgatg gagtttcccc aactgagtg ggtggagact gaagttaggc     1080
cagcttgcca cttgatgtaa ttctccttgg aatttgcctt ttttgagttt ggatcttggg     1140
tcattctcaa gctcagaca gtggttcaaa gttttttctt tccatttcag gtgtcgtgct     1200
agctt                                                                                   1205

```

<210>4  
 <211> 479  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <221 > fuente  
 <222> 1..479  
 <223> /mol\_type="ADN" /note="Promotor MoMLV-5'LTR" /organism="Secuencia artificial"

10

<400> 4

ES 2 568 879 T3

```

    agtctccaga aaaagggggg aatgaaagac cccacctgta ggtttgcaa gctagcttaa      60
    gtaacgccat tttgcaaggc atggaaaaat acataactga gaatagagaa gttcagatca      120
    aggtcaggaa cagatggaac agctgaatat gggccaaaca ggatatctgt ggtaagcagt      180
    tctgccccg gctcagggcc aagaacagat ggaacagctg aatatgggcc aaacaggata      240
    tctgtggtaa gcagttcctg ccccggtca gggccaagaa cagatggtcc ccagatgctg      300
    tccagccctc agcagtttct agagaacct cagatgttcc cagggtgccc caaggacctg      360
    aatgaccct gtgccttatt tgaactaacc aatcagttcg cttctcgtt ctgttcgcgc      420
    gcttctgctc cccgagctca ataaaagagc ccacaacccc tcaactgggg cgccagtcc      479
  
```

```

5  <210>5
    <211> 105
    <212> ADN
    <213> Secuencia artificial

10 <220>
    <221 > fuente
    <222> 1..105
    <223> /mol_type="ADN" /note="Secuencia derivada de GPCR viral heteróloga (VGS)" /organism="Secuencia
    artificial"
  
```

```

15 <400>5

    ctgagcaciaa tggccccagg ctccaccgtg ggaacactcg atgccaacat gaccagcgtg      60
    aatgccacag aggacgctg caccaagagc tacagcgcct tctc                          105
  
```

```

20 <210>6
    <211> 36
    <212> ADN
    <213> Secuencia artificial

25 <220>
    <221 > fuente
    <222> 1..36
    <223> /mol_type="ADN" /note="Secuencia derivada de GPCR viral heteróloga (secuencia más corta que VGS)"
    /organism="Secuencia artificial"
  
```

```

30 <400> 6
    ctgagcaciaa tggccccagg ctccaccgtg ggaaca 36
  
```

```

35 <210>7
    <211> 5348
    <212> ADN
    <213> Secuencia artificial
  
```

```

40 <220>
    <221 > fuente
    <222> 1..5348
    <223> /mol_type="ADN" /note="Vector con la estructura PMo-MLV-5'LTR-SP-cmyc-VGS-MCS-polyA"
    /organism="Secuencia artificial"
  
```

```

<400>7
  
```

ES 2 568 879 T3

gacggatcgg gagatctccc gatcccctat ggtgcaactct cagtacaatc tgctctgatg 60  
ccgcatagtt aagccagtat ctgctccctg cttgtgtggt ggaggtcgct gagtagtgcg 120  
cgagcaaaat ttaagctaca acaaggcaag gcttgaccga caattgcatg aagaatctgc 180  
ttagggttag gcgttttgcg ctgcttcgtg atatcgaatt cagtctccag aaaaaggggg 240  
gaatgaaaga ccccacctgt aggtttggca agctagctta agtaacgccca ttttgcaagg 300  
catggaaaaa tacataactg agaatagaga agttcagatc aaggtcagga acagatggaa 360  
cagctgaata tgggccaaac aggatatctg tggtaagcag ttcctgcccc ggctcagggc 420  
caagaacaga tggaacagct gaatatgggc caaacaggat atctgtggta agcagttcct 480  
gccccggctc agggccaaga acagatggtc cccagatgcg gtccagccct cagcagtttc 540  
tagagaacca tcagatgttt ccagggtgcc ccaaggacct gaaatgacct tgtgccttat 600  
ttgaaactaac caatcagttc gcttctcgct tctgttcggg cgcttctgct ccccgagctc 660  
aataaaagag cccacaacct ctcaactcggg gcgccagtc aagcttggtc ccgagctcgg 720  
atcgatcatg gagacagaca cactcctgct atgggtactg ctgctctggg ttccaggttc 780  
caccggtgac gaacaaaaac tcatctcaga agaggatctg gggccatcgc gactgagcac 840  
aatggcccca ggctccaccg tgggaacact cgagggatcc gcggccgctc tagagggccc 900  
tattctatag tgtcacctaa atgctagagc tcgctgatca gcctcgactg tgccttctag 960  
ttgccagcca tctgttgttt gccctcccc cgtgccttc ttgacctg aaggtgccac 1020  
tcccactgtc ctttctaat aaaatgagga aattgcatcg cattgtctga gtaggtgtca 1080  
ttctattctg gggggtgggg tggggcagga cagcaagggg gaggattggg aagacaatag 1140  
caggcatgct ggggatgagg tgggctctat ggcttctgag gcggaaagaa ccagctgggg 1200  
ctctaggggg tatccccacg cgcctgtag cggcgatta agcgcggcgg gtgtggtggt 1260  
tacgcgcagc gtgaccgcta caattgccag cgcctagcg cccgctcctt tcgctttctt 1320  
cccttccttt ctgcacagt tcgccgctt tccccgtaa gctctaaatc ggggctccc 1380  
tttagggttc cgatttagtg ctttacggca cctcgacccc aaaaaacttg attaggtga 1440  
tggttcacgt agtgggcat cgcctgata gacggttttt cgcctttga cgttggagtc 1500  
cacgttcttt aatagtggac tcttgtcca aactggaaca aactcaacc ctatctcggg 1560

ES 2 568 879 T3

ctattctttt gatttataag ggattttgcc gatttcggcc tattggttaa aaaatgagct 1620  
gatttaacaa aaatttaacg cgaattaatt ctgtggaatg tgtgtcagtt aggggtgtgga 1680  
aagtccccag gctccccagc aggcagaagt atgcaaagca tgcattctca ttagtcagca 1740  
accagggtgtg gaaagtcccc aggtccccca gcaggcagaa gtatgcaaag catgcatctc 1800  
aattagtcag caaccatagt cccgccccta actccgcca tcccgccct aactccgcc 1860  
agttccgcc attctccgcc ccatggctga ctaattttt ttatttatgc agaggccgag 1920  
gccgcctctg cctctgagct attccagaag tagtgaggag gcttttttg aggcctagc 1980  
ttttgcaaaa agctcccggg agcttgata tccattttcg gatctgatca agagacagga 2040  
tgaggatcgt ttcgcatgat tgaacaagat ggattgcaag caggttctcc ggccgcttg 2100  
gtggagaggc tattcggcta tgactgggca caacagacaa tcggctgctc tgatgccgc 2160  
gtgttccggc tgtcagcga ggggcgccg gttcttttg tcaagaccga cctgtccggt 2220  
gccctgaatg aactgcagga cgaggcagc cgctatcgt ggctggccac gacggcggt 2280  
ccttgccag ctgtgctga cgttgctact gaagcgggaa gggactggct gctattgggc 2340  
gaagtgccg ggcaggatct cctgtcatct cacctgtctc ctgccagaa agtatccatc 2400  
atggctgatg caatgcggcg gctgcatacg cttgatccg ctacctgcc attcgaccac 2460  
caagcgaac atcgcatga gcgagcacgt actcggatgg aagccggtct tgcgatcag 2520  
gatgatctgg acgaagagca tcaggggctc gccccagccg aactgttctc caggctcaag 2580  
ggcgcgatgc ccgacggcga ggatctctc gtgaccatg gcgatgcctg cttgccgaat 2640  
atcatggtgg aaaatggccg cttttctgga ttcactgact gtggccggct ggggtgtggc 2700  
gaccgctatc aggacatagc gttggctacc cgtgatattg ctgaagagct tggcggcga 2760  
tgggctgacc gcttctcgt gctttacggg atcgcgctc ccgattcgca gccatcgcc 2820  
ttctatcgcc ttcttgacga gttcttctga gcgggactct ggggttcgaa atgaccgacc 2880  
aagcagcgc caacctgcca tcacgagatt tcgattccac cgcgccttc tatgaaaggt 2940  
tgggcttcgg aatcgttttc cgggagccg gctggatgat cctccagcgc ggggatctca 3000  
tgctggagtt cttoGCCac cccaacttgt ttattgcagc ttataatggg tacaaataaa 3060  
gcaatagcat cacaaattc acaataaag ctttttttc actgcattct agttgtggtt 3120  
tgtccaaact catcaatgta tcttatcatg tctgtatacc gtcgacctct agctagagct 3180  
tggcgtaate atggcatag ctgtttctg tgtgaaattg ttatccgctc acaattccac 3240  
acaacatacg agccggaagc ataaagtgt aagcctggg tgccaatga gtgagctaac 3300  
tcacattaat tgcgttgcgc tcactgcccg cttccagtc gggaaacctg tcgtgccagc 3360  
tgcattaatg aatcggccaa cgcgcgggga gaggcggttt gcgtattggg cgctcttccg 3420  
cttctcgt cactgactcg ctgcgctcgg tcgttcggct gggcgagcg gtatcagctc 3480  
actcaaagc ggtaatacgg ttatccacag aatcagggga taacgcagga aagaacatgt 3540

ES 2 568 879 T3

gagcaaaagg ccagcaaaag gccaggaacc gtaaaaaggc cgcgttgctg gcgtttttcc 3600  
ataggctccg cccccctgac gagcatcaca aaaatcgacg ctcaagtcag aggtggcgaa 3660  
accgcagcag actataaaga taccaggcgt ttccccctgg aagctccctc gtgcgctctc 3720  
ctgttccgac cctgcccgtt accggatacc tgtccgcctt tctcccttcg ggaagcgtgg 3780  
cgctttctca tagctcacgc tgtaggtatc tcagttcggg gtaggtcgtt cgctccaage 3840  
tgggctgtgt gcacgaacct cccggttcagc ccgaccgctg cgccttatcc ggtaactatc 3900  
gtcttgagtc caaccggta agacacgact tatcgccact ggcagcagcc actggtaaca 3960  
ggattagcag agcaggtat gtaggcggtg ctacagagtt cttgaagtgg tggcctaact 4020  
acggctacac tagaagaaca gtatttggtg tctgcgctct gctgaagcca gttaccttcg 4080  
gaaaaagagt tggtagctct tgatccggca aacaaaccac cgctggtagc ggtttttttg 4140  
tttgcaagca gcagattacg cgcagaaaaa aaggatctca agaagatcct ttgatctttt 4200  
ctacggggtc tgacgctcag tggaacgaaa actcacgta agggattttg gtcatgagat 4260  
tatcaaaaag gatcttcacc tagatccttt taaattaa atgaagtttt aaatcaatct 4320  
aaagtatata tgagtaaact tggctctgaca gttaccaatg cttaatcagt gaggcaccta 4380  
tctcagcgat ctgtctatct cgttcatcca tagttgcctg actccccgtc gtgtagataa 4440  
ctacgatacg ggagggctta ccatctggcc ccagtctgc aatgataccg cgagaccac 4500  
gctcaccggc tccagattta tcagcaataa accagccagc cggaaagggc gagcgcagaa 4560  
gtggtcctgc aactttatcc gcctccatcc agtctattaa ttggtgcccg gaagctagag 4620  
taagtagttc gccagttaat agtttgcgca acgttgttc cattgctaca ggcacgtgg 4680  
tgtcacgctc gtcgtttgg atggcttcat tcagctccgg tccccacga tcaaggcgag 4740  
ttacatgatc ccccatggtg tgcaaaaaag cggtagctc cttcggctct ccgatcgttg 4800  
tcagaagtaa gttggccgca gtgttatcac tcatggttat ggcagcactg cataattctc 4860  
ttactgtcat gccatccgta agatgctttt ctgtgactgg tgagtactca accaagtcac 4920  
tetgagaata gtgtatgagg cgaccgagtt gctcttgccc ggcgtcaata cgggataata 4980  
ccgcgccaca tagcagaact ttaaaagtgc tcatcattgg aaaacgttct tcggggcgaa 5040  
aactctcaag gatcttaccg ctggtgagat ccagttcgat gtaaccact cgtgcacca 5100  
actgatcttc agcatctttt actttcacca gcgtttctgg gtgagcaaaa acaggaaggc 5160  
aaaaagccgc aaaaaaggga ataagggcga cacggaaatg ttgaatactc atactcttcc 5220  
tttttcaata ttattgaagc atttatcagg gttattgtct catgagcgga tacatatttg 5280  
aatgtattta gaaaaataaa caaatagggg ttccgcgcac atttccccga aaagtgccac 5340  
ctgacgtc 5348

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Un sensor basado en células que comprende:
- a. Una línea celular hematopoyética con exocitosis regulada de gránulos de secreción;
  - b. Un indicador hidrolasa no proteasa almacenado en el gránulo transfectado en la línea celular de (a) y sobreexpresado bajo el control de un promotor constitutivo fuerte o de un promotor inducible fuerte;
  - 10 c. Un modulador endógeno o un modulador heterólogo trasfectado, de la exocitosis regulada de los gránulos de secreción de la línea celular de (a);
  - d. Un sustrato impermeable a la célula seleccionado del grupo que comprende: un sustrato colorimétrico, un sustrato fluorescente o un sustrato luminiscente específico, para la detección de una actividad hidrolasa no proteasa secretada;
- 15 que permite medir el efecto de un ligando específico sobre el modulador de la exocitosis regulada.
2. Sensor basado en células, de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el indicador hidrolasa no proteasa se selecciona de fosfatasa alcalina secretada (SEAP) de SEQ ID NO:1, la cadena beta de la beta-hexosaminidasa (HEXB) (Gene Bank BC017378.2) o una proteína de fusión entre *Gaussia luciferasa* (GLuc) y una proteína de direccionamiento a los gránulos (SEQ ID NO: 2).
- 20 3. El sensor basado en células de la reivindicación 1, en el que las células se seleccionan del grupo que comprende: la línea celular de leucemia basófila de rata RBL2H3, la línea celular hematopoyética de médula ósea de ratón 32D, la línea celular humana de linfocitos citolíticos naturales NK92, la línea celular humana de linfocitos citolíticos naturales YT y la línea celular de mastocitos de ratón MC/9.
- 25 4. El sensor basado en células de la reivindicación 1, en el que el modulador de la exocitosis regulada de gránulos de secreción es un receptor endógeno de superficie o un receptor de superficie heterólogo transfectado seleccionado, del grupo que comprende: receptores acoplados a la proteína G (GPCR), receptores que llevan un motivo ITAM, receptores que llevan un motivo ITIM y receptores proteicos tirosina quinasa.
- 30 5. Método para obtener el biosensor de la reivindicación 1 que comprende transformar una línea celular hematopoyética que lleva un modulador endógeno de la exocitosis regulada de los gránulos de secreción de la reivindicación 4, o que lleva un receptor de superficie heterólogo trasfectado con un vector bajo el control de un promotor adecuado, que codifica el indicador almacenado en el gránulo de la reivindicación 1 también bajo el control de un promotor adecuado.
- 35 6. El método de la reivindicación 5, en el que el vector que codifica el modulador de la exocitosis regulada de los gránulos de secreción de la reivindicación 4 también comprende un péptido señal útil para la sobreexpresión de receptores en la superficie de las células y/o una etiqueta para la detección en la superficie y/o la separación de células positivas.
- 40 7. El método de la reivindicación 5, en el que el promotor útil para la sobreexpresión del modulador de la exocitosis regulada de los gránulos de secreción es un promotor constitutivo seleccionado del grupo que comprende el promotor del factor de elongación 1 alfa de mamífero (hEF1alfa) (SEQ ID NO: 3) y el 5'LTR del promotor MoMLV-5'LTR del virus de la leucemia murina de Moloney (SEQ ID NO: 4) o un promotor inducible seleccionado del grupo que comprende el promotor inducible de tetraciclina, el promotor inducible de ecdisona, el promotor inducible de cumato y el promotor inducible de progesterona.
- 45 8. El método de las reivindicaciones 5 a 7, en el que el vector para la sobreexpresión de un modulador de la exocitosis regulada de los gránulos de secreción comprende una secuencia derivada del GPCR viral (VGS) de SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 6 para la sobreexpresión en superficie.
- 50 9. El método de las reivindicaciones 5 a 8, en el que el vector para la sobreexpresión constitutiva de un modulador de la exocitosis regulada de los gránulos de secreción es P-MoMLV-5'LTR-SP-cmyc-tag-VGS-MCS-poliA (SEQ ID NO: 7).
- 55 10. El método de la reivindicación 5, en el que el promotor fuerte para la sobreexpresión constitutiva de indicadores almacenados en gránulos se selecciona de: un promotor quimérico de hCMV y el promotor MoMLV-5'-LTR (SEQ ID NO: 4), un promotor del factor de elongación 1-alfa (SEQ ID NO: 3), y un promotor inducible seleccionado entre: promotor inducible de tetraciclina, promotor inducible de ecdisona, promotor inducible de cumato y promotor inducible de progesterona.
- 60 11. Método de ensayo o de cuantificación de las interacciones entre al menos dos moléculas, una que actúa como el modulador de la exocitosis y la otra como el ligando específico del modulador de la exocitosis, que comprende las etapas de:
- 65

- 5 a. incubar el sensor basado en células descrito anteriormente de las reivindicaciones 1 a 4 en un medio compatible con la viabilidad celular, la exocitosis y la actividad enzimática de los indicadores almacenados en los gránulos secretados,
- b. añadir un ligando específico del modulador de la exocitosis,
- c. añadir un sustrato específico del indicador almacenado en el gránulo y
- d. detectar la actividad enzimática hidrolasa no proteasa del polipéptido indicador, liberado de los gránulos en el medio extracelular, con un sustrato específico de dicho indicador liberado.
- 10 12. Uso del sensor basado en células de las reivindicaciones 1 a 4 para la detección de una proteína a la que se unen un par de dos moléculas, en el que una de las moléculas que se une a la proteína para detectar es una inmunoglobulina G específica, o una inmunoglobulina E específica, o una inmunoglobulina A específica y la segunda molécula que se une a la proteína que se va a detectar induce la oligomerización de dicha proteína que se va a detectar, tras la unión.
- 15 13. Uso del sensor basado en células de las reivindicaciones 1 a 4 para analizar las interacciones entre moléculas en el descubrimiento de fármacos, o para cuantificar moléculas tales como proteínas para el diagnóstico, o para la detección de fármacos o moléculas en muestras de la industria alimentaria, en muestras ambientales y en la industria farmacéutica, para el análisis de las interacciones IgE-alérgeno, para analizar los compuestos anti-alérgicos y/o para la detección de alérgenos.
- 20 14. Kit que comprende el sensor basado en células de las reivindicaciones 1 a 4 para analizar si un compuesto modula la exocitosis o para cuantificar el grado de tal exocitosis.
- 25 15. Kit de acuerdo con la reivindicación 14 que comprende al menos un sustrato específico para la detección del indicador heterólogo secretado.

FIGURA 1

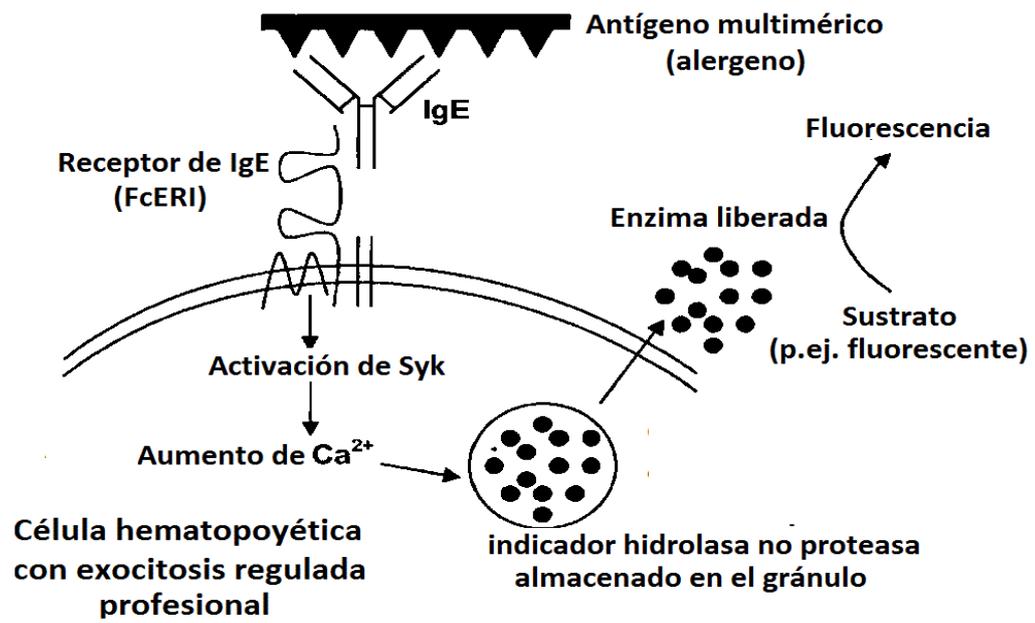


FIGURA 2

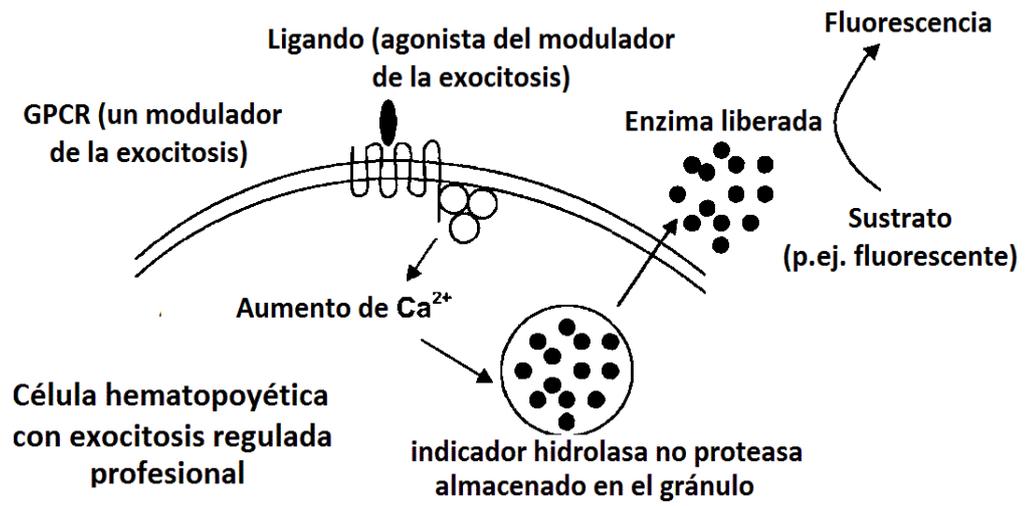
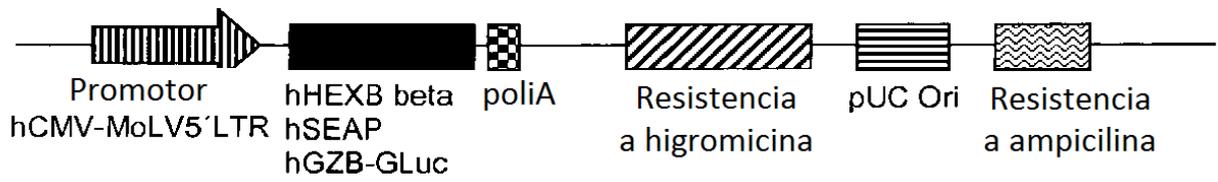
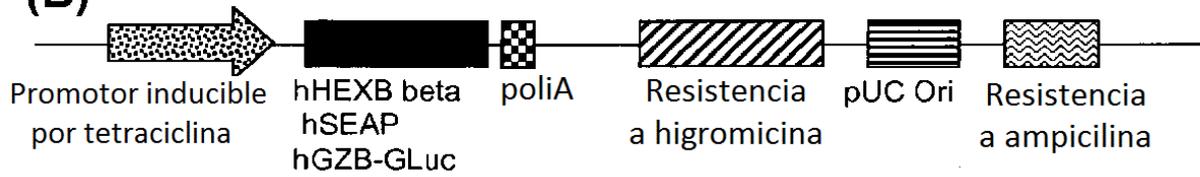


FIGURA 3

(A)



(B)



**REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN**

La lista de referencias citadas por el solicitante es, únicamente, para conveniencia del lector. No forma parte del documento de patente europea. Si bien se ha tenido gran cuidado al compilar las referencias, no pueden excluirse errores u omisiones y la OEP declina toda responsabilidad a este respecto.

5

**Documentos de patente citados en la descripción**

- **EP 2010004619 W [0007] [0020] [0026]**

**Documentos no literatura patente citados en la descripción**

10

- |  |   |
|--|---|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>PREININGER AM ; HAMM HE.</b> <i>Sci. STKE</i>, 2004 [0011]</li> <li>• <b>CABRERA-VERA TM et al.</b> <i>Endocr Rev.</i>, December 2003, vol. 24 (6), 765-81 [0011]</li> <li>• <b>MANIATIS et al.</b> <i>Molecular Cloning, A Laboratory Manual.</i> Cold Spring Harbor, 1990 [0011]</li> <li>• <b>AUSUBEL et al.</b> <i>Current Protocols In Molecular Biology.</i> John Wiley &amp; Sons, 1994 [0011]</li> <li>• <b>BURGOYNE RD ; MORGAN A.</b> <i>Physiol Rev</i>, 2003, vol. 83, 581-632 [0011]</li> <li>• <b>BURGOYNE, RD ; MORGAN, A.</b> <i>Physiological Reviews</i>, April 2003, vol. 83 (2), 581-632 [0022]</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>EL MESKINI, R et al.</b> <i>Endocrinology</i>, 2001, vol. 142 (2), 864-873 [0027]</li> <li>• <b>TAM WWH et al.</b> <i>Eur J Cell Biol</i>, 1993, vol. 62, 294-306 [0027]</li> <li>• <b>ROY P et al.</b> <i>Mol Cell Endocrinol</i>, 1991, vol. 82, 237-250 [0027]</li> <li>• <b>COOL DR et al.</b> <i>J Biol Chem</i>, 1995, vol. 270, 8723-8729 [0027]</li> <li>• <b>HUANG et al.</b> <i>J Clin Immunol.</i>, 1998, vol. 18, 169-183 [0028]</li> <li>• <b>KAUR, J ; CUTLER DF.</b> <i>J. Biol. Chem.</i>, 2002, vol. 277 (12), 10498-10505 [0028]</li> </ul> |
|--|---|