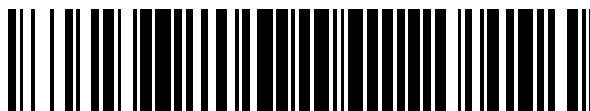


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 577 607**

51 Int. Cl.:

G01N 33/50

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.07.2010** **E 10744506 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.03.2016** **EP 2598876**

54 Título: **Nuevos sensores ultrasensibles basados en células y usos de los mismos**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
15.07.2016

73 Titular/es:

CANVAX BIOTECH SL (100.0%)
Polígono Tecnocordoba Calle Estocolmo 47
14014 Cordoba, ES

72 Inventor/es:

PAZ ROJAS, ELIER;
MONTERO PEÑALVO, MARIA DE GRACIA;
LUNA GUERRERO, VERÓNICA LNMACULADA;
GARCIA MACEIRA, FE ISABEL;
MORALES-MARTÍNEZ, JOSÉ ANDRÉS;
GARCIA MACEIRA, TANIA;
ARAGÓN GÓMEZ, ANA BELÉN;
QUESADA MOLINA, ANA y
MARQUEZ MORALES, AURORA MARÍA

74 Agente/Representante:

ILLESCAS TABOADA, Manuel

ES 2 577 607 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 refiere a un nuevo sensor basado en células, útil para el descubrimiento de fármacos, el diagnóstico y la determinación de analitos, que comprende una línea celular con exocitosis regulada profesional de gránulos secretores transfectados con granzima B, utilizando reportero una proteasa almacenada en los gránulos secretores regulados de la línea celular con exocitosis regulada profesional y que tiene un receptor de superficie heterólogo como modulador de la exocitosis de los gránulos secretores regulados, teniendo dicha proteasa reportera almacenada en gránulos al menos: una alta resistencia a las condiciones ya presentes dentro de los gránulos, tales como pH bajo y proteólisis por otras proteasas; actividad enzimática después de la exocitosis; una secuencia de escisión altamente específica; un nivel de secreción muy bajo en condiciones no estimuladas o basales; y una actividad de señal alta con respecto al fondo en un medio compatible con la viabilidad del cultivo celular y la exocitosis de los gránulos, para una detección robusta y sensible de alto rendimiento.

Cuando el sensor basado en células se incuba con un ligando específico del modulador de la exocitosis, el polipéptido reportero se libera de los gránulos al medio extracelular y la actividad enzimática de dicho polipéptido reportero liberado se detecta con un sustrato específico. La presente invención también permite el desarrollo de ensayos múltiples mezclando en el mismo recipiente de reacción al menos dos líneas celulares, cada una con un par diferente de modulador de exocitosis-reportero de proteasa almacenada en gránulos, y detectando la exocitosis con sustratos altamente específicos de cada proteasa reportera almacenada en gránulos.

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

Antecedentes de la invención

El proceso de descubrimiento de un nuevo producto terapéutico implica tradicionalmente las siguientes fases: (1) identificación de una diana farmacológica, (2) validación de la diana, (3) exploración con respecto a compuestos que afectan a la actividad de la diana, (4) ensayo de los compuestos candidatos con respecto a toxicidad, (5) ensayo de los compuestos candidatos con respecto a efectos secundarios y (6) examen del metabolismo y estabilidad de los compuestos candidatos en el paciente o en un sistema modelo apropiado.

El cribado de alto rendimiento (HTS, del inglés High Throughput Screening) es una de las fases iniciales del proceso de descubrimiento de fármacos. Permite ensayar cientos de miles de compuestos químicos al día para seleccionar los candidatos más destacados para un examen futuro. Los compuestos se ensayan frente a dianas terapéuticas. Los desarrollos recientes en el cribado en masa modernos están altamente influidos por el número creciente de dianas identificadas mediante la genómica y por la expansión de las bibliotecas de compuestos sintetizados usando métodos de química combinatoria.

Por ejemplo, la membrana plasmática actúa como hospedador para más de 20 familias diferentes de receptores, incluyendo más de 1000 proteínas diferentes, que se han denominado el receptoroma. La superfamilia del receptor acoplado a proteína G (GPCR) representa la mayor parte del receptoroma, aunque receptoroma también incluye receptores de tipo toll, receptores de integrina, receptores de lipoproteína de baja densidad, receptores de proteína tirosina quinasas y fosfatasa, receptores de citocinas e incluso algunos canales iónicos que actúan como receptores.

Se considera que el aprovechamiento terapéutico de la interacción entre receptores extracelulares y de superficie celular, que se originó como el concepto de "fármaco-receptor", es una de las grandes ideas y percepciones de la ciencia biomédica del siglo XX. Debido a los avances continuados en la identificación de dianas, tecnologías de exploración y validación de dianas, los intentos de descubrir fármacos basados en receptoroma probablemente sean productivos durante muchas décadas futuras. No resulta sorprendente que la mayoría de los expertos concluyan que el receptoroma representa la mayor parte del genoma al que se pueden aplicar fármacos, estando en cabeza uniformemente los GPCR.

Una de las primeras tecnologías para la exploración masiva es el ensayo de competición de unión de radioligando, basado en el uso de radioligandos de alta actividad específica que marcan selectivamente al receptor de interés. Los ensayos de competición de unión de radioligando, como se llevan a cabo típicamente, proporcionan una estimación fiable de afinidades farmacológicas para dianas moleculares particulares, pero no proporcionan información relacionada con la eficacia (como agonista, antagonistas o agonistas parciales). Tradicionalmente, los farmacólogos

se han basado en ensayos de competición de unión de radioligando para medir afinidades del ligando y las especificidades del receptor, así como atribuir relevancia fisiológica al GPCR. Los filtrados de radioligandos de competición son susceptibles a técnicas similares a HTS porque pueden realizarse en placas de + de 96 pocillos, lo que se ha demostrado que es inestimable para la exploración eficaz de bibliotecas químicas focalizadas contra una serie de receptores. Los ensayos de competición de unión de radioligando también son útiles para relacionar la estructura química con los efectos secundarios de los fármacos.

Incluso aunque los cribados de radioligandos son uniformes entre los diferentes sistemas de expresión celular, tienen varios inconvenientes que han promovido la investigación sobre tecnologías alternativas. Por ejemplo, los ensayos de radioligandos no diferencian entre agonistas, agonistas parciales, antagonistas y agonistas inversos. No obstante, lo que es más importante, los ensayos de radioligandos no consiguen detectar las respuestas que suceden corriente abajo de la unión del ligando y por ello no son adecuados para los receptores huérfanos debido a que, por definición, estos oGPCR tienen ligandos desconocidos. Adicionalmente, los ensayos de unión a radioligando, típicamente están desplazados para detectar la unión del ligando con el sitio del receptor endógeno (sitio ortostérico) y por lo tanto podrían no detectar moduladores de moléculas pequeñas que ejercen sus efectos en sitios distintos del sitio endógeno, denominado sitio alostérico.

A diferencia de los ensayos de unión de radioligando, los ensayos funcionales producen perfiles de ligandos ricos en información que revelan cómo el ligando modula la transducción de la señal, por ejemplo, en GPCR. Dichos ensayos funcionales se basan en la detección de segundos mensajeros que se producen como resultado de rutas de transducción de señales específicas de receptor. Uno de dichos métodos usa el aumento de calcio intracelular medida con un fluoróforo sensible a calcio como señal, mientras que los otros métodos usan calcio o promotores sensibles a AMPc acoplados con reporteros como la luciferasa para medir la activación o la inhibición del receptor. La elevación intracelular de calcio se mide con un colorante sensible a calcio que aumenta su fluorescencia a medida que el colorante intracelular se une con calcio o con una proteína sensible a calcio denominada aequorina que genera una señal luminiscente cuando se añade un derivado de la coelenterazina. No obstante, ambos ensayos de calcio tienen las siguientes desventajas: (1) no pueden usarse para explorar con respecto a agonistas inversos; (2) el corto intervalo temporal entre la adición de ligando y la elevación de calcio requiere equipamiento altamente especializado para adición de ligando y medición de calcio simultáneos; y (3) la señal no se amplifica. Hay muchas tecnologías que miden la acumulación de AMPc basada en membrana o células tales como SPA™ (GE Healthcare), FlashPlate™ (Perkin Elmer), AlphaScreen™ (Perkin Elmer), HTRF cAMP (Cisbio) y HitHunter™ (DiscoverX). Son tecnologías de cribado basadas en genes indicadores de ensayos basados en células, en los que el aumento en segundos mensajeros induce la expresión de moléculas indicadoras, por ejemplo, luciferasa, beta-lactamasa, SEAP y beta-galactosidasa.

Una tecnología de cribado ideal debería ser sencilla, no radiactiva, con alta relación de señal frente al ruido, homogénea, con mínimas adiciones de reactivos y ser susceptible de un formato de placa de microtitulación para facilitar la automatización robótica. Otra consideración es si medir una etapa de señalización próxima o distal. La medición de acontecimientos próximos a la activación de la diana reducirá la incidencia de falsos positivos; sin embargo, las relaciones de la señal con respecto al ruido pueden potenciarse moviéndose por la cascada de transducción de la señal debido a la amplificación de la señal. Otra desventaja del uso de moléculas reporteras acopladas con segundos mensajeros como calcio o el promotor sensible a AMPc, es que esos ensayos se basan en promotores inducibles que son habitualmente promotores débiles con un fondo alto, y es necesario que el reportero se mida después de la transcripción y la traducción bien en lisados o bien como productos secretados. El uso de métodos en los que las moléculas reporteras se secretan rápidamente al medio extracelular tras la interacción ligando-proteína sería deseable en exploración de descubrimiento de fármacos debido a que elimina la etapa de la lisis celular para liberar el reportero intracelular. Además, el uso de métodos como la medición de calcio intracelular con fluoróforos específicos elimina la necesidad de transcripción y nueva síntesis de proteínas, reduciendo de este modo los tiempos de ensayo. Esta reducción en el tiempo de ensayo es muy importante en métodos como la el cribado homogéneo en nanoplacas 3456, en el que el volumen de reacción es muy bajo, lo que hace por lo tanto la evaporación de reactivos especialmente relevante. Además, el uso de nanoplacas para exploración requiere métodos muy sensibles para cuantificar cantidades muy pequeñas de moléculas reporteras o de segundos mensajeros y, por lo tanto, son deseables moléculas reporteras que puedan acoplarse a voluntad con cascadas de amplificación de la señal. No obstante, como el fondo también se amplifica en cascadas de amplificación de la señal, especialmente el fondo debido a las primeras etapas en la cascada, existe la necesidad de moléculas reporteras altamente específicas con el menor fondo de señal posible. Finalmente, se prefieren métodos con una o dos adiciones de reactivos a cada pocillo de una nanoplaca en un proceso de descubrimiento de fármacos. Por lo tanto, una tecnología de cribado deseable sería una mezcla de: (1) alta sensibilidad de los métodos basados en reportero; (2) baja tasa de falsos positivos de métodos de segundos mensajeros; (3) cortos tiempos de ensayo de métodos de segundos mensajeros que no tienen transcripción; (4) señal estable de métodos basados en reporteros proteicos; (5) mínimas adiciones o separaciones de reactivos en los productos de ensayo de los métodos homogéneos; (6) una señal robusta con una alta relación de señal con respecto al ruido; (7) una señal amplificable para reducir los volúmenes de ensayo conservando al mismo tiempo una alta relación de señal con respecto al ruido y (8) una lectura universal que pueda usarse para la amplia mayoría del genoma humano al que se puede aplicar fármacos.

La célula con exocitosis regulada de reporteros preformados podría cumplir varias de las condiciones anteriores y,

por lo tanto, dichos sensores basados en células podrían ser de gran utilidad en el descubrimiento de fármacos y en la caracterización de compuestos. La beta-hexosaminidasa endógena ha sido el reportero lisosómico más ampliamente usado en desgranulación, pero esta proteína se considera un reportero de baja sensibilidad. Por ejemplo, Tiberghien *et al* (Tiberghien *et al*. Journal of Immunological Methods 223_1999.63-75) desarrollaron un método en el que las células HL-60 promielocíticas se diferenciaron y se emplearon para preparar una metodología en microplaca de 96 pocillos, usando filtración en lugar de centrifugación para recoger el fluido extracelular junto con la beta-hexosaminidasa como enzima liberada por las células que se midió enzimáticamente. Este método usa células no profesionales que necesitan diferenciarse para inducir la secreción, tanto el reportero beta-hexosaminidasa como el receptor del quimioatrayente son endógenos y, por lo tanto, de baja expresión y toda la combinación anterior de factores da como resultado un método que necesita al menos 250.000 células por cada pocillo a analizar. Por lo tanto, los autores reivindican que la ventaja principal de su método es el uso de filtración en lugar de centrifugación para recoger el fluido extracelular.

En otro ensayo, (Naal RM *et al*. Biosens Bioelectron 1 nov 2004; 20(4):791-6.) Naal *et al* han desarrollado un ensayo de desgranulación directo para permitir el uso de mastocitos RBL-2H3 como un biosensor para explorar bibliotecas químicas para el descubrimiento de fármacos y la evaluación de la toxicidad ambiental basándose en la liberación de beta-hexosaminidasa endógena al medio extracelular en una única etapa. Los autores anticipan el uso de dicho método para detectar interacciones de hapteno-IgE y para examinar inhibidores farmacológicos de actividad tirosina quinasa Syk, crítica para la desgranulación. Estos autores también usan beta-hexosaminidasa endógena como reportero y solamente usan el método para detectar interacciones hapteno-IgE y para probar inhibidores farmacológicos de tirosina quinasa que participan en la desgranulación. Además, en este método solamente se usan células adherentes y, por lo tanto, es necesaria una etapa de lavado de cada pocillo para eliminar el fondo debido, tanto a la actividad de beta-hexosaminidasa basal acumulada durante las 16 a 24 horas de cultivo celular antes del ensayo, como el debido a la actividad beta-hexosaminidasa normalmente presente en el suero bovino usado en el medio de cultivo celular. Esta etapa de lavado de los pocillos individuales limita el rendimiento, aumenta los costes y cuando se realiza en un ambiente HTS con robots de pipeteado automático, se reduce la señal con respecto al fondo de los ensayos debido al volumen residual en los pocillos que contienen actividad beta-hexosaminidasa. Finalmente, como la enzima beta hexosaminidasa se expresa en la mayoría de las líneas celulares hemopoyéticas con exocitosis regulada profesional, esta enzima permite solamente el desarrollo de ensayos sencillos y no de ensayos múltiples.

En un tercer método, Graminski, GF *et al* (véase Graminski GF *et al* J. Biol. Chem. (1993), 268, 8, 5957-5964) han usado la dispersión de pigmentos en melanóforos de rana mediada por receptores que activan proteína quinasa A o la proteína quinasa C, para evaluar rápidamente productos químicos con respecto a sus efectos en receptores que activan PKA o PLC mediante un ensayo funcional que se usa para investigaciones de interacciones ligando-receptor y para el cribado farmacológico masivo. Una desventaja importante de este método es que usa células de origen no mamífero para la evaluación funcional interacción receptor-ligando, y que la detección colorimétrica es de baja sensibilidad en comparación con los métodos fluorescentes o quimioluminiscentes.

Se han desarrollado otros métodos para estudiar el tráfico intracelular y la secreción de proteínas de fusión entre un compañero lisosomal marcado y una proteína fluorescente, tal como la GFP. En un primer método, El Meskini, R *et al* (véase El Meskini R *et al*. Endocrinology 2001, 142-2, 864-873) han usado fusiones del pre-pro-neuropéptido Y con GFP para investigar el trayecto de las proteínas químicas en células AtT-20, células PC-12 y células de hipófisis primarias para producir almacenamiento de GFP en LDCV que se sometieron a liberación estimulada. En 2002, Rajotte (documento WO2004/016212) reivindicó que había desarrollado una tecnología fusionando RMCP con GFP para detectar y cuantificar la desgranulación, pero este método solamente es útil para medir el tráfico, pero no para cuantificar, debido a la baja sensibilidad de la GFP liberada por las células.

Otros investigadores han transfectado GPCR en células secretoras profesionales como RBL-2H3, pero la beta-hexosaminidasa endógena siempre ha sido el reportero usado para medir la desgranulación, solamente se han usado células adherentes para el ensayo y, por lo tanto, es necesaria una etapa de lavado adicional para eliminar el fondo, comprometiendo de este modo el rendimiento, y esta enzima permite solamente el desarrollo de ensayos sencillos. Además, los promotores y las condiciones usadas para la expresión de los receptores de superficie como GPCR en células hemopoyéticas, tales como RBL-2H3, necesitan optimizarse cuidadosamente para encontrar resultados uniformes. Por ejemplo, el receptor adenosina 3 se considera un GPCR que no desgranula por sí mismo, pero que potencia la desgranulación inducida por cantidades subóptimas del alérgeno de IgE. Por lo tanto, el estado de la técnica actual no enseña cómo desarrollar un sensor robusto y sensible basándose en la desgranulación adecuado para su uso en HTS.

Hasta la presente invención, no ha habido ningún informe sobre el uso de serin proteasas altamente específicas como las granzimas A, B, quimasa humana, proteinasa 3 o elastasa de neutrófilos como reporteros almacenados en lisosomas secretores, para desarrollar sensores basados en células hemopoyéticas útiles para el descubrimiento de fármacos o para detectar moléculas para diagnóstico. El estado de la técnica actual emplea beta-hexosaminidasa endógena como un reportero midiendo la actividad de esta enzima a partir de al menos 50.000 células, número de células relativamente grande (véase Schwartz *et al*. J. Immunol. 123: 1445-1450, 1979; y Dragonetti *et al*. J. Cell Sci. 113: 3289-3298, 2000) o enzimas lisosómicas fusionadas con GFP para seguir el movimiento de los lisosomas

secretorios supervisado a tiempo real.

En este sentido, Shiver *et al.* (Shiver *et al.* Cell. 71 (2): 315-322, 1992) describen un método para supervisar la interacción entre el receptor Rc específico de IgE endógena (receptor de superficie endógeno que es un modulador de la exocitosis regulada de gránulos secretorios) e IgE anti-DNP (ligando específico) en presencia o ausencia de TNP-RBC o TNP-albúmina. Dicha interacción induce la reticulación del receptor de IgE y comprende: poner en contacto IgE anti-DNP y opcionalmente TNP-RBC (o TNP-albúmina) con la línea tumoral de mastocitos de rata RBL transfectada con granzima A; y determinar las actividades de la granzima A trasfectada y la β -hexosaminidasa endógena con sustratos cromogénicos específicos. El fin del método desvelado en Shiver *et al.* muestra que la granzima A (es decir, esa granzima específica) y la citolisina, liberadas tras la unión de IgE con su receptor específico, endógeno, destruyen células rojas diana; la granzima A es por lo tanto esencial para llevar a cabo el método desvelado en Shiver *et al.*

La presente invención describe un sensor basado en células hemopoyéticas altamente sensible basado en la desgranulación de proteasas reporteras útiles para ensayar interacciones entre al menos dos moléculas, con una alta señal con respecto al fondo para la detección robusta, una cinética rápida, con etapas susceptibles de exploración mínimas de alto rendimiento, y uso de sustratos sensibles a enzimas reporteras, para la detección de las enzimas secretadas a partir de un número bajo de células para reducir costes. Este sensor basado en células podría usarse en forma sencilla o múltiple. Los ensayos múltiples tienen varias ventajas sobre los ensayos sencillos, por ejemplo: un mayor rendimiento, reducción de costes sin comprometer la calidad de los datos o incluso calidad de datos mejorada ya que cada ensayo tiene como control interno el otro ensayo realizado en el mismo pocillo.

OBJETOS DE LA INVENCIÓN

Definiciones

El **transductor** se define como cualquier dispositivo que convierta una señal de una forma a otra. Por ejemplo, el biosensor basado en células de la presente invención convierte una interacción del ligando con receptor en la superficie celular, en una secreción de un polipéptido reportero, previamente almacenado dentro de la célula, por lo tanto, la medida de la actividad enzimática del reportero se asocia con una interacción receptor-ligando.

El **sensor** es un tipo de transductor. Los sensores que transducen una señal biológica se denominan biosensores. Todos los organismos vivos contienen sensores biológicos que actúan de forma similar a los de los sensores mecánicos. La mayoría de estos son células especializadas sensibles a: luz, movimiento, temperatura, campos magnéticos, gravedad, humedad, vibración, presión, campos eléctricos, sonido y otros aspectos físicos del ambiente externo; aspectos físicos del ambiente interno, tales como estiramiento, movimiento del organismo y posición de los apéndices (propiocepción); una enorme serie de moléculas ambientales, incluyendo toxinas, nutrientes y feromonas; muchos aspectos del medio metabólico interno, tales como el nivel de glucosa, el nivel de oxígeno u la osmolalidad; y una serie diversa de moléculas señales internas, tales como hormonas, neurotransmisores y citocinas. Los sensores artificiales que imitan sensores biológicos usando un componente sensible biológico se denominan biosensores.

La **exocitosis regulada** es un proceso en el que células especializadas secretan neurotransmisores, hormonas, enzimas, péptidos o sustancias de bajo peso molecular (por ejemplo, catecolaminas, glutamato, etc.). Durante la exocitosis, la activación celular genera una cadena de acontecimientos intracelulares que conduce al suministro de vesículas que contienen una carga a la membrana de superficie celular (la membrana plasmática), culminando en la fusión de un subconjunto de estas vesículas con regiones especializadas de la membrana plasmática. Aunque un aumento en la concentración de Ca^{2+} intracelular es con frecuencia el desencadenante de la exocitosis, otras señales intracelulares incluyendo AMPc, diacilglicerol (DAG), fosfolípidos y ATP también regulan o modulan la exocitosis desencadenada por Ca^{2+} .

Gránulos secretorios o vesículas secretoras o lisosomas secretorios son orgánulos intracelulares especializados que actúan como un grupo de almacenamiento para los productos secretorios seleccionados. Los gránulos secretorios se mueven hacia la periferia de la célula por un estímulo o un modulador, sus membranas se fusionan con la membrana celular, y su contenido se libera. Aunque en la mayoría de los tipos celulares, los gránulos secretorios parecen representar una clase completamente nueva de orgánulos, los gránulos en diversas células hemopoyéticas y ciertos otros tipos celulares comparten varias propiedades con lisosomas.

Las **células hemopoyéticas** son células derivadas de células madre de la médula ósea y comprenden todos los tipos celulares sanguíneos que incluyen los linajes tanto mieloide (monocitos y macrófagos, neutrófilos, basófilos, eosinófilos, eritrocitos, megacariocitos/plaquetas y algunas células dendríticas) como linfóide (linfocitos T, linfocitos B, linfocitos NK, algunas células dendríticas).

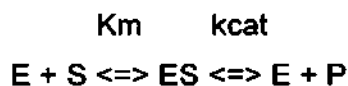
Línea celular con exocitosis regulada: como se usa en el presente documento, las expresiones "célula con exocitosis regulada", "línea celular secretora profesional" y "línea celular con exocitosis regulada profesional" pueden

usarse indistintamente. Para los métodos de la presente invención, las líneas celulares importantes son líneas celulares hemopoyéticas con exocitosis regulada profesional. Todas estas expresiones también incluyen su descendencia, que es todas y cada una de las generaciones posteriores. Se entiende que toda la descendencia puede no ser idéntica debido a mutaciones deliberadas o involuntarias. Las líneas celulares con exocitosis regulada útiles en sensores basados en células, son células hospedadoras generalmente modificadas técnicamente para expresar un reportero almacenado en los gránulos, que se libera al medio de cultivo por un modulador de exocitosis como un receptor de superficie celular, tal como un GPCR, después de la unión a un ligando agonista.

Polipéptido reportero o reportero: es un gen que los investigadores unen a otro gen de interés en cultivo celular, animales o plantas. Ciertos genes se eligen como reporteros porque las características que confieren en los organismos que los expresan se identifican y se miden fácilmente, o debido a que son marcadores seleccionables. Los genes reporteros se usan en general para determinar si el gen de interés se ha captado por o se expresa en la célula o en una población de organismos. Los genes reporteros en el presente documento son polipéptidos almacenados dentro de gránulos secretorios de líneas celulares secretoras profesionales, como ciertas células hemopoyéticas, y se liberan al medio extracelular por un estímulo o un modulador de exocitosis.

Proteasa: Las proteínas están compuestas de aminoácidos como componentes básicos entre los que se forma un enlace amida entre el COOH de un aminoácido y el NH₂ del siguiente aminoácido, para formar el enlace peptídico. El término proteasa es sinónimo de peptidasa, que significa hidrolasa de enlace peptídico, e incluye endopeptidasas y exopeptidasas. La capacidad de catalizar la hidrólisis del enlace peptídico a pH neutro y temperaturas ambientales por lo tanto caracteriza a las proteasas, en los que diversos mecanismos catalíticos están localizados en una diversidad de andamiajes proteicos de otro modo no relacionados. Existen en la actualidad seis clases de proteasas: serin proteasas, treonin proteasas, cisteín proteasas, aspartil proteasas (por ejemplo, plasmepsina), metaloproteasas y glutamil proteasas. El mecanismo usado para romper un enlace peptídico implica hacer nucleofílico a un resto aminoácido que tiene la cisteína y la treonina (peptidasas) o una molécula de agua (aspartil, metaloproteinasas y glutamil peptidasas), de modo que se pueda atacar al grupo carbonilo peptídico. Un modo de hacer un nucleófilo es mediante una tríada catalítica, en la que se usa un resto de histidina para activar la serina, cisteína o treonina como un nucleófilo. El sitio de unión al sustrato en todas las proteasas se compone por un número bastante grande de restos de aminoácidos que aseguran el alineamiento apropiado de los sustratos antes de la hidrólisis, y ayudan a promover la catálisis mediante la estabilización del estado de transición. El sitio de unión se divide en varios subsitios que aseguran cada uno, un único resto de aminoácido del sustrato mediante interacciones múltiples. Además de las interacciones con cadenas laterales específicas, la unión de la cadena principal peptídica también desempeña un papel importante en la catálisis. La especificidad de la proteasa se estudia frecuentemente en el contexto de los subsitios que flanquean los restos catalíticos y proporcionan a la enzima preferencias específicas para sustratos peptídicos o proteicos. Para el análisis de la especificidad de la proteasa se usa la nomenclatura de Berger y Schechter (véase Schechter I, Berger A. Biochem. Biophys. Res. Commun. (1968) 32: 898-902). De acuerdo con esta nomenclatura, los aminoácidos presentes en los sitios sensibles a proteasa se denominan S₄, S₃, S₂, S₁, S₁', S₂', S₃', y corresponden a aminoácidos presentes en los sustratos con la secuencia P₄, P₃, P₂, P₁, P₁', P₂', P₃', en la que el enlace peptídico P₁-P₁' se rompe. Por ejemplo, la familia de las cisteín proteasas tipo papaína tiene sitios bien definidos de S₃ a S₁', teniendo algunas proteasas individuales especificidad más extendida. Por ejemplo, el péptido de granzima B Ile-Glu-Pro-Asp-amidometilcoumarina tiene Ile como P₄, Glu como P₃, Pro como P₂ y Asp como P₁. Para varias proteasas los restos de aminoácidos después del enlace peptídico escindido, es decir restos P_n', también contribuyen a la especificidad. Por ejemplo, la granzima B de ratón tiene un requisito de glicina en la posición P₂' para la rotura eficaz de los sustratos. Además, un buen sustrato extendido de la granzima B humana es Ile-Glu-Pro-Asp-Ser-Gly-Met-Glu (P₄-P₃-P₂-P₁-P₁'-P₂'-P₃'-P₄').

Como enzimas, las proteasas pueden caracterizarse cinéticamente por su afinidad por sustrato, la velocidad catalítica de la reacción y su especificidad de sustrato o eficacia catalítica. La ecuación de Michaelis y Menten describe la velocidad de reacción y especificidad para una reacción sencilla de un sitio. Michaelis y Menten dividieron el proceso de la conversión de un sustrato S a un producto P en dos pasos como se muestra:



La primera etapa de reacción describe la unión del sustrato con la enzima (catalizador) y la constante K_m corresponde a la constante de disociación del equilibrio en condiciones en las que la formación del producto es muy lenta en comparación con el proceso de disociación del sustrato. K_m es igual a la concentración de sustrato a velocidad de reacción semimáxima V_{máx}/2. En este caso K_m es una buena aproximación para la constante de disociación y, por lo tanto, describe la afinidad del sustrato por la enzima. Para reacciones más complejas la constante refleja el equilibrio de disociación de todos los sustratos unidos a la enzima. La segunda etapa de reacción describe la velocidad catalítica o la velocidad de formación del producto y se denomina el número de renovación K_{cat}. La velocidad de renovación se define como el número máximo de producto P por sitio activo por unidad de tiempo. La cinética de Michaelis-Menten es válida solamente en condiciones de saturación, es decir, cuando la concentración de sustrato S es mucho mayor que la concentración de enzima. Otra propiedad importante de las

proteasas es su especificidad de sustrato. La relación k_{cat}/K_m define una medida de la eficiencia catalítica de un par enzima-sustrato. Se refiere a las propiedades y reacciones de enzima libre y sustrato libre. La especificidad de una enzima es, por lo tanto, una medida de la especificidad de una enzima para sustratos de competición o de enzimas de competición para un único sustrato. Las proteasas se clasifican como endopeptidasas si su secuencia de corte es interna en un sustrato diana o exopeptidasas si necesitan un grupo amino terminal o uno carboxilo terminal para el corte. Las exopeptidasas se clasifican por lo tanto en aminopeptidasas y carboxipeptidasas.

Los gránulos de varias células hemopoyéticas almacenan de forma natural proteasas como las granzimas, proteasas de mastocitos, elastasa, proteinasa 3, metaloproteasas como MMP-8 y MMP-9, catepsinas de serin proteasa como las catepsinas A y G y cisteín catepsinas. Las granzimas y las proteasas de mastocitos pertenecen a la superfamilia quimotripsina de serin proteasas debido a su alto grado de identidad de secuencia de aminoácidos con serin proteasas ampliamente documentadas; su capacidad para cortar sustratos de serin proteasa sintéticos y su inhibición por inhibidores de serin proteasa típicos. (Véase por ejemplo Smith MJ *et al* J. Leukoc. Biol. 1996, 60: 555-562). La actividad enzimática de granzimas y proteasas de mastocitos se ha clasificado como de tipo triptasa (escisión después de Arginina o Lisina), de tipo Asp-asa (escisión después de Ácido Aspártico), de tipo quimasa (escisión después de Fenilalanina, Triptófano o Tirosina) y de tipo elastasa (escisión después de Valina, Alanina, Isoleucina, Metionina o Leucina).

Las catepsinas son una clase de proteasas globulares, inicialmente descritas como hidrolasas peptídicas intracelulares, aunque varias catepsinas tienen también funciones extracelulares. Las catepsinas B, C, F, H, L, K, O, S, V, W y X son cisteín proteasas de la familia papaína, y representan la mayor clase y mejor conocida de las catepsinas. Su función principalmente es como proteasas intracelulares que median en la mayoría de la proteólisis terminal no específica en el ambiente ácido de los lisosomas (véase, por ejemplo, Turk V, Turk B y Turk D. EMBO J 2001; 20: 4629-33). Las catepsinas A y G son ambas serin proteasas, pero la catepsina G es una endopeptidasa mientras que la catepsina A es una carboxipeptidasa. Las catepsinas D y E son proteasas aspárticas. Las catepsinas se sintetizan como proenzimas inactivas y se procesan para convertirse en enzimas maduras y activas.

Granzimas: las granzimas son serin proteasas relacionadas estructuralmente que difieren en su especificidad de sustrato. Se expresan de forma natural en linfocitos citotóxicos tales como linfocitos T CD8 positivos y linfocitos citolíticos naturales, pero también en testículo. Hasta la fecha, se han descrito cinco granzimas diferentes en seres humanos: granzimas A, B, H, K y M (véase por ejemplo Grossman, WJ. *et al*. Curr. Opin. Immunol. (2003) 15, 544-552). En ratones, pueden encontrarse ortólogos claros de cuatro de estas granzimas (A, B, K y M), y la granzima C parece ser el ortólogo murino más probable de granzima H. El genoma murino codifica varias granzimas adicionales (D, E, F, G, L y N), de las que D, E, F y G se expresan por linfocitos citotóxicos; L parece ser un pseudogén y N se expresa en el testículo.

Modulador de la exocitosis regulada, se refiere a un compuesto, una molécula o una composición que es capaz de alterar una o más rutas de transducción de la señal corriente abajo implicadas en el proceso de exocitosis regulada. Esta alteración en la actividad abarca inhibición (es decir, el compuesto, la molécula o la composición es un "inhibidor" de exocitosis), así como estimulación, inducción o potenciación (es decir, el compuesto, la molécula o la composición es un "estimulador", "inductor" o "potenciador" de exocitosis). Estos moduladores se identifican utilizando ensayos *in vitro* y/o *in vivo*. En estos ensayos, se usan controles para permitir comparaciones entre muestras.

Descubrimiento de fármacos, proceso por el que se descubren y/o diseñan fármacos. Como se usa en el presente documento el descubrimiento de fármacos comprende la identificación de fármacos y las modificaciones para afinidad, efectos secundarios, biodisponibilidad, pero también ensayar el efecto de un fármaco previamente lanzado al mercado en una indicación terapéutica nueva, un proceso también conocido como redefinición.

Gen, es la unidad física y funcional fundamental de la herencia. En términos bioquímicos, un gen es una secuencia ordenada de nucleótidos localizada en una posición particular en un cromosoma particular que codifica un producto funcional específico (es decir, una proteína o molécula de ARN). Como se usa en el presente documento, un gen está compuesto no solamente de secuencias codificantes, sino que 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 se localizan 5' de la región codificante y que están presentes en el ARNm se denominan secuencias no traducidas 5'. Las secuencias que se localizan 3' o cadena abajo de la región codificante y que están presentes en el ARNm se denominan secuencias no traducidas 3'. El término "gen" abarca tanto ADNc como formas genómicas de un gen. Una forma genómica o clon de un gen contiene la región codificante interrumpida con secuencias no codificantes denominadas "intrones", "regiones intermedias" o "secuencias intermedias". Los intrones son segmentos de un gen que se transcribe a ARN nuclear heterogéneo (ARNnh); los intrones pueden contener elementos reguladores tales como potenciadores. Los intrones se retiran o "cortan" del transcrito nuclear o primario; por lo 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 aminoácidos en un polipéptido naciente.

“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 ajeno deseable integrado en su genoma. Dependiendo del vector de expresión y la técnica de transfección usada, solamente una fracción de células puede integrar el ADN ajeno en su genoma. Para identificar y seleccionar estos integrantes, se introduce generalmente un gen que codifica un marcador seleccionable (por ejemplo, resistencia a antibióticos) en las células hospedadoras junto con el gen de interés. Los marcadores seleccionables preferidos incluyen los que confieren resistencia a fármacos, tales como G418, higromicina y puomicina. Puede introducirse ácido nucleico que codifica un marcador seleccionable en una célula hospedadora en el mismo vector que el que codifica un producto de traducción detectable o puede introducirse en un vector separado. Pueden identificarse células transfectadas de forma estable con el ácido nucleico introducido mediante selección farmacológica (por ejemplo, las células que han incorporado el gen de marcador seleccionable sobrevivirán, mientras que las otras células morirán).

Receptor de superficie, se refiere a moléculas que aparecen en la superficie de las células, interactúan con el ambiente extracelular y transmiten o transducen la información con respecto al ambiente intracelularmente de manera que se module, en última instancia, la transcripción de promotores específicos dando como resultado la transcripción de genes específicos. Son ejemplos de receptores de superficie receptores tirosina quinasa, receptores de canales iónicos, receptores de citocinas, receptores de quimiocinas o un receptor acoplado a proteína G (GPCR), tales como receptores peptídicos quimioatrayentes, receptores neuropeptídicos, receptores lumínicos, receptores de neurotransmisores o receptores de hormonas polipeptídicas.

Receptores acoplados a proteína G (GPCR), también conocidos como **receptores de siete dominios transmembrana**, **receptores 7TM**, **receptores heptahelicoidales**, y **receptores ligados a proteína G (GPLR)**, son una gran familia de proteínas de receptores transmembrana caracterizados por siete dominios transmembrana con un extremo N extracelular y un extremo C citoplasmático. La unión del ligando al GPCR promueve cambios conformacionales que conducen a un acoplamiento de proteínas G pequeñas, el inicio de rutas de transducción de señales y en última instancia, de respuestas celulares. Los ligandos que se unen y activan estos receptores incluyen compuestos sensibles a la luz, olores, feromonas, hormonas y neurotransmisores, y varían en tamaño de moléculas pequeñas a péptidos a proteínas grandes. Solamente se encuentran receptores acoplados a proteína G en eucariotas superiores, incluyendo levaduras, plantas y, especialmente, animales. Los receptores acoplados a proteína G están implicados en muchas enfermedades, pero también son la diana de aproximadamente la mitad de todos los fármacos medicinales modernos.

Los GPCR actúan mediante un mecanismo molecular similar. La activación del GPCR por estímulos extracelulares provoca cambios conformacionales en el receptor, lo que da como resultado el acoplamiento intermedio y la activación de proteínas de unión a GTP (proteínas G). Las proteínas G son de naturaleza heterotrimérica y están compuestas de las subunidades alfa (α), beta (β) y gamma (γ) codificadas por genes distintos. La subunidad alfa es responsable de la unión de GDP y GTP. La unión de un ligando con un GPCR da como resultado una transición de la subunidad alfa (α) de una forma unida a GDP a una forma unida a GTP y conduce a la activación del heterotrímero mediante disociación del α -GTP del dímero $G\beta\gamma$. Tanto α -GTP como el dímero $G\beta\gamma$ regulan las actividades de una diversidad de efectores que transmiten la señal al interior celular mediante la producción de moléculas de segundos mensajeros (por ejemplo, calcio, AMPc, etc.). Hay al menos 17 genes Galfa ($G\alpha$), y los miembros de proteínas G pueden agruparse en cuatro clases principales denominadas $G\alpha_i$, $G\alpha_q/11$, $G\alpha_s$ y $G\alpha_{12/13}$. (Véase, por ejemplo, Preininger AM y Hamm HE. Sci. STKE 2004, re3 y Cabrera-Vera TM *et al.* Endocr Rev. Dic 2003; 24(6): 765-81). Como se usa en el presente documento, un GPCR comprende receptores acoplados a $G\alpha_i$, $G\alpha_q/11$, $G\alpha_s$ y $G\alpha_{12/13}$.

Receptor con actividad enzimática tirosina quinasa intrínseca (RTK), son receptores de superficie celular de alta afinidad para muchos factores de crecimiento polipeptídicos, citocinas y hormonas. De los noventa genes de tirosina quinasa únicos identificados en el genoma humano, 58 codifican proteínas receptoras tirosina quinasa. La mayoría de las RTK son receptores de una única subunidad, pero algunos, por ejemplo, el receptor de insulina, existen como 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 está compuesta de un dominio proteico muy grande que se une con ligandos extracelulares (por ejemplo, un factor de crecimiento particular). La región C terminal intracelular está comprendida por dominios reguladores y dominios responsables de la actividad quinasa de estos receptores, que específicamente fosforilan aminoácidos de tirosina.

Los receptores quiméricos, se basan en un receptor artificial que combina partes de un receptor con partes de otro receptor, fragmentos proteicos, marcadores y cualquier combinación de los mismos, incluyendo tanto dominios completos como partes de los mismos. En general, una **proteína quimérica** o “**proteína de fusión**” es un polipéptido que comprende al menos una parte del producto proteico deseado fusionado con al menos otra secuencia peptídica o con otro polipéptido.

Receptor que porta ITAM: un motivo inmunorreceptor de activación basado en tirosina (ITAM) es una secuencia conservada de cuatro aminoácidos que se repite dos veces en las colas citoplasmáticas de ciertas proteínas de superficie celular del sistema inmunitario. El motivo contiene una tirosina separada de una leucina o isoleucina por

otros dos aminoácidos cualesquiera, que proporcionan la identificación YxxL. Dos de estas identificaciones se separan típicamente por entre 7 y 12 aminoácidos en la cola de la molécula (YxxLx₍₇₋₁₂₎ YxxL). Los ITAM son importantes para transducción de señales en ciertas células hemopoyéticas como las células inmunitarias. Por lo tanto, se encuentran en las colas de moléculas de señalización celular importantes tales como las cadenas zeta y CD3 del complejo de receptor de linfocitos T, las cadenas CD79 alfa y beta del complejo de receptor de linfocitos B y ciertos receptores de Fc. Los restos de tirosina dentro de estos motivos se fosforilan después de la interacción de las moléculas receptoras con sus ligandos y forman sitios para interacción con otras proteínas implicadas en la liberación de calcio de almacenes intracelulares. Pueden desarrollarse ciertos receptores quiméricos que comprenden el dominio de unión a ligando extracelular de un receptor y al menos la región transmembrana e intracelular de un receptor que porta ITAM. Dichos receptores quiméricos inducen, tras la reticulación, la liberación de calcio de almacenes intracelulares.

Antagonista o inhibidor del receptor, se refiere a un agente que regula negativamente al menos una bioactividad de una proteína. Un antagonista, usado en el sentido más amplio, incluye cualquier molécula que bloquee parcial o completamente, inhiba o neutralice una actividad biológica de un marcador específico. Un antagonista también puede ser un compuesto que regula negativamente la expresión de un gen o que reduce la cantidad de proteína presente expresada. Pueden inhibir de forma competitiva, de forma no competitiva y/o de forma alostérica una bioactividad de una proteína.

Agonista o activador del receptor se refiere a un agente que imita, induce o regula positivamente (por ejemplo, potencia o complementa o mejora) la bioactividad de una proteína. Un agonista puede ser una proteína de tipo silvestre o derivado de la misma que tiene al menos una bioactividad de la proteína de tipo silvestre. Un agonista puede ser un compuesto que regula positivamente la expresión de un gen o que aumenta al menos una bioactividad de una proteína. Un agonista también puede ser un compuesto que aumente la interacción de un polipéptido con otra molécula, por ejemplo, un péptido o un ácido nucleico diana.

Señales extracelulares incluyen una molécula o un cambio en el ambiente que es transducido intracelularmente a través de proteínas de la superficie celular que interaccionan, directa o indirectamente, con la señal. Una señal extracelular o molécula efectora incluye cualquier compuesto o sustancia que de alguna manera altere específicamente la actividad de una proteína de la superficie celular. Los ejemplos de dichas señales incluyen, pero sin limitación, moléculas tales como acetilcolina, factores de crecimiento y hormonas, que se unen con la superficie celular y/o receptores intracelulares y canales iónicos y modula la actividad de dichos receptores y canales. Este término también incluye sustancias aún no identificadas que modulan la actividad de un receptor celular, y por lo tanto influyen en funciones intracelulares. Dichas señales extracelulares son agentes farmacológicos potenciales que pueden usarse para tratar enfermedades específicas modulando la actividad de receptores de superficie celular específicos.

Receptores huérfanos es una designación que se da a receptores para los que no se ha descrito ningún ligando natural específico.

Transducción de la señal es el procesamiento de señales químicas desde el ambiente celular a través de la membrana celular, y puede suceder mediante uno o varios mecanismos, tales como fosforilación, activación de canales iónicos, activación de enzimas efectoras mediante proteínas de unión a nucleótidos de guanina intermediarias, formación de fosfato de inositol, activación de adenil ciclasa y/o activación directa (o inhibición) de un factor transcripcional, etc.

Vector o vector plasmídico o plásmido: el término "vector" se usa para hacer referencia a una molécula de ácido nucleico vehículo en la que puede insertarse una secuencia de ácido nucleico para introducir en una célula en la que puede replicarse. Una secuencia de ácido nucleico puede ser "exógena", lo que significa que es ajena a la célula en la que se introduce el vector, o que la secuencia sea homóloga de una secuencia en la célula, pero en una posición dentro del ácido nucleico de la célula hospedadora en la que la secuencia no se encuentra habitualmente. Los vectores incluyen plásmidos, cósmidos, virus (bacteriófagos, virus animales y virus vegetales) y cromosomas artificiales (por ejemplo, YAC). Un experto en la materia estará bien equipado para construir un vector mediante técnicas recombinantes convencionales (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), ambas incorporadas en el presente documento por referencia).

Vector de expresión: la expresión "vector de expresión" se refiere a cualquier tipo de construcción genética que comprende un ácido nucleico que codifica un ARN capaz de transcribirse. En algunos casos, las moléculas de ARN se traducen después a una proteína, un polipéptido o un péptido. En otros casos, estas secuencias no se traducen, por ejemplo, en la producción de moléculas antisentido o ribozimas. Los vectores de expresión pueden contener una diversidad de "secuencias de control", que se refiere a secuencias de ácido nucleico necesarias para la transcripción y posiblemente la traducción de una secuencia codificante unida operativamente en una célula hospedadora particular. Además de secuencias de control que gobiernan la transcripción y la traducción, los vectores y los vectores de expresión pueden contener secuencias de nucleótidos que también cumplen otras funciones y se describen posteriormente.

Promotor: un “promotor” es una secuencia de control que es una región de una secuencia de ácido nucleico en la que se controlan el inicio y la velocidad de la transcripción. Puede contener elementos genéticos en los que pueden unirse proteínas reguladoras y moléculas, tales como la ARN polimerasa y otros factores de transcripción, para iniciar la transcripción específica de una secuencia de ácido nucleico. Las expresiones “situado operativamente”, “unido operativamente”, “bajo el control” y “bajo el control transcripcional” significan que un promotor está en una localización y/u orientación funcional correcta en relación con una secuencia de ácido nucleico para controlar el inicio de la transcripción y/o la expresión de esa secuencia.

Un promotor generalmente comprende una secuencia que actúa para situar el sitio de inicio para la síntesis de ARN.

El ejemplo mejor conocido de esto es la caja TATA, pero algunos promotores que carecen de una caja TATA, tales como, por ejemplo, el promotor para el gen de desoxinucleotidil transferasa terminal de mamífero y el promotor para los genes tardíos de SV40, un elemento discreto superpuesto en el sitio de inicio en sí mismo ayuda a fijar el lugar de inicio. Elementos promotores adicionales regulan la frecuencia del inicio de la transcripción. Típicamente, estos se localizan en la región 30 110 pb cadena arriba del sitio de inicio, aunque se ha mostrado que varios promotores contienen elementos funcionales también cadena abajo del sitio diana. Para poner una secuencia codificante “bajo el control de” un promotor, se sitúa el extremo 5' del sitio de inicio de la transcripción de la fase de lectura de la transcripción “cadena abajo” (es decir, 3') del promotor seleccionado. El promotor “cadena arriba” estimula la transcripción del ADN y promueve la expresión del ARN codificado.

La separación entre elementos promotores es con frecuencia flexible, de modo que la función promotora se conserva cuando los elementos se invierten o se mueven entre sí. En el promotor tk, la separación entre elementos promotores puede aumentarse hasta 50 pb de distancia antes de que comience a reducirse la actividad. Dependiendo del promotor, parece que los elementos individuales pueden actuar bien cooperativamente o bien independientemente para activar la transcripción. Un promotor puede usarse o no junto con un “potenciador”, que se refiere a una secuencia reguladora de acción en cis implicada en la activación transcripcional de una secuencia de ácido nucleico.

Un promotor puede ser uno asociado naturalmente con una molécula de ácido nucleico, como puede obtenerse aislando las secuencias no codificantes 5' cadena arriba del segmento codificante y/o el exón. Dicho promotor puede denominarse “endógeno”. De forma similar, un potenciador puede ser uno asociado de forma natural con una molécula de ácido nucleico, localizada bien cadena abajo o bien cadena arriba de esa secuencia. Como alternativa, se obtendrán ciertas ventajas situando el segmento de ácido nucleico codificante bajo el control de un promotor recombinante o heterólogo, que se refiere a un promotor que normalmente no está asociada con una molécula de ácido nucleico en su ambiente natural. Un potenciador recombinante o heterólogo se refiere también a un potenciador no asociado normalmente con una molécula de ácido nucleico en su ambiente natural. Dichos promotores o potenciadores pueden incluir promotores o potenciadores de otros genes, y promotores o potenciadores aislados de cualquier otro virus, o célula procariota o eucariota, y promotores o potenciadores “de origen no natural”, es decir, que contienen diferentes elementos de diferentes regiones reguladoras de la transcripción y/o mutaciones que alteran la expresión. El promotor puede ser heterólogo o endógeno.

Señal de poli-A o señal de terminación: los vectores o las construcciones de la presente invención generalmente comprenderán al menos una señal de terminación. Un “señal de terminación” o “terminador” comprende una secuencia de ADN implicada en la terminación específica de un transcrito de ARN por una ARN polimerasa. Por lo tanto, en ciertas realizaciones se contempla una señal de terminación que finaliza la producción de un transcrito de ARN. También puede ser necesario un terminador *in vivo* para conseguir niveles de mensaje deseables.

En sistemas eucariotas, la región terminadora también puede comprender secuencias de ADN específicas que permiten la escisión específica de sitio del nuevo transcrito para exponer un sitio de poliadenilación. Esto señala una polimerasa endógena especializada para añadir un tramo de aproximadamente 200 restos de adenosina (poliA) al extremo 3' del transcrito. Las moléculas de ARN modificadas con esta cola de poliA parecen ser más estables y se traducen más eficazmente. Por lo tanto, en otras realizaciones que implican eucariotas, se prefiere que el terminador comprenda una señal para la escisión del ARN, y se prefiere más que la señal terminadora promueva la poliadenilación del mensaje. Los elementos de sitio de poliadenilación y/o terminadores pueden actuar para potenciar los niveles de mensaje y para minimizar la lectura completa del casete a otras secuencias

Péptido de señal o una secuencia de señal: un **péptido señal** es una cadena peptídica corta (3-60 aminoácidos de longitud) que dirige el transporte postraduccion de una proteína. Los péptidos señal también pueden denominarse **señales de dirección**, **secuencias señal**, **péptidos de tránsito** o **señales de localización**. Las secuencias de aminoácidos de péptidos señal dirigen proteínas (que se sintetizan en el citosol) a ciertos orgánulos tales como el núcleo, la matriz mitocondrial, el retículo endoplásmico, el cloroplasto, apoplasto y peroxisoma. Algunos péptidos señal se escinden de la proteína por peptidasa señal después de transportarse las proteínas.

Zimógeno o proenzima: un **zimógeno** (o una **proenzima**) es un precursor enzimático inactivo. Un zimógeno requiere un cambio bioquímico (tal como una reacción de hidrólisis que revela el sitio activo, o cambio de la configuración para revelar el sitio activo) para convertirse en una enzima activa. El cambio bioquímico sucede habitualmente en un lisosoma en el que una parte específica de la enzima precursora se escinde para activarlo. La

cadena de aminoácidos que se libera tras la activación se denomina el péptido de activación.

Zimogenidad: la **zimogenidad** o el **índice de zimogenidad** es la relación de la actividad de una enzima procesada, por ejemplo, por una proteasa, con respecto a la actividad del zimógeno en cualquier sustrato dado. Es una medida de lo eficazmente que se restringe el zimógeno, correspondiendo un gran número con una actividad insignificante del zimógeno. Por ejemplo, la caspasa-3 tiene un índice de zimogenidad de aproximadamente 10.000 mientras que la caspasa-8 tiene 100, la caspasa-9 tiene 10 y el activador de plasminógeno tisular tiene 2-10 (véase, por ejemplo, Stennicke HR y Salvesen GS. *Cell Death and Differentiation* (1999) 6, 1054 -1059).

Proteína permutada circularmente: una proteína se ha permutado circularmente si los extremos N y C terminales de la proteína se han movido artificialmente a otra posición en la estructura proteica, por ejemplo, por técnicas de biología molecular. Si una secuencia proteica se lee del extremo N a C terminal y se representa por ABCDEFGH entonces una molécula permutada circularmente podría ser DEFGHABC. Por lo tanto, la permutación circular representa una forma de isomerización macromolecular cuando los extremos normales están unidos covalentemente y se introducen nuevos términos rompiendo la cadena principal proteica en otra parte. Las enzimas permutadas circularmente útiles para los métodos de la presente invención son solamente enzimas en las que la permutación circular crea una proenzima o un zimógeno con un alto índice de zimogenidad desprovisto de actividad enzimática que podría convertirse en una enzima activa por una escisión por proteasa.

Etiqueta peptídica: las etiquetas peptídicas son péptidos cortos que pueden usarse para detectar proteínas, por ejemplo, con anticuerpos cuando no están disponibles anticuerpos específicos para la proteína o para la purificación de proteínas. Son ejemplos de etiquetas peptídicas conocidas que podrían usarse para detección y separación de superficie celular, la etiqueta c-myc, la etiqueta HA y la etiqueta FLAGTM. En general, podría usarse cualquier etiqueta peptídica para la que esté disponible una proteína de unión específica para la detección en superficie y/o separación, siempre que dicha proteína de unión se marque directa o indirectamente con un fluoróforo o, por ejemplo, con una perla para separación de superficie.

Cascada de amplificación: Las cascadas de amplificación de enzimas acopladas representan un método para potenciar la magnitud de la señal inicial que será cuantificada. Estas cascadas se basan en la propiedad multiplicativa inherente de sistemas multienzimáticos, concretamente, que un producto de una de las reacciones debe ser un catalizador o cofactor para una reacción enzimática posterior. El mejor ejemplo de una cascada de amplificación de proteasa es la cascada de coagulación sanguínea, en la que la primera proteasa activa un zimógeno para producir una proteasa activa y esta segunda proteasa también activa un zimógeno para producir una segunda proteasa activa, creando de este modo una cascada en la que señal inicial se amplifica hasta 1000 veces.

Actividad basal enzimática o actividad basal de zimógeno: La actividad basal de un zimógeno se define como la relación de actividad enzimática en un medio definido en el que no se ha añadido ninguna proteasa activadora de zimógeno, por ejemplo, el sobrenadante de cultivo celular o un medio compatible con el cultivo celular en condiciones no estimuladas y actividad enzimática en el mismo medio desprovisto de zimógeno.

Secreción basal: La 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 celulares secretores puede detectarse un nivel de secreción basal. No se sabe si la secreción basal resulta de la liberación de proteína almacenada en gránulos o de una fracción de proteína de nueva síntesis que se separa de los gránulos secretores (véase, por ejemplo, Burgoyne RD y Morgan A. *Physiol Rev* (2003) 83: 581-632). Por ejemplo, en células acinares de parótida de rata algunas proteínas secretoras se separan de los gránulos secretores durante su biogénesis para alcanzar vesículas secretoras constitutivas que realizan la liberación basal (véase, por ejemplo, Arvan P y Castle D. *Biochem J* (1998), 332: 593-610). Las células acinares de la parótida liberan algo de amilasa mediante una secreción constitutiva verdadera mientras que también empaquetan amilasa y otras proteínas secretoras (tales como proteína secretora de la parótida, PSP) en gránulos secretores convencionales, que experimentan exocitosis en respuesta a un modulador de exocitosis. Otro ejemplo de la relación entre la secreción constitutiva o la basal frente al aspecto regulado de la exocitosis se demuestra en la célula epitelial mamaria (véase Burgoyne RD y Duncan JS. *J Mamm Gland Biol Neoplasia*, (1998) 3: 275-286). Estas células secretan cantidades copiosas de constituyentes de la leche, incluyendo las proteínas de la leche, las caseínas, en gran medida por una vía aparentemente constitutiva, pero aproximadamente un tercio de la caseína sintetizada permanece en un grupo intracelular almacenado y puede liberarse en respuesta al aumento de Ca²⁺ en células intactas.

Molécula de ADN recombinante (ADNr), se refiere a una molécula de ADN producida uniendo operativamente una secuencia de ácido nucleico, tal como un gen, con una secuencia de molécula de ADN. Por lo tanto, una molécula de ADN recombinante es una molécula de ADN híbrida que comprende al menos dos secuencias de nucleótidos no halladas normalmente juntas en la naturaleza. Con frecuencia, la introducción de un ADN recombinante que comprende al menos un promotor y una secuencia de ADN codificante para un polipéptido no halladas normalmente juntas en la naturaleza se dice que son "heterólogas" cuando se introducen en una célula eucariota. También se dice que la proteína producida por dicho ADN heterólogo o recombinante es "heteróloga". En el contexto de expresar una secuencia de ácido nucleico heteróloga, la "célula hospedadora" se refiere a una célula procarionota o eucariota que es capaz de replicar un vector y/o expresar un gen heterólogo codificado por un vector. Cuando las células

hospedadoras se “transfectan” o “transforman” con moléculas de ácido nucleico, se denominan células o células hospedadoras “modificadas técnicamente” o “recombinantes”, por ejemplo, una célula en la que se ha introducido una secuencia de ácido nucleico exógena, tal como, por ejemplo, un vector. Por lo tanto, las células recombinantes son distinguibles de células de origen natural que no contienen un ácido nucleico introducido de forma recombinante. Los ejemplos de células hospedadoras incluyen, pero sin limitación, cepas de *E. coli*, que contienen el factor F o F' (por ejemplo, DH5 alfa F o DH5 alfa F') o cepas de *E. coli* que carecen del factor F o F' (por ejemplo, DH10B). Se dice que un hospedador es compatible si permite la replicación del vector o la expresión de los polipéptidos clonados en el vector.

Cebador, como se usa en el presente documento se refiere a un oligonucleótido, bien de origen natural como en un producto de digestión de restricción purificado, o producido de forma sintética, que es capaz de actuar como un punto de inicio para la síntesis del ácido nucleico cuando se coloca en condiciones en las que se induce la síntesis de un producto de extensión de cebadores que es complementario de una cadena de ácido nucleico, (es decir, en presencia de nucleótidos y un agente inductor tal como ADN polimerasa y a una temperatura y un pH adecuados).

PCR se refiere al método de reacción en cadena de la polimerasa de amplificar enzimáticamente una región de ADN. Este procedimiento de amplificación exponencial se basa en ciclos repetidos de desnaturalización, hibridación de cebadores oligonucleotídicos y extensión de cebadores por un agente de polimerización de ADN tal como una ADN polimerasa termoestable (por ejemplo, las enzimas Taq o Tfl ADN polimerasa aisladas de *Thermus aquaticus* o *Thermus flavus*, respectivamente).

Polienlazador o sitio de clonación múltiple (MCS) o policlonación, se refieren a un grupo de sitios de enzimas de restricción en una construcción de ácido nucleico, que se utilizan para la inserción y/o la escisión de secuencias de ácido nucleico.

Endonucleasas de restricción o enzimas de restricción o endonucleasa, se refieren a enzimas (por ejemplo, bacterianas) cada una de las cuales cortan ADN bicatenario en o cerca de una secuencia de nucleótidos específica. Los ejemplos incluyen, pero sin limitación, Avall, BamHI, EcoRI, HindIII, HincII, NcoI, SmaI y RsaI.

Medio de cultivo selectivo se refiere al medio de cultivo usado para cultivar células que se han complementado con uno o más agentes selectivos, por ejemplo, antibióticos.

Marcador seleccionable o secuencia de marcador seleccionable o gen marcador seleccionable, se refiere a un gen, u otro fragmento de ADN, que codifica o proporciona una actividad que confiere la capacidad para crecer o sobrevivir en lo que sería de otro modo un ambiente deletéreo. Por ejemplo, un marcador seleccionable puede conferir resistencia a un antibiótico o fármaco a la célula en la que se expresa el marcador seleccionable. También puede usarse un origen de replicación (Ori) como un marcador seleccionable que permite la propagación de un vector plasmídico. Una **región marcadora** seleccionable, en referencia a la secuencia de un vector, se refiere a la parte de un componente del vector que contiene todas las secuencias marcadoras seleccionables presentes en un componente particular del vector. En otras palabras, los extremos de secuencias marcadoras seleccionables presentes definen la región marcadora seleccionable. Por ejemplo, si un componente particular del vector tuviera solamente una secuencia marcadora seleccionable, la región marcadora seleccionable se definiría por el comienzo de la secuencia marcadora seleccionable y el final de la secuencia marcadora seleccionable. Si un componente particular de vector tuviera, por ejemplo, dos secuencias marcadoras seleccionables, la región marcadora seleccionable es la secuencia de ácido nucleico entre el comienzo de la primera secuencia marcadora seleccionable y el final de la segunda secuencia marcadora seleccionable.

Clonar o clonando cuando se usa en referencia a una secuencia de inserto y vector, significa el ligamiento de la secuencia del inserto en un vector capaz de replicarse en un hospedador. El término “clonar” cuando se usa en referencia a una secuencia de inserto, un vector y una célula hospedadora se refiere en general a realizar copias de una secuencia de inserto dada. A este respecto, para clonar un trozo de ADN (por ejemplo, secuencia de inserto), se insertaría en un vector (por ejemplo, un plásmido) que después puede ponerse en un hospedador (habitualmente una bacteria) de modo que el plásmido y el inserto se repliquen con el hospedador. Una bacteria individual se cultiva hasta que es visible como una única colonia en medio nutritivo, la colonia se selecciona y se deja crecer en cultivo líquido, y el plásmido que contiene el ADN “clonado” se vuelve a aislar de la bacteria, momento en el cual habrá muchos millones de copias del ADN. El término “clon” también puede referirse a una bacteria que porta un ADN clonado o al ADN clonado en sí mismo.

La transformación o transfección como se usa en el presente documento se refiere a la introducción del ADN ajeno en células (por ejemplo, células procariotas o eucariotas). La transformación también puede conseguirse por diversos medios conocidos en la técnica incluyendo co-precipitación de fosfato cálcico-ADN, transfección mediada por DEAE-dextrano, transfección mediada por polibreno, electroporación, microinyección, fusión de liposomas, lipofección, fusión de protoplastos, infección retroviral y biolística. En particular, la transfección en células eucariotas podría ser transitoria cuando no se incluya un antibiótico adecuado en el medio de cultivo celular para la selección de células que portan una integración estable de ADN en los cromosomas. Los vectores plasmídicos para selección estable deben tener un marcador seleccionable que se exprese en las células que van a seleccionarse con un

antibiótico. Aunque podría usarse la transfección transitoria en los métodos de la presente invención son células preferidas las hechas estables por selección de antibióticos.

5 Breve descripción de los dibujos

FIGURA 1. Dibujo del concepto general de la presente invención, usando una serin proteasa como reportero almacenado en gránulos, el receptor de IgE como el receptor de superficie celular que modula la exocitosis de los gránulos y un sustrato basado en FRET escindido por el reportero proteasa almacenado en los gránulos secretado para la detección. El tratamiento de las células con un antígeno multimérico (por ejemplo, un alérgeno) que se une con un IgE unido al receptor de afinidad, induce la liberación de la proteasa almacenada en los gránulos y dicha proteasa escinde el sustrato para producir un producto final fluorescente. Usando este sustrato específico de la enzima reportera secretada, puede determinarse la interacción del ligando con receptor.

FIGURA 2. Dibujo del concepto general de la presente invención, usando una serin proteasa como reportero almacenado en los gránulos, un GPCR como receptor de superficie celular que modula la exocitosis de los gránulos y un sustrato basado en FRET escindido por el reportero proteasa almacenado en los gránulos secretado para la detección. El tratamiento de las células con un agonista del GPCR induce la liberación de la proteasa almacenada en los gránulos, y dicha proteasa escinde el sustrato para producir un producto final fluorescente y dicha proteasa escinde el zimógeno para producir una enzima activa. Usando un sustrato específico de la enzima reportera secretada, puede determinarse la interacción del ligando con receptor.

FIGURA 3. Estructura general de los vectores plasmídicos representativos de la presente invención. Mapa del vector plasmídico con resistencia a higromicina usado para expresar de forma estable la enzima B bajo el control de un promotor constitutivo fuerte hCMV-MoMLV5'-LTR quimérico (A) o el promotor inducible por tetraciclina (B). Mapa del vector plasmídico con resistencia a neomicina usado para expresar un receptor de superficie funcional, tal como un GPCR, usando el péptido señal de la cadena kappa de la inmunoglobulina de ratón, un marcador c-myc para la detección en superficie con anticuerpo monoclonal anti-cmyc y una secuencia de glucosilación de GPCR viral para la sobreexpresión bajo el control del promotor de MoMLV5'LTR (C) o bajo el control de Promotor Inducible por Tetraciclina (D).

FIGURA 4. Un ejemplo de un ensayo en el que la línea celular RBL-2H3 se transfecta de forma estable tanto con granzima B humana almacenada en gránulos secretores y un receptor muscarínico humano de tipo II marcado con c-myc en N-terminal (CHRM2) bajo el control de un promotor de MoMLV5'LTR y que comprende un péptido señal y una secuencia de glicosilación viral para la expresión eficaz en superficie. (1) El tratamiento con carbacol (un agonista de CHRM2) induce un aumento en la concentración de calcio intracelular (2) que induce la liberación de los gránulos de granzima B secretada (3) que se detecta con 5'FAM-SGIEPDGVTAMRA, un sustrato de la granzima B basado en FRET (4) usando excitación a 485 nm y emisión a 535 nm. El aumento de la fluorescencia a 535 nm es proporcional a la cantidad de granzima B liberada. Los reporteros secretados pueden detectarse directamente o la señal puede amplificarse por medio de una proenzima como la procaspasa-3 humana para la detección aún más sensible del reportero secretado.

FIGURA 5. Dibujo del ensayo de doble cadena realizado con los métodos descritos en la presente invención. Se mezclan dos líneas celulares diferentes (A) y (B), en el mismo recipiente de reacción. La línea celular A expresa una combinación de GPCR1 (modulador de la exocitosis)-proteasa reportera 1 almacenada en los gránulos. El GPCR1 tiene el Ligando 1 como agonista, mientras que la proteasa reportera 1 escinde el sustrato 1 (por ejemplo, un sustrato basado en FRET) que se lee a longitud de onda 1. La línea celular B expresa una combinación de GPCR2 (modulador de exocitosis)- proteasa reportera 2 almacenada en gránulos. El GPCR2 tiene al Ligando 2 como agonista, mientras que la proteasa reportera 2 escinde el sustrato 2 (por ejemplo, un sustrato basado en FRET) que se lee a longitud de onda 2. El tratamiento de una mezcla de células A y B con una mezcla de Ligando 1 y Ligando 2 de los GPCR1 y GPCR2 induce la liberación de las proteasas almacenadas en los gránulos 1 y 2 y podría determinarse el aumento de la fluorescencia a las longitudes de onda 1 y 2.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

A. Breve descripción de la invención

La presente invención se refiere a un nuevo sensor basado en células útil para el descubrimiento de fármacos, diagnóstico y determinación de analitos, que comprende una línea celular con exocitosis regulada profesional de gránulos secretores transfectados con granzima B como polipéptido proteasa reportera almacenada en los gránulos secretores regulados de la línea celular con exocitosis regulada profesional, y que tienen un receptor de superficie heterólogo como un modulador de la exocitosis regulada de los gránulos secretores, teniendo dicha proteasa reportera almacenada en los gránulos al menos: una alta resistencia a condiciones ya presentes dentro de los gránulos tales como pH bajo y proteólisis por otras proteasas; actividad enzimática después de la exocitosis; una

secuencia de escisión altamente específica; un nivel muy bajo de secreción en condiciones no estimuladas o basales; y una alta actividad de señal con respecto al fondo en un medio compatible con la viabilidad del cultivo celular y la exocitosis de los gránulos para una detección robusta y sensible de alto rendimiento.

5 Cuando el sensor basado en células se incuba con un ligando específico del modulador de exocitosis, el polipéptido reportero se libera de los gránulos al medio extracelular y la actividad enzimática de dicho polipéptido reportero liberado se detecta con un sustrato específico. La presente invención también permite el desarrollo de ensayos múltiples mezclando en el mismo recipiente de reacción al menos dos líneas celulares, cada una con un par diferente de proteasas reporteras almacenadas en los gránulos-moduladores de exocitosis y la detección de la exocitosis con sustratos altamente específicos de cada proteasa reportera almacenadas en los gránulos.

El sensor basado en células de la presente invención comprende por lo tanto: una línea celular hemopoyética con exocitosis regulada profesional; una proteasa reportera almacenada en los gránulos, transfectada en dicha línea celular hemopoyética y dicho reportero almacenado en los gránulos bajo el control de un promotor adecuado; un modulador de exocitosis, por ejemplo, un receptor de superficie como un GPCR bajo el control de un promotor adecuado y un sustrato específico para la detección de la proteasa reportera almacenada en los gránulos secretados.

Dicho sensor basado en células sensible es útil para ensayar interacciones entre al menos dos moléculas, una que actúa como el modulador de exocitosis y la otra como el ligando específico del modulador de exocitosis. Son ejemplos de usos de dichos sensores: ensayar interacciones entre moléculas en el descubrimiento de fármacos, cuantificar moléculas tales como proteínas para 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.

El sensor de la presente invención es sensible y, por lo tanto, usa una menor cantidad de células que los sensores actualmente disponibles, la respuesta es más rápida que la de sensores basados en promotores inducibles, no es necesaria lisis para la liberación de los reporteros, la señal puede medirse bien en modo de punto final o en modo cinético, todos los reactivos pueden mezclarse y después leerse, no se necesitan etapas de lavado o de detención aumentando de este modo el rendimiento, se obtiene una alta señal con respecto al fondo para un ensayo robusto e incluso son posibles etapas de amplificación de la señal para la detección aún más sensible. El sensor de la presente invención también permite el desarrollo de ensayos múltiples mezclando en el mismo recipiente de reacción al menos dos líneas celulares, cada una con un par diferente de moduladores de la exocitosis- proteasas reporteras almacenadas en los gránulos y detectando la exocitosis con sustratos altamente específicos de cada proteasa reportera almacenada en los gránulos. Dichos ensayos múltiples reducen el coste por ensayo y mejoran la calidad de la señal, ya que cada ensayo tiene el otro ensayo realizado en el mismo pocillo como control interno.

B. Descripción detallada de la invención

La presente invención se entiende mejor por la descripción de las propiedades relevantes de cada componente del sensor, es decir, de las células con exocitosis regulada profesional, la proteasa reportera almacenada en los gránulos, moduladores de la exocitosis, promotores y condiciones para expresión tanto de la proteasa reportera almacenada en los gránulos como de los moduladores de la exocitosis y los sistemas de detección.

B.1. Células útiles para los métodos de la presente invención

La presente invención se refiere a un nuevo sensor basado en células útil para el descubrimiento de fármacos, diagnóstico y determinación de analitos que comprende una línea celular con exocitosis regulada profesional de gránulos secretores transfectados con una proteasa como un polipéptido reportero almacenado en los gránulos secretores regulados de la línea celular con exocitosis regulada profesional y que tienen una molécula endógena o una heteróloga como un modulador de la exocitosis regulada de los gránulos secretores, teniendo dicha proteasa reportera almacenada en los gránulos al menos: una alta resistencia a las condiciones ya presentes dentro de los gránulos tales como de pH bajo y proteólisis por otras proteasas; actividad enzimática después de la exocitosis; una secuencia de escisión altamente específica; un nivel muy bajo de secreción en condiciones no estimuladas o basales; y una alta señal con respecto a actividad de fondo en un medio compatible con la viabilidad del cultivo celular y la exocitosis de los gránulos para una detección robusta y sensible de alto rendimiento.

Se conocen bien en el estado de la técnica gránulos secretores y su exocitosis regulada y se han estudiado más exhaustivamente en varios tipos celulares elegidos como sistemas de modelo, debido a ciertas ventajas experimentales o debido a su interés fisiológico o patofisiológico crucial (véase, por ejemplo, Burgoyne, RD y Morgan, A. Physiological Reviews, Vol. 83, n.º 2, abril de 2003, pp. 581-632). Probablemente, los tipos celulares más estudiados han sido la célula cromafina adrenal (y su homólogo tumoral la línea celular PC12), la célula beta-pancreática y células hemopoyéticas como mastocitos, plaquetas y neutrófilos, pero también se produce exocitosis de gránulos secretores, sin embargo, en muchos tipos celulares neuroendocrinos y endocrinos diferentes para la secreción de péptidos y otras hormonas y en células exocrinas para la secreción de enzimas digestivas. Además, se ha demostrado que incluso en líneas celulares secretoras no profesionales tales como las líneas celulares fibroblastoides (células CHO) existe una ruta regulada por Ca²⁺ para exocitosis y probablemente todos los tipos

celulares podrían poseer una ruta exocitótica regulada, es decir, pueden desencadenarse lisosomas convencionales por Ca^{2+} para experimentar exocitosis. No obstante, los lisosomas secretores son una clase definida de orgánulo secretor regulado y esta capacidad exocítica claramente los separa de los lisosomas convencionales. Aunque los lisosomas convencionales también pueden fusionarse con la membrana plasmática y liberar sus contenidos solubles después de la estimulación (1), el alcance de la secreción desencadenada por Ca^{2+} de las enzimas lisosómicas de células tales como fibroblastos y células epiteliales, tiende a ser solamente del 10-20 % (2). En comparación, hasta el 80 % de los marcadores lisosómicos se liberan tras un desencadenamiento fisiológico de las células que poseen los lisosomas secretores, denominadas en el presente documento, células con exocitosis regulada profesional. Por lo tanto, 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 las células hemopoyéticas, neutrófilos, basófilos, eosinófilos, linfocitos T, tales como linfocitos T citotóxicos y linfocitos Citolíticos Naturales (linfocitos NK). Es importante para la función normal de todas las células anteriores, la exocitosis regulada de amplias cantidades de componentes almacenados como proteasas, tales como granzimas, proteasas de mastocitos, catepsinas y otras enzimas hidrolíticas como glucosidasas. Por lo tanto, las células hemopoyéticas con exocitosis regulada profesional son células altamente relevantes para los métodos de la presente invención.

En una realización de la presente invención, las células se seleccionan de un grupo de líneas celulares hemopoyéticas con exocitosis regulada profesional seleccionada de células tales como linfocitos T citotóxicos, neutrófilos, mastocitos y basófilos que usan sus lisosomas secretores para almacenar componentes especializados tales como serin proteasas, granzimas, catepsinas, proteasas de mastocitos, elastasas de neutrófilos y proteinasa3 además de su contenido lisosómico habitual que comprende varias hidrolasas como glucosidasas y melanina, histamina y serotonina.

En otra realización de la presente invención, las células preferidas se seleccionan de RBL-2H3, una línea celular de leucemia basófila de rata, línea celular 32D de ratón, una célula hemopoyética de médula ósea de ratón, línea celular NK92 humana, una línea celular citolítica natural y línea celular YT humana, una línea celular citolítica natural y línea celular MC/9 de ratón, un mastocito de ratón. Una línea celular particularmente preferida para los métodos de la presente invención es RBL-2H3 porque esta línea celular tiene un nivel de secreción constitutiva muy bajo y alta secreción inducida y los reporteros preferidos de la presente invención como las granzimas que producen un sensor con una alta señal con respecto a fondo.

B.2. Moduladores de exocitosis

La presente invención también comprende moduladores de la exocitosis.

Una clase importante de moduladores de la exocitosis son receptores de superficie que comprenden receptores acoplados a proteína G (GPCR), receptores con actividad tirosina quinasa intrínseca, receptores con actividad tirosina quinasa asociada y receptores que portan un motivo ITAM como los receptores de Fc gamma y épsilon endógenos o heterólogos, o receptores que portan un motivo ITIM normalmente implicado en el reconocimiento de antígenos y presente en muchos receptores celulares hemopoyéticos.

Por lo tanto, los moduladores de la exocitosis son receptores de superficie que, tras la unión con el ligando, provocan la exocitosis de los reporteros almacenados dentro de los gránulos de las células con exocitosis regulada. Dichos moduladores de la exocitosis son moduladores de exocitosis heterólogos transfectados como GPCR o receptores de Fc gamma o receptores de Fc épsilon. En otra realización de la invención, los moduladores de la exocitosis pueden ser receptores de superficie que, tras la unión con el ligando, inhiben la exocitosis de los reporteros inducida por la unión del ligando con otro receptor. En una realización adicional, los moduladores de la exocitosis pueden comprender receptores quiméricos con una región extracelular para la unión al ligando y una región transmembrana e intracelular para la transducción de señales, por ejemplo, un receptor quimérico entre la región extracelular del receptor de interleucina-2 que comprende la región de unión con IL-2 y al menos la región transmembrana e intracelular de receptor de Fc épsilon I de rata que comprende secuencias ITAM y otras secuencias necesarias para la transducción de señales.

En una realización, los receptores de superficie celular se seleccionan de receptores acoplados a proteínas G (GPCR), receptores con actividad tirosina quinasa intrínseca o asociada y receptores que contienen ITAM que tras la unión específica con el ligando provocan la exocitosis de los reporteros almacenados en los gránulos.

Los GPCR se clasifican de acuerdo con la señal que transducen en cuatro tipos principales: receptores acoplados a $\text{G}\alpha_i/o$, $\text{G}\alpha_q/11$, $\text{G}\alpha_s$ y $\text{G}\alpha_{12/13}$. Los GPCR acoplados a Alfa-s aumentan el AMP cíclico dentro de células, mientras que los GPCR acoplados con alfa-i/o bloquean el aumento en AMP cíclico dentro de las células. Los GPCR acoplados a Alfa-q aumentan el calcio intracelular y alfa-12/13 producen una activación de la GTPasa pequeña citosólica, Rho. No obstante, se conoce bien en el estado de la técnica que las células hemopoyéticas tienen cadenas alfa-15/16 promiscuas que acoplan el GPCR acoplados con alfa-s , alfa-12/13 y alfa-i/o con un aumento del calcio intracelular y la presente invención aprovecha este hecho. En una realización de la presente invención, los GPCR que pueden usarse para la exocitosis de reporteros a partir de los gránulos, pueden seleccionarse de GPCR

acoplados a alfa-q/11, alfa-12/13, alfa-i/o o alfa-s. Los GPCR seleccionados como moduladores de la exocitosis en los métodos de la presente invención pueden ser receptores de longitud completa o receptores en los que la cola C terminal se ha eliminado parcial o completamente.

Se sabe que tras la unión del ligando, algunos GPCR inducen la liberación de beta-hexosaminidasa, pero según el estado de la técnica esta parece ser una propiedad de solamente algunos GPCR. Por ejemplo, se ha indicado que el receptor de adenosina 3 no induce desgranulación por sí mismo, sino que potencia la desgranulación inducida por dosis subóptimas de IgE y antígeno. Se ha demostrado desgranulación principalmente en receptores de quimiocinas y ciertos GPCR acoplados a alfa-i expresados de forma endógena en mastocitos y basófilos tales como células RBL-2H3. Además, se ha demostrado exocitosis de gránulos en el receptor muscarínico de acetilcolina de tipo I y de tipo III, ambos GPCR acoplados a alfa-q, sobreexpresados en células RBL-2H3. No obstante existe controversia acerca de la ruta que conduce a la desgranulación. Por ejemplo, Barlic *et al* indicaron que GPCR acoplado a alfa-i IL8RA (CXC1 R) desprovisto del extremo C terminal era incapaz de desgranular en RBL-2H3 e incluso se atribuía dicha pérdida de desgranulación a los restos de serina que fosforilan y se unen con las arrestinas tras la interacción con interleucina-8. Otros investigadores han puesto en duda dichos resultados proporcionando pruebas de que un IL8RA truncado en el extremo C terminal (CXC1R) es aún más eficaz en la desgranulación que el receptor natural, probablemente debido a una menor velocidad de internalización después de la unión al ligando. Todos los resultados anteriores usaron beta-hexosaminidasa como reportero y el promotor de CMV, un promotor extremadamente débil para la mayoría de los GPCR en células como RBL-2H3 y silenciado parcialmente en células hemopoyéticas como RBL-2H3.

Durante la experimentación se ha descubierto que el receptor de adenosina 3 humano (ADORA3) cuando se clona en un vector adecuado, tal como los descritos en los métodos de la presente invención, es un modulador de exocitosis extremadamente potente, planteando por lo tanto dudas sobre el estado anterior de la técnica basándose principalmente en GPCR expresados bajo el control del promotor de hCMV que es extremadamente bajo en células como RBL2H3 para la mayoría de los GPCR y se silencia a lo largo del tiempo en esas células para ciertos GPCR que se expresan bajo el control del promotor de hCMV. Además, el vector previo no usó ninguna secuencia para ayudar a la expresión en la superficie del GPCR. Todas las diferencias anteriores hacen al sensor de los inventores altamente sensible y por lo tanto útil en el descubrimiento de fármacos.

Otra consideración importante para un sensor basado en células útil es el nivel de expresión de la diana para modular por un ligando. Las dianas como receptores de superficie, por ejemplo, se expresan en la superficie celular en cantidades de menos de 1000 moléculas por célula a más de 500.000 moléculas por célula y por lo tanto hay una variación de hasta 1.000 veces en el nivel de expresión de las moléculas diana. El GPCR, la clase principal de receptores de superficie, se expresa a niveles generalmente bajos y aproximadamente sólo el 10 % de los GPCR tienen un péptido señal en el extremo N terminal, mientras que la amplia mayoría usa el primer dominio transmembrana como una señal para translocación a la membrana, probablemente ayudado por ciertas chaperonas para expresión en superficie. En general, un nivel de expresión mayor de la diana dará como resultado una mayor sensibilidad del sensor y, por lo tanto, se desea la búsqueda de condiciones para la sobreexpresión de dianas proteicas, especialmente receptores de superficie.

La presente invención también comprende promotores y secuencias útiles para la expresión de los receptores acoplados a proteína G en la superficie de las células útiles para los métodos de la invención. En una realización, los promotores adecuados para expresión constitutiva de GPCR pueden seleccionarse a partir de un grupo que comprende promotores de factor de elongación 1 alfa humano o de ratón (SEQ ID NO: 1), fosfoglicerato quinasa humana (SEQ ID NO: 6), promotor del virus de sarcoma de Rous (VSR) (SEQ ID NO: 2) y 5' LTR del promotor del virus de leucemia murina de Moloney MoMLV-LTR (SEQ ID NO: 3). Dichos promotores no se silencian a lo largo del tiempo en las células hemopoyéticas usadas en los métodos de la presente invención. En una realización de la presente invención, los promotores adecuados para la expresión de GPCR en superficie son promotores inducibles. En una realización adicional, los promotores inducibles para la expresión de GPCR en la superficie celular pueden seleccionarse de un grupo que comprende el promotor inducible por tetraciclina, el promotor inducible por ecidisona, el promotor inducible por cumato y el promotor inducible por progesterona.

En otra realización, los GPCR pueden comprender un péptido señal para la sobreexpresión en superficie y una etiqueta para la detección en superficie y/o la separación de células positivas, por ejemplo, por citometría de flujo o por perlas magnéticas. Por ejemplo, Andersson, H *et al* (véase Andersson *et al* Mol Pharmacol (2003) 64: 570-577) han demostrado que la adición de un péptido señal en el extremo N terminal de CB1 o el acortamiento de la cola N larga potencia en gran medida la estabilidad y la expresión en la superficie celular del receptor sin afectar a la unión del receptor con un ligando cannabinoide.

En otra realización, el vector útil para la expresión de GPCR puede comprender una secuencia de glicosilación para la sobreexpresión en superficie. Dicha secuencia de glicosilación debe insertarse entre el marcador y el primer aminoácido de la secuencia natural de GPCR. En una realización preferida adicional, la secuencia de glicosilación es la secuencia de glicosilación natural seleccionada de un GPCR viral que comprende la secuencia SEQ ID NO: 4. Un ejemplo de un vector útil para expresión constitutiva de GPCR es P-MoMLV-LTR-SP-cmyc-tag-VGS-MCS-polyA (SEQ ID NO: 5) que comprende un promotor que no está silenciado en células hemopoyéticas, un péptido señal

para ayudar a la translocación a través de la membrana, un marcador para la selección de las células con el GPCR en la superficie, una señal de glicosilación para mejorar la expresión en membrana y una secuencia de poliadenilación para estabilizar el ARN mensajero. Si la secuencia del promotor P-MoMLV5'LTR en el vector de secuencia SEQ ID NO: 5 se reemplaza por promotor inducible por tetraciclina, entonces se obtiene un vector adecuado para expresión inducible de GPCR. La presente invención es la primera en demostrar que la adición de una señal de glicosilación en el extremo N terminal de un GPCR, en particular, una señal de glicosilación derivada de un GPCR viral, mejora la expresión del receptor de la superficie celular.

B.3. Reporteros almacenados en gránulos

El reportero más ampliamente usado para secreción de gránulos es la beta-hexosaminidasa endógena, pero esta proteína se ha considerado tradicionalmente un reportero de baja sensibilidad con una baja relación de señal con respecto a fondo. Además, esta glucosidasa no puede acoplarse a una cascada de amplificación de señal como, por ejemplo, proteasas, que pueden acoplarse en cascadas proteolíticas para amplificación de la señal inicial, similar a las cascadas de coagulación sanguínea en las que la señal se amplifica varias veces por una cascada de enzimas con un zimógeno como sustrato, que da como resultado la coagulación sanguínea. Además, como la beta-hexosaminidasa está normalmente presente en gránulos de la mayoría de las células hemopoyéticas con exocitosis regulada profesional, esta proteína no permite el desarrollo de ensayos múltiples. Por lo tanto, está justificada la búsqueda de otros reporteros almacenados en gránulos para el desarrollo de una medida sensible de la desgranulación es razonable.

La clasificación de proteínas solubles entre las rutas constitutiva y regulada es claramente compleja, y hay pruebas sustanciales de especificidad de tipo celular en la ruta de las proteínas solubles a los gránulos de almacenamiento, independientemente del nivel de expresión. Por ejemplo, la amilasa es un constituyente de gránulos normal en células pancreáticas exocrinas, y se transporta a gránulos cuando se transfecta a líneas celulares pancreáticas exocrinas, pero se secreta constitutivamente en líneas celulares endocrinas transfectadas (véase, por ejemplo, El Meskini, R *et al.* *Endocrinology* (2001) Vol. 142, n.º 2 864-873). La especificidad de tipo celular puede explicar algunos de los resultados contradictorios usando partes del amino terminal de la molécula de POMC para estudiar el trayecto en diversas líneas celulares 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 clasificación de la especificidad celular de proteínas se extiende más allá de las líneas celulares a cultivos primarios, ya que las mismas construcciones pueden manipularse de formas muy diferentes en células endocrinas y neuronales primarias. Por lo tanto, para los expertos en la materia, podían usarse otras células diferentes de las células hemopoyéticas con exocitosis regulada en los métodos de la presente invención, pero es necesario realizar la selección de otros tipos celulares en paralelo con un reportero específico almacenado a alta concentración en los gránulos secretores de la línea celular seleccionada y con un nivel bajo de secreción basal.

Una propiedad importante de un reportero almacenado en gránulos de secreción para ser útil en los métodos de la presente invención, especialmente en gránulos de secreción de células de origen hemopoyético, es la resistencia al duro ambiente que este reportero soporta en su mayoría dentro de los gránulos. Los gránulos de secreción de las células hemopoyéticas se relacionan con los lisosomas, orgánulos que almacenan dentro un amplio grupo de hidrolasas tales como catepsinas, triptasas y quimasas a un pH muy ácido, y este ambiente no es ideal para una proteína no almacenada de forma natural en dichos orgánulos, por lo tanto, un reportero lábil por pH o una proteasa probablemente se degradará dentro de los gránulos secretores reduciendo de este modo la sensibilidad de dicha proteína reportera lábil. Por ejemplo, las proteasas son el principal constituyente proteico exocitado de mastocitos activados (véase, por ejemplo, Huang *et al.*, *J Clin Immunol.* 18: 169-183, 1998). Las triptasas, quimasas y carboxipeptidasas son las tres familias principales de proteasas almacenadas en los gránulos secretores de mastocitos. Por lo tanto, son reporteros preferidos de la presente invención polipéptidos con una alta resistencia a proteólisis y bajo pH dentro de los gránulos de las células hemopoyéticas de la presente invención. Aunque la coexistencia de enzimas lisosómicas y serin proteasas hematopoyéticas con varias proteínas antibióticas en los lisosomas secretores indica que es posible el coalmacenamiento sin degradación, no todos los polipéptidos dirigidos artificialmente a gránulos secretores resistirán este ambiente duro. Por ejemplo, Kaur J y Cutler DF (véase Kaur, J y Cutler DF. *J. Biol. Chem.*, (2002) Vol. 277, número 12, 10498-10505) han descubierto que una HRP-Pselectina química puede dirigirse a lisosomas tanto secretores como convencionales, pero hasta el 70 % de la proteína diana se degradó proteolíticamente.

Los gránulos secretores de células hemopoyéticas usados en los métodos de la presente invención comparten propiedades con los lisosomas, que son orgánulos que almacenan en su interior un amplio grupo de hidrolasas tales como catepsinas, triptasas y quimasas en un ambiente de pH muy ácido y por lo tanto, los reporteros útiles para los métodos de la presente invención deben ser polipéptidos resistentes al ambiente dentro de los gránulos de células hemopoyéticas adecuadas.

En la presente invención el reportero es la granzima B.

Los gránulos de las células hemopoyéticas también almacenan catepsinas que pertenecen a la familia papaína de cisteín proteasas. Las catepsinas son una clase de proteasas globulares, inicialmente descritas como péptido

hidrolasas intracelulares, aunque varias catepsinas también tienen funciones extracelulares. Las catepsinas B, C, F, H, L, K, O, S, V, W y X son cisteín proteasas de la familia papaína, y representan la mayor y mejor conocida clase de las catepsinas. Actúan principalmente como proteasas intracelulares que median en la mayoría de la no específica terminal en el ambiente ácido de los lisosomas (véase, por ejemplo, Turk V, Turk B y Turk D. EMBO J 2001; 20: 4629-33). Las catepsinas A y G son ambas serin proteasas, pero la catepsina G es una endopeptidasa mientras que la catepsina A es una carboxipeptidasa. Las catepsinas D y E son proteasas aspárticas. Las catepsinas se sintetizan como proenzimas inactivas y se procesan para convertirse en enzimas maduras y activas. Debido a la función de cisteín catepsinas como proteasas intracelulares en el ambiente ácido de los lisosomas, su pH óptimo es de aproximadamente 5 a 5,5 y al pH fisiológico necesario para la viabilidad y exocitosis del cultivo celular en los métodos de la presente invención, su eficacia catalítica no es la óptima. Por esta razón, las serin proteasas son en general reporteros preferidos para el almacenamiento en los gránulos en los métodos de la presente invención en comparación con cisteína catepsinas. También se sabe en el estado de la técnica que otras proteasas de degradación, incluyendo metaloproteasas, se almacenan en los gránulos y se liberan de células hemopoyéticas tales como neutrófilos, por ejemplo, MMP-8 (colagenasa de neutrófilos) y MMP-9 (gelatinasa de 92 kDa) (véase, por ejemplo, Owen CA y Campbell EJ. J. Leukoc. Biol. (1999) 65, 137-150). No obstante, las serin proteasas de células hemopoyéticas tienen la mayor contribución a la actividad proteolítica liberada de las células preferidas en los métodos de la presente invención, y, por lo tanto, se prefieren serin proteasas frente a metaloproteasas y cisteína catepsinas. Esta mayor contribución a la actividad proteolítica es el resultado tanto de la mayor concentración de serin proteasas en los gránulos como de la mayor actividad catalítica de serin proteasas a pH neutro frente a otras proteasas que también se almacenan en gránulos.

En una realización de la presente invención, podría transfectarse ADN que codifica reporteros para producir una proteína de zimógeno o para producir una enzima activa. Los reporteros de gránulos sintetizados como zimógenos se dirigen a los gránulos secretores en los que se activan mientras que las enzimas activas se dirigen a los gránulos secretores y no necesitan activación. Por ejemplo, las granzimas son zimógenos que se activan por catepsina C dentro de los gránulos por escisión en el dipéptido de activación N terminal para producir una enzima activa. Incluso aunque la granzima B activa constitutiva se dirige correctamente y se almacena dentro de los gránulos, y por lo tanto es útil para los métodos de la presente invención, dicha granzima B activa constitutiva tiene una mayor actividad basal que la granzima B sintetizada como un zimógeno, reduciendo de este modo la señal de fondo del sensor. Otros investigadores han demostrado (véase Isaaz *et al.* Eur J Immunol 1995; 25(4): 1071-9) que en clones de linfocitos T citotóxicos CD8+ (CTL) durante la síntesis activa, una cantidad importante de granzimas se secreta de forma constitutiva y hasta un tercio de las granzimas A y B pueden secretarse directamente del CTL mediante la ruta secretora constitutiva, como se muestra por la actividad enzimática de granzima A e inmunotransferencias de granzima B secretada, en las que un tercio de la proteína no consigue adquirir la señal de dirección a gránulos. La secreción constitutiva de las proteínas líticas puede bloquearse tanto por CHX como por brefeldina A (BFA). Aunque la BFA no afecta a la destrucción direccional de dianas reconocidas, anula la destrucción de espectador, lo que indica que la destrucción de espectador surge de proteínas líticas de nueva síntesis, suministradas mediante una vía distinta de gránulos. Por lo tanto, el uso de un zimógeno que es necesario activar dentro del gránulo en lugar de un reportero activo constitutivo, reduce la actividad basal y se produce una línea celular con una mayor relación de señal con respecto al fondo para un sensor más robusto útil para los métodos de la presente invención.

En otra realización de la presente invención, los reporteros útiles para los métodos de la presente invención pueden ser secuencias de origen natural o reporteros con codones optimizados para la alta expresión en líneas celulares útiles. Por ejemplo, la secuencia con codones optimizados de granzima B de caballo se muestra como SEQ ID NO: 9.

B.4. Promotores para expresión del reportero

La presente invención también comprende promotores adecuados para expresión de reporteros. Los promotores útiles para expresión de reporteros almacenados en los gránulos de la presente invención son promotores adecuados para la expresión de proteínas en células hemopoyéticas, en particular promotores adecuados para expresión media a alta de proteínas. Un promotor con expresión media de proteína produce más de 10 ng de granzima B almacenada en gránulos por millón de células RBL-2H3 mientras que un promotor fuerte produce más de 100 ng de granzima B almacenada en gránulos por millón de células RBL-2H3 cuando se cuantifica por un ELISA específico (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas). Otra propiedad relevante de los promotores adecuados, es que la expresión de proteínas debe ser estable durante el cultivo. Ciertos promotores heterólogos se regulan negativamente durante el cultivo especialmente en células hemopoyéticas y este proceso se denomina "silenciamiento del promotor". Los promotores preferidos para los métodos de la presente invención son por lo tanto promotores no silenciados.

En una realización de la presente invención los promotores para expresión del reportero se seleccionan de un grupo que comprende: un promotor quimérico de hCMV y promotor de MoMLV-5'-LTR de SEQ ID NO:10; promotor MoMLV-5'-LTR (SEQ ID NO: 3); promotor del factor de elongación 1-alfa (SEQ ID NO:1); promotor de VSR (SEQ ID NO:2) y promotor de timidina quinasa (SEQ ID NO:7). Otros promotores tales como el promotor de citomegalovirus humano, uno de los promotores más fuertes ampliamente usados para transfección de células eucariotas, también es adecuado, pero en las células hemopoyéticas de la presente invención produce al menos 125 veces menos

granzima B que un vector con granzima B bajo el control de un hCMV-5'LTR quimérico de MoMLV, reduciendo de este modo la sensibilidad del sensor. Por lo tanto, un vector que usa granzima B como reportero es útil para la evaluación del promotor para seleccionar promotores adecuados para la expresión del reportero para los métodos de la presente invención. En general, son promotores preferidos para expresión del promotor en los métodos de la presente invención promotores tales a partir de los cuales se produce más reportero, es decir se prefieren promotores más fuertes en lugar de promotores más débiles.

En otra realización de la presente invención, son promotores preferidos los que no se silencian por células durante el subcultivo. El silenciamiento del promotor limita la utilidad de un promotor y los inventores han descubierto que el promotor de CMV humano (hCMV) se silencia parcialmente en al menos una de las líneas celulares preferidas de la presente invención, es decir, en RBL-2H3. No obstante un promotor quimérico compuesto también de hCMV fusionado con 5'-LTR de MoMLV no se silencia en más de 6 meses de cultivo continuo. El silenciamiento del promotor debe determinarse experimentalmente y para los expertos en la materia un vector en el que por ejemplo se expresa la granzima B humana bajo el control de un promotor para ensayarse y que tiene una resistencia a antibióticos para selección estable en líneas celulares de mamífero, es útil para clonar un promotor nuevo y para seleccionar líneas celulares estables que pueden cultivarse durante varios meses para seleccionar promotores fuertes que no se silencian y por lo tanto son útiles para los métodos de la presente invención.

En una realización de la presente invención los promotores para la expresión de las proteasas reporteras almacenadas en los gránulos son promotores inducibles. En una realización adicional los promotores inducibles para expresión de proteasas reporteras almacenadas en gránulos pueden seleccionarse de un grupo que comprende el promotor inducible por tetraciclina, el promotor inducible por ecidisona, el promotor inducible por cumato y el promotor inducible por progesterona.

B.5. Tecnologías y sustratos de detección.

Además de la resistencia al ambiente dentro de los gránulos secretores, alto nivel de expresión, baja secreción basal y alta secreción inducida de un reportero, para ser útil en los métodos de la presente invención, otras propiedades importantes de los reporteros para exocitosis regulada de los métodos de detección sensibles de la presente invención, son el tipo de tecnología de detección usado para medir el reportero secretado y la eficacia catalítica de dicho reportero para el sustrato específico usado para detección. Tanto las tecnologías de detección de alta sensibilidad como un reportero con una alta eficacia catalítica para un sustrato específico son beneficiosos para los métodos de la presente invención.

Son reporteros útiles para los métodos de la presente invención enzimas con actividad proteolítica y, por lo tanto, las tecnologías de detección de actividad proteolítica son de gran importancia para la presente invención. En una realización de la presente invención, el método usado para medir la actividad enzimática de los reporteros almacenados en los gránulos secretados, se selecciona de un método colorimétrico, uno fluorescente, uno FRET, uno FRET resuelto en el tiempo o uno luminiscente.

Dichos métodos se conocen bien en el estado de la técnica. Por ejemplo, la actividad de granzima B humana podría detectarse mediante el uso de un péptido IEPD acoplado en el extremo C terminal con p-nitroanilida (pNA) por detección colorimétrica a 405 nm, el mismo péptido acoplado en el extremo C terminal con 7-amido-4-metil-cumarina podría detectarse por fluorescencia con excitación a 380 nm y longitudes de onda de emisión de 460 nm y el mismo péptido acoplado en el extremo C terminal con 7-amido-trifluorometilcumarina podría detectarse por fluorescencia con excitación a 400 nm y emisión a 505 nm.

Son especialmente relevantes para los métodos de la presente invención sustratos de proteasa fluorescentes o luminiscentes altamente sensibles, por ejemplo, sustratos de proteasa basados en FRET, sustratos de proteasa basados en luminiscencia y sustratos fluorescentes basados en rodamina 110.

En otra realización de la presente invención, el método usado para medir la actividad enzimática de granzima B se selecciona de una transferencia de energía de resonancia de Förster (FRET) o un método de FRET resuelto en el tiempo. La transferencia de energía de resonancia de Förster o FRET es una técnica que detecta la proximidad entre dos fluoróforos que pueden actuar como un par de FRET. Por ejemplo, si el espectro de emisión de fluorescencia de un fluoróforo denominado el "donador" solapa con el espectro de excitación del otro fluoróforo denominado el "aceptor", entonces las dos moléculas pueden actuar como un par de FRET. Cuando estén en proximidad entre sí, típicamente a una distancia de 100 Angstrom o menos, la excitación del fluoróforo donador conduce a transferencia de energía no radiante al fluoróforo aceptor, dando como resultado un aumento en la emisión de fluorescencia del aceptor, y una reducción en la emisión de fluorescencia del donador. Cuando los compañeros de FRET se separan, FRET se elimina. El par de fluoróforo-interruptor EDANS/DABCYL es uno de los más habitualmente usados para aplicaciones de FRET, debido a un excelente solapamiento espectral entre el espectro de emisión de EDANS (longitud de onda de excitación 341 nm, longitud de onda de emisión 471 nm) y espectro de absorbancia DABCYL (longitud de onda de absorbancia máxima 453 nm). La interrupción de la fluorescencia de EDANS por DABCYL es en consecuencia altamente eficaz, con potenciaciones hasta 40 veces de la fluorescencia que se ha observado tras la proteólisis de péptidos marcados con DABCYUEDANS. Por ejemplo, un péptido con la secuencia SGIEPDSGV

podría marcarse con EDANS como un fluoróforo “donador” en el extremo N terminal y DABCYL en el extremo C terminal como un “aceptor” o interruptor. Cuando este sustrato peptídico intacto se usa para medición de la actividad enzimática, la fluorescencia de EDANS se detiene por DABCYL. Tras la escisión del péptido de FRET, por ejemplo, por granzima B humana, la fluorescencia de EDANS se recupera, y puede supervisarse continuamente a excitación/emisión = 340 nm/470 nm. El aumento de la fluorescencia de EDANS se correlaciona con actividad de granzima B. El par de FRET 5'-FAM/TAMRA también se usa ampliamente para marcar sustratos de proteasa, es más sensible que péptidos basados en DABCYUEDANS y los sustratos de FRET basados en 5-FAM/TAMRA tienen menos interferencia por autofluorescencia de compuestos de ensayo debido a su longitud de onda de emisión más larga. También hay muchos pares de FRET que podrían ser útiles para los métodos de la presente invención. Por ejemplo, Biosearch Technologies ha desarrollado interruptores altamente eficaces comercializados bajo el nombre comercial BHQ™ o interruptores Blackhole, mientras que Anaspec ha desarrollado interruptores QXL™ y Perkin Elmer interruptores QSY®. Para que un par de interruptor-fluoróforo sea eficaz el espectro de fluorescencia de emisión del fluoróforo debe solapar con el espectro de absorbancia del interruptor. Otra propiedad relevante del par de FRET para que sea útil para los métodos de la presente invención es las longitudes de onda de excitación y emisión para detección. Los pares de FRET con una longitud de onda larga para excitación y emisión son menos propensos a interferencia de componentes celulares y de compuestos usados en el descubrimiento de fármacos y se prefieren por lo tanto para los métodos de la presente invención. Dichos colorantes denominados NIR útiles para ensayos de proteasa basados en FRET se conocen bien en el estado de la técnica (véase, por ejemplo, Pham W *et al.* *Bioconj. Chem.* (2004); 15 1403-1407) y la presente invención aprovecha nuevas tecnologías desarrolladas para detección sensible y específica de actividades de proteasa incluyendo nuevos colorantes NIR (véase por ejemplo Peng X *et al.* *A nonfluorescent, broad-range quencher dye for Förster resonance energy transfer assays.* *Analytical Biochemistry* Epub 25 Feb, (2009)) con una mejor relación de fluorescencia de señal con respecto a fondo tras la escisión por la proteasa específica. Por ejemplo, un sustrato adecuado para detección de granzima B usando FRET es 5'-FAM-Ser-Ile-Glu-Pro-Asp-Ser-Gly-Ser-TAMRA.

FRET resuelto en el tiempo o TR-FRET es una variante de FRET en la que se usan quelados de lantánidos tales como los de terbio como especie donadora. Debido a que los quelados de terbio tienen tiempos de vida fluorescentes que son muchos órdenes de magnitud más largos que los fluoróforos orgánicos convencionales, TR-FRET puede medirse después de que dicha interferencia se ha degradado completamente. Esto, acoplado con la lectura radiométrica de intensidad del aceptor frente a intensidad del donador proporciona una lectura útil para ensayos de HTS.

En una realización de la presente invención, la escisión peptídica por proteasa secretada en gránulos se detecta con fluorometría resuelta en el tiempo. Por ejemplo, un péptido podría acoplarse con un quelado de lantánido fluorescente en un extremo y con un interruptor del quelado de lantánido en el otro extremo. Tras la escisión por la proteasa el quelado de lantánido y el interruptor se separarán a medida que se escinde el sustrato. Una propiedad relevante de la tecnología de FRET resuelta en el tiempo para los métodos de la presente invención, es que la emisión de fluorescencia podría retardarse desde la excitación y, por lo tanto, se evita la autofluorescencia de compuestos usados en el proceso de descubrimiento de fármacos. Por ejemplo, un sustrato útil para la detección de granzima B secretada es Lantano-IEPDG-interruptor en el Lantano es un quelado de un lantánido, por ejemplo, un quelado de europio e interruptor es un interruptor adecuado de la fluorescencia de lantánido, por ejemplo, QSY® 7.

En una realización preferida, el método usado para la detección sensible de la proteasa secretada se selecciona de pares de FRET altamente eficaces con interferencia mínima, tanto celular como del compuesto usado en el descubrimiento de fármacos, tal como, por ejemplo, el par de FRET 5'-FAM y TAMRA, los pares de FRET de infrarrojo cercano y los métodos de FRET resueltos en el tiempo basados en quelatos de lantánido.

En otra realización más de la presente invención, se miden las proteasas secretadas por los gránulos con sustratos de luciferina modificados con péptidos (véase, por ejemplo, Geiger R y Miska W, documento USPTO 5035999) en un tampón adecuado que contiene tanto ATP como luciferasa. Por ejemplo, un péptido adecuado para la determinación de la granzima B secretada es Ile-Glu-Pro-Asp-amidoluciferina (IEPD-aminoluciferina), en el que el ácido carboxílico del ácido aspártico se conjuga con la 6-aminoluciferina para producir una amida de luciferina que no se escinde por la luciferasa a no ser que se escinda primero IEPD-aminoluciferina por la granzima B humana secretada. Usando este sustrato de la granzima B, la exocitosis de los gránulos almacenados se acopla con luminiscencia y por lo tanto la autofluorescencia tanto de las células como de los compuestos usados para el descubrimiento de fármacos no produce interferencia con la lectura del ensayo.

Los sustratos de proteasa basados en rodamina 110 son derivados de bisamida del fluoróforo en los que están ligados covalentemente péptidos con cada uno de los grupos amino de rodamina 110 (R110) (véase, por ejemplo, W *et al* documento USPTO 4557862), suprimiendo de este modo tanto la absorción visible como la fluorescencia del colorante. Tras la escisión enzimática, el sustrato de bisamida no fluorescente se convierte mediante un proceso de dos etapas, primero en la monoamida fluorescente y después en la R110 aún más fluorescente. El producto de escisión R110 tiene propiedades espectrales similares a las de fluoresceína y un coeficiente de extinción grande, proporcionando de este modo facilidad de uso en preparaciones de filtro de fluoresceína convencionales y excelentes relaciones de la señal con respecto al fondo. En una realización de la presente invención, los sustratos de proteasa para la detección proteolítica son péptidos modificados de rodamina 110.

En otra realización, los sustratos preferidos útiles para detección del reportero son sustratos impermeables celulares adecuados para detección del reportero en una mezcla que contiene células.

En otra realización de la presente invención, la detección preferida de proteasas secretadas comprende una cascada enzimática para la amplificación de la señal. Se conocen bien en el estado de la técnica cascadas de proteasa que permiten la amplificación de la señal (véase, por ejemplo, Harris, C. documento USPTO 4.463.090). El mejor ejemplo de una cascada de amplificación de proteasa es la cascada de coagulación sanguínea en la que la primera proteasa activa un zimógeno para producir una proteasa activa y esta segunda proteasa también activa un zimógeno para producir una segunda proteasa activa, creando de este modo una cascada en la que la señal inicial se amplifica hasta 1000 veces. Son necesarios zimógenos con actividad basal muy baja para la amplificación de señal con una alta relación de la señal con respecto al fondo. Por ejemplo, el zimógeno de la caspasa 8 nativa posee el 1 % de la actividad de la enzima completamente procesada, una actividad muy sustancial en comparación con la mayoría de los zimógenos de proteasa (véase Muzio M. *et al* J. Biol. Chem. (1998) 273: 2926-2930) y por lo tanto, la caspasa-8 nativa tiene un alto fondo para la detección sensible de los reporteros secretados como la granzima B. En su lugar, la procaspasa-3 humana puede escindirse eficazmente y activarse por la granzima B humana, de rata, de caballo o de chimpancé para producir una caspasa-3 madura aproximadamente 10.000 veces más activa que el zimógeno no escindido y, por lo tanto, altamente útil para la detección de las proteasas secretadas por los gránulos. Un índice de zimogenidad alto es una propiedad particularmente preferida para las proteasas útiles para la detección de los reporteros secretados en los métodos de la presente invención. Además de un índice alto de zimogenidad, se seleccionan zimógenos preferidos para los métodos de la presente invención entre enzimas con una alta eficacia catalítica después de activación y una baja actividad basal de enzima. Es necesario seleccionar zimógenos con esas propiedades para una detección sensible de la exocitosis de los gránulos en la presente invención.

La actividad basal de un zimógeno se relaciona con el índice de zimogenidad, pero aquí hay algunas diferencias relevantes para los métodos de la presente invención. En primer lugar, dos enzimas con el mismo índice de zimogenidad podrían tener una actividad basal diferente pero la enzima con una mayor actividad basal también es la enzima con mayor eficacia catalítica. Se prefieren para los métodos de la presente invención enzimas con el mayor índice de zimogenidad posible y con la menor actividad enzimática basal posible. En segundo lugar, la actividad basal no se relaciona solamente con zimogenidad, sino que ciertas enzimas como la procaspasa-3 podrían autoactivarse fácilmente cuando están presentes a alta concentración. Por ejemplo, el índice de zimogenidad de la procaspasa-3 es aproximadamente 10.000 y por lo tanto muy alto, pero si la enzima se almacena a una alta concentración, las enzimas se autoactivan y la actividad basal podría ser muy alta. En tercer lugar, la actividad basal relevante para los métodos de la presente invención es la presente en el sobrenadante del cultivo celular de las células en ausencia de un modulador de la exocitosis regulada y no solamente la producida por el reportero almacenado en gránulos transfectados. Por ejemplo, la granzima A es una serin proteasa que pertenece a la familia triptasa de proteasas. Dicha familia triptasa se caracteriza por una secuencia de escisión después de los aminoácidos arginina o lisina. Aunque la granzima A humana tiene una secuencia de escisión óptima que comprende IGDR o VANR en P4-P3-P2-P1 (véase, por ejemplo, Mahrus S y Craik CS. Chemistry & Biology (2005), 12, 567-577) y por lo tanto potencialmente útil para los métodos de la presente invención, la actividad de triptasas ya presentes en un sobrenadante de cultivo celular no estimulado de células RBL-2H3 no transfectadas es tan alta que no hay diferencia entre células RBL-2H3 transfectadas de forma estable con la granzima A humana estimulada con un modulador de secreción como ionomicina, y las células no transfectadas, bien estimuladas o no, con ionomicina. Pero si se retira un sobrenadante del cultivo celular y las células se lavan con un tampón sin suero, por ejemplo, un HBSS modificado, entonces la actividad triptasa basal se reduce a niveles en los que la granzima A humana se convierte en un reportero útil para los métodos de la presente invención.

Verheijen *et al* han desarrollado una cascada de amplificación artificial útil para la cuantificación de proteasa (véase Verheijen JH *et al*. Biochem. J. (1997) 323, 603-609 y Verheijen JH, documento USPTO, 8.115.252) en la que la pro-uroquinasa se modifica para contener un sitio de reconocimiento que puede escindirse por la proteasa para cuantificarse. Otros han usado diferentes proteasas modificadas en el sitio de escisión como la procaspasa-3 como una medida de la actividad proteasa. Por ejemplo, (véase Li Y *et al*. Molecular Biotechnology, (2001) Vol. 18, n.º 1, 1-10) han desarrollado una procaspasa-3 modificada que contiene un sitio de escisión de beta-secretasa que induce apoptosis en células 293T, un efecto bien conocido de la caspasa-3 activa, y han demostrado que la apoptosis inducida por la caspasa-3 modificada se correlaciona con la susceptibilidad de la secuencia de reconocimiento de beta-secretasa a la beta-secretasa, e incluso que los competidores de la proteasa evitan la muerte celular inducida por la caspasa-3 modificada. En otro ejemplo, Vocero-Akbani AM *et al* (véase Vocero-Akbani AM *et al* Nat Med. (1999), Vol 5, n.º 1: 29-33) han desarrollado una procaspasa-3 que sustituye con sitios de escisión proteolíticos del Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH), sitios endógenos. Una vez dentro de las células, esta procaspasa-3 obtenida por ingeniería genética permanece inactiva en las células no infectadas, pero en células infectadas por VIH, esta procaspasa-3 se procesa en una forma activa por la proteasa de VIH, dando como resultado apoptosis de la célula infectada. Todos los ejemplos anteriores de cascadas de proteasa son relevantes para los métodos de la presente invención, aunque el zimógeno preferido para los métodos de la presente invención se basa en una cascada de amplificación natural basada en la procaspasa-3 nativa. Varias caspasas como la caspasa-3 y la caspasa-8 son los sustratos naturales de la granzima B y los inventores han usado esta propiedad de la caspasa-3 para desarrollar un método rápido y sensible para la cuantificación de la granzima B secretada.

En una realización específica de la presente invención, el zimógeno preferido usado para la granzima B humana, de rata, de chimpancé o de caballo es procaspasa-3 humana no modificada que comprende aminoácidos desde la serina en la posición 29 hasta la histidina en la posición 277 de acuerdo con Genbank NM_032991.

En otra realización, la procaspasa-3 humana útil para detección de la granzima B humana secretada, la granzima B de rata, la granzima B de chimpancé o la granzima B de caballo es una variante mutada con la treonina en la posición 174 mutada a prolina para una escisión más eficaz por la granzima B humana, de rata, de chimpancé o de caballo. En una realización adicional más, la procaspasa-3 humana se modifica adicionalmente para reducir la autoactivación cambiando, al menos, la serina en la posición 176 a valina o leucina. En una realización, la procaspasa-3 humana con escisión mejorada por granzima B humana tiene prolina en la posición 174 en lugar de treonina y la serina en 176 mutada a valina, glicina en 177 mutada a leucina, valina en 178 mutada a metionina y ácido aspártico en 179 mutado a ácido glutámico. Dicha procaspasa-3 con la secuencia IEP-DVLME que comprende los aminoácidos P4-P3-P2-P1-P1'-P2'-P3'-P4' es óptima para escisión con granzima B humana y tiene autoactivación muy baja en ausencia de granzima B, pero actividad completa cuando se escinde por granzima B humana. Dicha procaspasa-3 humana mutada con autoactivación altamente reducida se enumera como SEQ ID NO: 11.

Se sabe que la especificidad tetrapeptídica de la granzima B de ratón difiere significativamente de granzima B humana. Las granzima B humana y de ratón escinden la procaspasa-3 específica de especie más eficazmente que la procaspasa-3 heteróloga para cada granzima B. La escisión de la procaspasa-3 humana por la granzima B de ratón en la secuencia P4-P3-P2-P1 que comprende IETD (Isoleucina-ácido glutámico-treonina-ácido aspártico en la posición 175) es aproximadamente 6 veces menos eficaz que la escisión por la proteasa humana incluso aunque ambas caspasas tienen una secuencia de escisión IETD idéntica, por lo tanto, se prefiere el uso de una procaspasa-3 específica de especie para la detección de la granzima B secretada en los métodos de la presente invención.

En una realización de la presente invención, el método usado para medir la actividad enzimática de zimógenos activados útiles se selecciona de un método colorimétrico, fluorescente, FRET, FRET resuelto en el tiempo o luminiscente.

Son ejemplos de sustratos útiles para la detección de la caspasa 3 activa: 5'-FAM-Ser-Asp-Glu-Val-Asp-Ser-Gly-Ser-TAMRA, un sustrato de FRET; Lantano-CDEVK-Interruptor en el que Lantano es un quelado de un lantánido, por ejemplo, un quelado de europio e Interruptor es un interruptor adecuado de la fluorescencia de lantánido, por ejemplo, QSY[®]7 para fluorometría resuelta en el tiempo; DEVD-AMC y DEVD-AFC para fluorescencia y DEVD-aminoluciferina para detección de luminiscencia.

En otra realización preferida, el sustrato del zimógeno activado como caspasa-3 es un sustrato impermeable celular, para reducir el fondo debido a la hidrólisis del sustrato intracelular. En otra realización, el sustrato impermeable celular preferido de caspasa-3 activa es un péptido de secuencia DEVD acoplado por el extremo C terminal a 7-amido-4-metilcoumarina o a rodamina110 o a aminoluciferina o acoplado a un extremo con un fluoróforo para FRET o FRET resuelto en el tiempo y en el otro extremo con un interruptor adecuado de la fluorescencia del fluoróforo específico.

En otra realización de la presente invención, la actividad de las proteasas secretadas podría detectarse por un zimógeno activado por dicha proteasa secretada en la que el zimógeno es una enzima permutada circularmente desprovista de actividad enzimática a no ser que se active por la proteasa específica. La permutación circular es un proceso en el que los extremos amino y carboxilo terminales de una enzima se unen y se crean nuevos extremos amino y carboxilo terminales en cualquier parte de la molécula. Son enzimas permutadas circularmente útiles para los métodos de la presente invención enzimas que se convierten en zimógenos con baja actividad basal por permutación circular y la actividad se restaura por escisión de la proteasa. Se conocen bien en el estado de la técnica zimógenos permutados circularmente. Plankum P *et al* (véase Plankum P *et al* Nat Struct Biol. Feb 2003; 10(2): 115-9) fueron los primeros en demostrar que uniendo los extremos N y C terminales de la ribonucleasa A, el sitio activo está bloqueado con la secuencia de aminoácidos reconocida por plasmepsina II, una proteasa altamente específica de *Plasmodium falciparum*. Generaron nuevos extremos N y C terminales por permutación circular y en presencia de plasmepsina II, un zimógeno de la ribonucleasa aumentó su actividad catalítica aproximadamente 1000 veces y mantuvo alta estabilidad conformacional. Otros investigadores han aplicado la permutación circular de extremos N y C terminales para crear nuevos zimógenos que podrían activarse por proteasa (véase, por ejemplo, Johnson RJ *et al* FEBS Journal Volumen 273, número 23, pp. 5457-5465, 2006 y Jucovic M *et al* Protein Engineering Design and Selection 2008 21(10): 631-638).

En otra realización de la presente invención, los zimógenos adecuados útiles para la cuantificación de las proteasas secretadas se seleccionan de enzimas con actividad baja basal para una relación de señal con respecto al fondo alta y por lo tanto un ensayo más robusto, y enzimas con una alta eficacia catalítica después de la activación por la proteasa secretada. Por ejemplo, una pro-enteroquinasa modificada tiene una actividad basal muy alta, es decir un bajo índice de zimogenicidad que evita su uso para detección sensible de la granzima B humana.

En otra realización de la presente invención, se seleccionan los zimógenos preferidos para cuantificación de las

proteasas secretadas de enzimas cuyo tampón de reacción puede hacerse compatible con los medios usados para la exocitosis.

Para una detección del reportero sensible basada en cualquiera de las tecnologías de detección, se necesita un sustrato de la proteasa específico que se escinda con eficacia muy alta. Los restos de aminoácidos alrededor de la secuencia de escisión son los principales determinantes de la eficacia catalítica de la proteasa reportera para cualquier sustrato particular.

En una realización, se seleccionan los reporteros almacenados en los gránulos útiles con actividad de tipo tripsina de un grupo que comprende granzima A y granzima K. En otra realización, el reportero almacenado en los gránulos útil con actividad de tipo Asp-asa es una granzima B. En otra realización, se seleccionan los reporteros almacenados en gránulos útiles con actividad tipo quimasa de un grupo que comprende granzima H, quimasa y cathepsina G. En otra realización adicional, se seleccionan los reporteros almacenados en gránulos útiles con actividad de tipo elastasa de un grupo que comprende granzima M, elastasa de neutrófilos y proteinasa 3.

En una realización, se seleccionan los reporteros almacenados en gránulos útiles de un grupo de especies que comprenden serina endopeptidasas humanas, de ratón, de rata, de caballo, de vaca, de *Monodelphis*, de oveja y de cabra.

En una realización específica de la presente invención, el reportero heterólogo se selecciona de un grupo de serin proteasas que comprende granzima B de especie humana, de rata, de chimpancé y de caballo debido a que la proteasa granzima B es la única serin proteasa conocida con un requisito absoluto de escisión después del ácido aspártico.

En una realización de la presente invención, el sustrato preferido para la granzima B de especie humana, de rata, de chimpancé y de caballo usada como un reportero del sensor, comprende en P4 un aminoácido seleccionado de isoleucina o valina; en P3 un aminoácido seleccionado de ácido glutámico, metionina, alanina, glicina, histidina, serina, glutamina, ácido aspártico, treonina, triptófano, tirosina o valina; en P2 un aminoácido seleccionado de prolina, treonina, glutamina, ácido aspártico, alanina, fenilalanina, serina, triptófano, tirosina, valina, ácido glutámico, glicina o histidina; y en P1 ácido aspártico.

En otra realización de la presente invención, los sustratos extendidos preferidos para las granzimas B de especie humana, de rata, de chimpancé o de caballo comprenden en P1' un aminoácido sin carga seleccionado de valina, serina, tirosina y fenilalanina y en P2' un aminoácido seleccionado de serina, alanina, glicina, tirosina, leucina o ácido glutámico.

En otra realización preferida de los métodos de la presente invención, el sustrato preferido adicional de la granzima B de especie humana, de rata, de chimpancé o de caballo comprende la secuencia isoleucina en P4, ácido glutámico en P3, prolina o treonina en P2 y ácido aspártico en P1. El sustrato preferido adicional comprende también serina en P1' y glicina o leucina en P2'.

En una realización de la presente invención, el sustrato para granzima A de especie humana, de rata y de ratón usada como un reportero del sensor comprende en P4 un aminoácido seleccionado de isoleucina, valina, o glicina; en P3 un aminoácido seleccionado de alanina, glicina, serina, fenilalanina o tirosina; en P2 un aminoácido seleccionado de asparagina o fenilalanina y en P1 arginina o lisina.

En otra realización de la presente invención sustratos extendidos preferidos adicionales para la granzima A humana, de rata o de ratón comprenden en P1 aminoácidos hidrófobos lineales largos tales como la cadena lateral alifática de lisina y metionina, o aminoácidos hidrófobos no ramificados como alanina o restos polares como serina; y en P2' un aminoácido seleccionado de valina, leucina, isoleucina, fenilalanina y tirosina.

En otra realización preferida de los métodos de la presente invención, un sustrato preferido adicional de la granzima A humana comprende valina o isoleucina en P4, alanina, glicina o serina en P3, asparagina o ácido aspártico en P2 y arginina en P1. El sustrato preferido adicional comprende también serina o metionina en P1' y valina, leucina o fenilalanina en P2'. En otra realización preferida de los métodos de la presente invención el sustrato preferido adicional de la granzima A de ratón comprende glicina o valina en P4, tirosina o fenilalanina en P3, fenilalanina o asparagina en P2 y arginina en P1. El sustrato preferido adicional para la granzima A de ratón comprende también serina o metionina en P1' y valina, leucina o fenilalanina en P2'.

En una realización de la presente invención el sustrato para quimasa humana usada como un reportero del sensor comprende en P4 un aminoácido seleccionado de glicina, isoleucina, valina, arginina, prolina, glutamina o leucina; en P3 un aminoácido seleccionado de alanina, valina, leucina, histidina, serina, treonina o ácido glutámico; en P2 un aminoácido seleccionado de asparagina, serina, ácido aspártico, treonina, prolina, leucina, alanina o valina y en P1 tirosina o fenilalanina.

En otra realización de la presente invención, los sustratos extendidos preferidos adicionales para la quimasa

humana comprenden en P1' serina o glicina; en P2' un aminoácido seleccionado de ácido aspártico, alanina, ácido glutámico o glicina y en P3' un aminoácido seleccionado de valina, leucina, alanina o glicina.

5 En otra realización preferida de los métodos de la presente invención, el sustrato preferido adicional de la quimasa humana comprende histidina, ácido glutámico o treonina en P3; prolina o treonina en P2; y fenilalanina o tirosina en P1. El sustrato preferido adicional comprende también serina en P1' y ácido aspártico, ácido glutámico o alanina en P2'.

10 En una realización de la presente invención, el sustrato para la proteinasa 3 de especie humana, de rata y de ratón usado como un reportero del sensor comprende en P4 un aminoácido con un resto alifático pequeño como valina y alanina; en P3 un aminoácido con un resto alifático pequeño como alanina y valina; en P2 un aminoácido con carga seleccionado de ácido aspártico, ácido glutámico, arginina y lisina y en P1 un aminoácido seleccionado de cisteína, norvalina, valina, alanina y metionina.

15 En otra realización preferida de la presente invención, los sustratos extendidos preferidos adicionales para la proteinasa 3 humana, de rata o de ratón comprenden en P1' un aminoácido con carga positiva seleccionado de arginina y lisina o un aminoácido con un resto alifático pequeño como alanina o valina; y en P2' un aminoácido seleccionado de ácido aspártico, ácido glutámico o glutamina.

20 En otra realización preferida de los métodos de la presente invención, el sustrato preferido adicional de la proteinasa 3 humana comprende valina o alanina en P4; valina o alanina en P3; ácido aspártico en P2 y cisteína, valina o norvalina en P1. El sustrato preferido adicional comprende también alanina o lisina en P1', ácido aspártico en P2' y arginina en P3'.

25 En una realización de la presente invención, el sustrato para la elastasa de neutrófilos de especie humana, de rata y de ratón usado como un reportero del sensor comprende en P4 prolina o un aminoácido con un resto alifático pequeño como valina y alanina; en P3 un aminoácido con un resto alifático pequeño como alanina y valina o un aminoácido con carga negativa seleccionado de ácido aspártico y ácido glutámico; en P2 un aminoácido con un resto alifático pequeño como alanina y valina o un aminoácido con carga negativa seleccionado de ácido aspártico y ácido glutámico y en P1 un aminoácido hidrófobo o uno polar seleccionado de isoleucina, norvalina, valina, alanina y metionina.

30 En otra realización de la presente invención, los sustratos extendidos preferidos adicionales para la elastasa de neutrófilos humana, de rata o de ratón comprenden en P1' un aminoácido hidrófobo o uno polar o uno con carga negativa y en P2' un aminoácido hidrófobo o uno con carga negativa.

35 En otra realización preferida de los métodos de la presente invención, el sustrato preferido adicional de la elastasa de neutrófilos humana comprende prolina o valina o alanina en P4; ácido glutámico o valina o alanina en P3; ácido glutámico en P2 e isoleucina, valina o norvalina en P1. El sustrato preferido adicional comprende también metionina en P1', arginina o ácido aspártico en P2 y arginina en P3'.

40 Una característica relevante de los sensores de la presente invención, es que pueden combinarse sensores basados en células diferentes en el mismo recipiente de reacción para producir un ensayo múltiple en cada recipiente de reacción. Para combinar el mismo recipiente de reacción cada sensor basado en células, debe producir una combinación única de un modulador de exocitosis específico y un reportero específico almacenado en los gránulos. Además, cuando se libera dicho reportero almacenado en los gránulos debe detectarse con un sustrato específico con interferencia mínima o preferentemente ninguna con otros sustratos u otros reporteros liberados.

45 En una realización de la presente invención, al menos dos sensores basados en células, que producen cada uno una combinación específica única de un modulador de exocitosis con un reportero almacenado en gránulos, pueden mezclarse en el mismo recipiente de reacción para producir una reacción múltiple.

50 En una realización adicional, se mezclan dos o tres o cuatro o cinco o seis sensores basados en células diferentes en la misma reacción en un medio compatible con la viabilidad celular, exocitosis de gránulos y actividad enzimática de todos los reporteros almacenados en los gránulos. En una realización específica, un medio compatible con la viabilidad celular, la exocitosis de gránulos y la actividad enzimática es Hepes 25 mM pH=7,4; NaCl 130 mM; KCl 5,65 mM; KH₂PO₄ 1,2 mM; MgCl₂ 0,6 mM; CaCl₂ 1,8 mM; 0,1 por ciento de glucosa y 0,1 por ciento de albúmina de suero bovino.

55 En una realización preferida el método usado para detección de la actividad enzimática de indicadores mixtos se selecciona de FRET o de FRET resuelto con el tiempo.

60 Por ejemplo, Biosearch Technologies ha desarrollado interruptores altamente eficaces comercializados con el nombre comercial BHQ™ o interruptores Blackhole, mientras que Anaspec ha desarrollado interruptores QXL™ y Perkin Elmer interruptores QSY®. Para que un par interruptor-fluoróforo sea eficaz los espectros de fluorescencia de emisión del fluoróforo deben solapar con los espectros de absorbancia del interruptor. Puede mezclarse varios pares

65

de fluoróforo-interruptor para desarrollar una reacción múltiple combinando fluoróforos cuyos espectros de emisión de fluorescencia no se solapan o se solapan mínimamente.

5 En otra realización, la actividad de diferentes enzimas reporteras se detecta por una combinación de métodos fluorescentes y luminiscentes.

C. Aplicaciones del sensor basado en células de la presente invención

10 Los sensores basados en células de la presente invención son en general útiles para ensayar interacciones entre al menos dos moléculas, una que actúa como el modulador de exocitosis y la otra como el ligando específico del modulador de 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, se exploran compuestos con respecto a agonistas o a antagonistas de receptores acoplados a proteínas G, una clase de receptores con alta capacidad de uso de fármacos. No obstante, 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 diagnóstico. Los usos del sensor no se limitan a receptores de superficie celular o a moduladores pequeños de receptores de superficie. Por ejemplo, con un par de dos moléculas que se unen con una proteína para ser determinada, podría llevarse a cabo la detección rápida, específica y sensible usando el sensor de la presente invención siempre que una de las moléculas que se une con la proteína para ser determinada sea una inmunoglobulina E específica, y la otra molécula que se une con la proteína para ser determinada incluya la oligomerización de la proteína para ser determinada. Otros usos del sensor anterior son para ensayar compuestos antialérgicos y para la detección de alérgenos.

25 D. Kits para ensayar si un compuesto modula la exocitosis.

La presente invención también comprende kits para ensayar si un compuesto modula la exocitosis. Dicho kit comprende al menos: una línea celular hemopoyética con exocitosis regulada profesional transfectada con al menos una proteasa reportera heteróloga bajo el control de un promotor adecuado y un sustrato específico para la detección de la proteasa reportera heteróloga secretada. Además, la línea celular hemopoyética con una exocitosis regulada profesional puede transfectarse con un modulador de la exocitosis heterólogo bajo el control de un promotor adecuado, como un GPCR, un receptor de Fc gamma I heterólogo o un receptor de Fc épsilon I heterólogo, o podría usarse un modulador de exocitosis endógeno como el receptor de Fc épsilon endógeno I (el receptor de IgE). Los kits que usan el receptor de IgE como el modulador de exocitosis pueden contener un IgE específico para el analito para determinar y una segunda molécula para inducir oligomerización del analito unido con IgE.

Ejemplos

40 La invención se describe ahora con referencia a los siguientes ejemplos. Estos ejemplos se proporcionan solamente con el fin de ilustrar la invención y no debería interpretarse de ningún modo como limitada a estos ejemplos, sino que en su lugar debería interpretarse que abarca todas y cada una de las variaciones que resultan evidentes como resultado de las enseñanzas proporcionadas en el presente documento. Aunque se han descrito en el presente documento realizaciones particulares de la invención con fines descriptivos, los expertos en la materia apreciarán que pueden realizarse numerosas variaciones de los detalles sin alejarse de la invención tal y como se describe en las reivindicaciones adjuntas.

50 La siguiente tabla describe un resumen de proteasas reporteras almacenadas en gránulos usadas en los ejemplos.

TABLA 1. Ejemplos de reporteros almacenados en gránulos usados en los métodos de la presente invención.

Gen	Número de Referencia de Genbank	Símbolo oficial	Cebadores usados para la amplificación
Serin proteasas de tipo Asp			
Granzima B humana	NM_004131	GZMB	17, 18
Granzima B de caballo	NM_001081881	GZMB	21, 22
Granzima B de rata	NM_138517	GZMB	19, 20
Granzima B bovina	XM_585453	GZMB	25, 26
Granzima B de chimpancé	XM_509879	GZMB	23, 24
Granzima B de <i>Monodelphis</i>	XM_001369720	GZMB	33, 34
Serin proteasas de tipo triptasa			
Granzima A humana	NM_006144	GZMA	15, 16
Granzima K humana	NM_002104	GZMK	29, 30
Serin proteasas de tipo quimasa			
Granzima H humana	NM_033423	GZMH	27, 28
Quimasa humana	NM_001836	CMA1	85, 86
Catepsina G humana	G NM_001911	CTSG	87, 88
Serin proteasas de tipo elastasa			
Granzima M humana	NM_005317	GZMM	31, 32
Elastasa de neutrófilos humana	NM_001972	ELA2	89, 90
Proteinasa 3 humana	NM_002777	PRTN3	81, 82

5

La siguiente tabla describe un resumen de las líneas celulares usadas en los ejemplos

TABLA 2-. Líneas celulares usadas en ejemplos en los métodos de la presente invención

Línea Celular	Número de referencia	Fuente	Origen Hemopoyético	Exocitosis Regulada Profesional
HEK293	CRL-1573™ (ATCC)	Riñón humano fetal	No	No
CHO-K1	CCL-61™ (ATCC)	Ovario de hámster chino	No	No
NK-92	CRL-2407™ (ATCC)	Linfoma no Hodgkin maligno humano	Sí	Sí
RBL-2H3	CRL-2256™ (ATCC)	Leucemia basófila de rata (cepa Wistar)	Sí	Sí
32D	CRL-11346™ (ATCC)	Médula ósea de ratón	Sí	Sí
A-431	CRL-1555™ (ATCC)	Carcinoma epidermoide humano	No	No
PC-12	CRL-1721™ (ATCC)	Feocromocitoma de glándula adrenal de rata	No	Sí
YT	ACC 434 (DSMZ)	Leucemia de linfocitos T/ NK humana	Sí	Sí
Jurkat	ACC 282 (DSMZ)	Leucemia de linfocitos T humana	Sí	No

10

La siguiente tabla describe un resumen de los moduladores de la exocitosis utilizados en los ejemplos.

TABLA 3-. Ejemplos de receptores de superficie usados como moduladores de la exocitosis en los métodos de la presente invención

Gen	Número de referencia de Genbank	Símbolo oficial	Cebadores usados para amplificación
GPCR (receptores acoplados a proteína G)			
Receptor de Bradiquina B1 Humano	N_000710	BDKRB1	35, 36
Receptor de Adenosina 3 Humano	NM_001081976	ADORA3	37, 38
Receptor Alfa Adrenérgico 2A Humano	NM_000681	ADRA2A	39, 40
Receptor Beta Adrenérgico 2 Humano	NM_000024	ADRB2	41, 42
Receptor de Angiotensina II Humano, tipo 1	NM_031850	AGTR1	43, 44
Receptor de Arginina Vasopresina 2 Humano	NM_000054	AVPR2	45, 46
Receptor de Quimiocina 1 (motivo C-X3-C) Humano	NM_001337	CX3CR1	47, 48
Receptor de Colecistoquinina B Humano	NM_176875	CCKBR	49, 50
Receptor Muscarínico Colinérgico 2 Humano	NM_001006630	CHRM2	53, 54
Receptor de Hormona Liberadora de Corticotropina 1 Humano	NM_004382	CRHR1	55, 56
Receptor de Dopamina D1 Humano	NM_000794	DRD1	57, 58
Receptor de Dopamina D2 Humano	NM_016574	DRD2	59, 60
Receptor de Endotelina de tipo B Humano	NM_000115	EDNRB	61, 62
Receptor de Glutamato, Metabotrópico 4 Humano	NM_000841	GRM4	67, 68
Receptor de 5-Hidroxitriptamina/Serotonina 1B Humano	NM_000863	HTR1B	69, 70
Receptor de Interleucina 8 Humano	NM_000634	IL8RA	71, 72
Receptor de Melanocortina 1 Humano	NM_002386	MC1R	73, 74
Receptor Y1 de Neuropeptido Y Humano	NM_000909	NPY1R	75, 76
Receptor de Taquiquinina 3 Humano	NM_001059	TACR3	77, 78
Receptor de Somatostatina 2 Humano	NM_001050	SSTR2	79, 80
Receptores de tirosina quinasa			
Receptor del Factor de crecimiento Epidérmico Humano	NM_201284	EGFR	83, 84

5 La siguiente tabla enumera todos los cebadores usados en los ejemplos.

TABLA 4-. Secuencias de cebadores usados para amplificación de genes en ejemplos de los métodos de la presente invención.

NUMERO DE SECUENCIA	ORIENTACIÓN	SECUENCIA (5'-3')
SEQ ID NO: 13	Con sentido	GTTACATATGTCGTGAATATCCCTGGACAACAG
SEQ ID NO: 14	Antisentido	GTTCGCTCGAGGTGATAGAAATAGATTCTTTGTGA
SEQ ID NO: 15	Con sentido	TTTCTCGAGAGCAGCCACAATGAGGAAC
SEQ ID NO: 16	Antisentido	GTGCGCCGCTTAACCTGCTCCCTTGATAGTCATAATT
SEQ ID NO: 17	Con sentido	GATCTCGAGGGCAGCCCTCTGAGAAGATG
SEQ ID NO: 18	Antisentido	GTGTTCGCGCCGCTTAGTAGCGTTTCATGGTTTCTT
SEQ ID NO: 19	Con sentido	TTTCTCGAGCCTTCCAGGAAGATGAAGCT
SEQ ID NO: 20	Antisentido	TTTTCGCGCCGCTAGTTAGTCTTTTTCATAGTTTTC
SEQ ID NO: 21	Con sentido	GTGTTCGAGATGCAACCCGATACCTCTGCTG
SEQ ID NO: 22	Antisentido	TTTTCGCGCCGCTCAGAGAGATTCATGGTCTTTTGTAT
SEQ ID NO: 23	Con sentido	GTACTCGAGATGAAGTCACTGAGCCTGCTC
SEQ ID NO: 24	Antisentido	GTGTTCGCGCCGCTTAGTGGGTTTCATGGTTTCTT
SEQ ID NO: 25	Con sentido	GTGTTCGAGATGAGCCGATCCTCTGCTGCTC
SEQ ID NO: 26	Antisentido	TTTTCGCGCCGCTCACACACTACCTTGACGTTTATA
SEQ ID NO: 27	Con sentido	TTATCTCGAGGAGAAATGCAGCCATTCCTC
SEQ ID NO: 28	Antisentido	TTTTCGCGCCGCTTAGAGCGCTTCATTGTTCT
SEQ ID NO: 29	Con sentido	TTATCTCGAGATATGATTAAGTTTCTCTCTTTT
SEQ ID NO: 30	Antisentido	TTTTCGCGCCGCTTAATTGTATGAGGCGGGAC
SEQ ID NO: 31	Con sentido	TTTTCGAGAGCGCCATGGAGGCCGTCGCT
SEQ ID NO: 32	Antisentido	TTTTCGCGCCGCTACCCAGGCGATCAGGC
SEQ ID NO: 33	Con sentido	TTTTCGAGATGCAACCCGATACCTCTGCTC
SEQ ID NO: 34	Antisentido	TTTTCGCGCCGCTTAGCGTTTATCTTCCAGAGTTT
SEQ ID NO: 35	Con sentido	TTTTCGAGTGGCCCTCTAGAGCTTCAAT
SEQ ID NO: 36	Antisentido	TTTTCGCGCCGCTTGTTCAATGCTGTTTAAAT
SEQ ID NO: 37	Con sentido	GAAGCTCGAGCCCAACACAGCACTGCTCT
SEQ ID NO: 38	Antisentido	GATGGCGCCGCTAACTACTACTAGAAATTTTCTCAATG
SEQ ID NO: 39	Con sentido	ACGCTCGAGGGATCCCTGCAGCCGCGACG
SEQ ID NO: 40	Antisentido	TTCTGCGCCGCTCACACGATCCGCTTCTGTCCCC
SEQ ID NO: 41	Con sentido	AACCTCGAGGGCAACCCAGGGAAACGGCA
SEQ ID NO: 42	Antisentido	CTTTCGCGCCGCTTACAGCAGTGAGTCAATTGTA
SEQ ID NO: 43	Con sentido	AATAGCCTCGAGATTCTCAACTCTTCTACTGAAG
SEQ ID NO: 44	Antisentido	GATGATGCGCCGCTCACTCAACCTCAAAACATGG
SEQ ID NO: 45	Con sentido	TTATCTCGAGCTCATGGCGTCCACCCTT
SEQ ID NO: 46	Antisentido	TTTAGCGCCGCTCACGATGAAGTGCTCTTG
SEQ ID NO: 47	Con sentido	GTATCTCGAGGACCAGTCCCTGAATCAGTG
SEQ ID NO: 48	Antisentido	ATCAGCGCCGCTTACAGAGGAGCAATGCAT
SEQ ID NO: 49	Con sentido	GTACCTCGAGGATGTGGTTGACAGCCTTCTT
SEQ ID NO: 50	Antisentido	GTGTTCGCGCCGCTCACTGGGTTGGGACCGAGGC
SEQ ID NO: 51	Con sentido	TTTTCGAGAAACATTCAGCCCCACCTGCT
SEQ ID NO: 52	Antisentido	TTTTCGAGGCGCTCAGCATTCAGGAGGGAGTG
SEQ ID NO: 53	Con sentido	CTCACTCGAGAAATAACTCAACAACTCCTCTAAC

NÚMERO DE SECUENCIA	ORIENTACIÓN	SECUENCIA (5'-3')
SEQ ID NO: 54	Antisentido	TTATGCGGCCGCTTACCTTGTGCTCCTATGTTCTT
SEQ ID NO: 55	Con sentido	AGGTCTCGAGTCCCTCCAGGACCAGCAC
SEQ ID NO: 56	Antisentido	TTAAGCGGCCGCTCAGACTGCTGTGGACTGCTT
SEQ ID NO: 57	Con sentido	CCTTCTCGAGAGGACTCTGAACACCTCTGC
SEQ ID NO: 58	Antisentido	AATAGCGGCCGCTTAGGTGGTGTGCTGACCGTTT
SEQ ID NO: 59	Con sentido	GTTTCTCGAGGATCCACTGAATCTGTCTCTGG
SEQ ID NO: 60	Antisentido	GTAAGCGGCCGCTCAGCAGTGGAGGATCTTCAG
SEQ ID NO: 61	Con sentido	GATGCTCGAGGAGAGGATTCCCGCCT
SEQ ID NO: 62	Antisentido	TTTTGCGGCCGCTCAAGATGAACGTATTTATTACTG
SEQ ID NO: 63	Con sentido	ACACCTCGAGCTGGCGTGGGAACCTCA
SEQ ID NO: 64	Antisentido	CGTAGCGGCCGCTCACACATGATGACAAATTGGTTG
SEQ ID NO: 65	Con sentido	TTTTCTCGAGGCTCTAAATGACTGTTTCCCTCT
SEQ ID NO: 66	Antisentido	TTTTGCGGCCGCTAGACATACCGTTGTCGACAGA
SEQ ID NO: 67	Con sentido	GTCAGTCGACAAACCCAAAGGCCACCTCAC
SEQ ID NO: 68	Antisentido	TTTTGCGGCCGCTTAGATTGCATGTTGGTGTA
SEQ ID NO: 69	Con sentido	CTGGCTCGAGGAACCGGTGCTCAGTGC
SEQ ID NO: 70	Antisentido	TTAGCGGCCGCTCAACTTGTGCATCTTAAACGT
SEQ ID NO: 71	Con sentido	CAGCCTCGAGAATATTACAGATCCACAGATGT
SEQ ID NO: 72	Antisentido	TACAGCGGCCGCTCAGAGTTGGAAGAGACATT
SEQ ID NO: 73	Con sentido	AGACCTCGAGGCTGTGCAGGATCCCAGAGA
SEQ ID NO: 74	Antisentido	CACGCTCGGCCGCTTACCAGGAGCAGCTCAGCAC
SEQ ID NO: 75	Con sentido	GACGCTCGACAAATCAACATTATTTCCAGTT
SEQ ID NO: 76	Antisentido	TATCGCGGCCGCTCAGATTTTTCATTATCATTTG
SEQ ID NO: 77	Con sentido	AATACTCGAGCCTGCAGCAGAAACCTGGATA
SEQ ID NO: 78	Antisentido	ATTTGCGGCCGCGGAAATGGAATTAAGAAATTCAT
SEQ ID NO: 79	Con sentido	GTCACCTCGAGGACATGGCGGATGAACCACTC
SEQ ID NO: 80	Antisentido	TGGTGGGCCGCTCAGATACTGGTTGGAGGTC
SEQ ID NO: 81	Con sentido	GTTATCTCGAGATGGCTCACCGTCCCCCAG
SEQ ID NO: 82	Antisentido	GTTGTGCGGCCGCTGTGGAGGGGCGAGTTCAGG
SEQ ID NO: 83	Con sentido	TTTTCTCGAGCGACCCCTCAGGGACGGCC
SEQ ID NO: 84	Antisentido	TTTTGCGGCCGCGGTGATGCTCCAAATAAATCACT
SEQ ID NO: 85	Con sentido	GTTACTCGAGATGCTGCTTCTCTCTCTCCCC
SEQ ID NO: 86	Antisentido	GTTGTGCGGCCGCTTAATTTGCTGCAGGATCTG
SEQ ID NO: 87	Con sentido	AAAACCTCGAGGAAAGATGCAGCCACTCCTG
SEQ ID NO: 88	Antisentido	AAAAGCGGCCGCGAGTCACAGGGGGGTCTCCA
SEQ ID NO: 89	Con sentido	GATGACTCGAGATGACCCCTGGCCCGCCGACTC
SEQ ID NO: 90	Antisentido	GTTGTGCGGCCGCTCAGTGGTCTCTGCTGGCCG

EJEMPLO 1. Selección de líneas celulares útiles para los métodos de la presente invención

Se transfectaron transitoriamente varias líneas celulares con Lipofectamina 2000 (Invitrogen, Estados Unidos), Superfect (Qiagen, Alemania) o se electroporaron de forma transitoria con un microporador (Digital Bio Technology, Corea del Sur) con el vector pCMVSporthGranzyme B, un vector en el que la granzima B humana está bajo el control del promotor de CMV humano (SEQ ID NO: 8). Este vector se usó para la selección de células con exocitosis de gránulos profesional de los reporteros de los gránulos como granzimas. Después de 48 horas el medio de cultivo celular se cambió y después de 1 hora de cultivo sin estímulo se evaluó el nivel basal por comparación con células tratadas durante 1 hora con ionomicina a 10 μ M como inductor de la exocitosis de los gránulos. La cantidad de granzima B secretada al medio de cultivo se evaluó por un ELISA de tipo sándwich específico para granzima B humana (Ucytech, Países Bajos), para cuantificar la cantidad total de proteína usando un equivalente de sobrenadante de 100.000, 50.000, 25.000 y 12.500 células. La actividad de la granzima B se determinó por hidrólisis del sustrato fluorescente de granzima B IEPD-AMC (Sigma, Estados Unidos) usando excitación a 360 nm y emisión a 460 nm para medir la actividad de la enzima secretada en un fluorímetro de microplacas BMG Labtech en microplacas de 96 pocillos usando 125 microlitros del sobrenadante de 500.000 células y 125 microlitros de sustrato específico a 400 micromoles por litro en tampón HBSS (tampón de Solución Salina Equilibrada de Hanks que contiene Hepes 25 mM pH=7,4; NaCl 130 mM; KCl 5,65 mM; KH₂PO₄ 1,2 mM; MgCl₂ 0,6 mM; CaCl₂ 1,8 mM; 0,1 por ciento de glucosa). Las microplacas se incubaron a 37 grados Celsius en el lector y se leyeron cinéticamente a los 0, 15, 30, 45 y 60 minutos. La granzima B transfectada en las células no hemopoyéticas como A431, PC12, HEK293 y CHOK1 no se almacena en los gránulos ni se secreta cuando las células se tratan con ionomicina; Jurkat y P815 son células hemopoyéticas sin exocitosis regulada profesional y secretan de forma constitutiva granzima B sin actividad enzimática; y las células hemopoyéticas con exocitosis regulada profesional como RBL-2H3 y 32D producen granzima B, la amplia mayoría de la enzima se almacena en los gránulos, se secreta por el tratamiento con ionomicina y la enzima secretada está activa. Por lo tanto, las células hemopoyéticas con exocitosis de gránulos profesional de proteasas reporteras almacenadas en gránulos son adecuadas para el desarrollo de los biosensores de la presente invención.

EJEMPLO 2. Selección de promotores útiles para la expresión de reporteros en los métodos de la presente invención usando transfección transitoria.

Se desarrollaron vectores para la expresión de la granzima B humana bajo el control de los siguientes promotores: 5'-LTR de virus de Leucemia de Moloney (MoLV5'LTR, SEQ ID NO: 3), promotor de citomegalovirus humano, promotor de fosfoglicerato quinasa humana y un promotor quimérico de promotor de citomegalovirus humano y 5'-LTR de virus de Leucemia de Moloney (hCMV-MoLV5'LTR, SEQ ID NO: 10). Cada vector se transfectó de forma transitoria individualmente por electroporación usando un microporador (Digital Bio Technology, Corea del Sur) en RBL-2H3 en condiciones convencionales y 48 horas después se recontaron las células y se sembraron la noche antes del experimento a una densidad de 100.000 células por pocillo en una microplaca de 96 pocillos. Al día siguiente las células se lavaron con tampón BSS y se trataron durante un tratamiento de 1 hora con ionomicina a 10 μ M en un volumen total de 30 microlitros. Los sobrenadantes se ensayaron con respecto a granzima B por un ELISA de tipo sándwich (Ucytech, Países Bajos). El fondo del ELISA fue de 0,2 y el punto de corte para que una dilución se considerara positiva se seleccionó arbitrariamente como 0,3. El número mínimo de células necesario para producir una señal de 0,3 se determinó para cada promotor ensayado.

Promotor	Número de células mínimo para una señal positiva de granzima B por ELISA
5'-LTR de virus de Leucemia de Moloney (MoLV5'LTR, SEQ ID NO: 3)	250
Promotor de citomegalovirus humano (hCMV)	2000
Promotor de fosfoglicerato quinasa humano	5000
Promotor quimérico de promotor de citomegalovirus humano y 5'-LTR de virus de Leucemia de Moloney (hCMV-MoLV5'LTR, SEQ ID NO: 10)	150

La transfección transitoria por electroporación indica que el orden de potencia de los promotores para la expresión del reportero es: hCMV-MoLV5'LTR > MoLV5'-LTR > hCMV > hPGK. Por lo tanto, la transfección transitoria por electroporación sugiere que todos los promotores ensayados son adecuados para expresión del reportero. Si es necesario un alto nivel de expresión del reportero entonces los promotores podrían seleccionarse de entre el promotor quimérico hCMV-MoLV5'LTR, el promotor MoLV-5'LTR o el promotor hCMV mientras que si es necesaria una expresión del reportero menor, entonces los promotores podrían seleccionarse de entre el promotor hPGK o el promotor hCMV.

EJEMPLO 3. Desarrollo de líneas celulares estables que expresan granzima B humana bajo el control del promotor quimérico hCMVMoLV5'LTR, del promotor MoLV-5'LTR y del promotor hCMV.

Se desarrollaron vectores para la expresión estable de la granzima B humana bajo el control del promotor quimérico

hCMV-MoLV5'LTR, del promotor MoLV-5'LTR o del promotor hCMV. Se incluyó un casete de resistencia a higromicina en la cadena principal del vector para selección de poblaciones estables de células. El vector también incluía un casete IRES-NGFR (SEQ ID NO: 12) clonado cadena abajo de la granzima B humana y por lo tanto, bajo el control del mismo promotor, para citometría de flujo y/o selección de células estables que expresan granzima B. Cada vector se electroporó individualmente usando un microporador (Digital Bio Technology, Corea del Sur) en RBL-2H3 y después de 48 horas se añadió higromicina a 1500 µg/ml al cultivo para la selección. Después de la selección durante aproximadamente 2 semanas se analizaron las células por citometría de flujo (Guava Technologies, Estados Unidos) con un anticuerpo contra NGFR acoplado a FITC. La población positiva se separó de forma magnética por MACS usando anti-NGFR-MACS^R (Miltenyi Biotec, Alemania). Las poblaciones clasificadas se analizaron de nuevo por citometría de flujo para comprobar la eficacia de la clasificación. Las células se sembraron posteriormente en microplacas de 96 pocillos a 100.000 células por pocillo la noche antes del experimento para la determinación cuantitativa por un ELISA de tipo sándwich (Ucytech, Países Bajos) de la secreción de granzima B humana. Al día siguiente, las células se lavaron con tampón de HBSS y se incubaron durante 60 minutos a 37 grados Celsius en 30 µl de HBSS que contenía ionomicina 10 µM como inductor de la exocitosis de los gránulos. El fondo del ELISA fue de 0,2 y el punto de corte para que una dilución se considerara positiva se seleccionó arbitrariamente como 0,3. El número mínimo de células necesario para producir una señal de 0,3 se determinó para cada promotor ensayado.

Los resultados fueron:

Promotor	Número de células mínimo para una señal positiva de granzima B por ELISA
5'-LTR de virus de Leucemia de Moloney (MoMLV5'LTR, SEQ ID NO: 3)	75
Promotor de citomegalovirus humano (hCMV)	3300
Promotor quimérico del promotor de citomegalovirus humano y 5'-LTR del virus de Leucemia de Moloney (hCMV-MoLV5'LTR, SEQ ID NO: 10)	40

Los resultados anteriores confirmaron que todos los promotores ensayados eran adecuados para la expresión del reportero almacenado en los gránulos, aunque la expresión del promotor quimérico hCMV-MoMLV5'LTR era mayor que la del promotor MoMLV-5'LTR y la del promotor hCMV. Usando células con promotor quimérico hCMV-MoMLV5'LTR para la expresión de granzima B y un ELISA sensible, se pudo detectar fácilmente la secreción de granzima B de menos de 50 células mientras que pudieron detectarse aproximadamente 75 células cuando se usó promotor MoMLV-5'LTR para expresión de granzima B.

EJEMPLO 4. Selección de los reporteros útiles para los métodos de la presente invención.

Se desarrollaron vectores para expresar la granzima A, M, H y K humana y elastasa de neutrófilos humana, quimasa humana, catepsina G humana y proteinasa 3 humana, bajo el control del promotor quimérico hCMV-MoMLV5'LTR y las células RBL-2H3 se transfectaron individualmente por electroporación usando un microporador (Gentelbio, Corea del Sur) con los plásmidos anteriores y también con el plásmido de la granzima B humana como control y con el receptor hNGFR truncado en el citosol como un marcador de superficie para la determinación del porcentaje de transfección por citometría de flujo con un anticuerpo monoclonal anti-hNGFR conjugado con FITC (Miltenyi Biotec, Alemania). Después de 48 horas las células se recogieron por pipeteo, se lavaron con tampón de HBSS y se contaron. Se trataron 650.000 células en 200 microlitros de tampón de HBSS en suspensión con ionomicina 10 µM durante 1 hora y después de centrifugarse a 400 g durante 5 minutos los sobrenadantes se analizaron con respecto a la actividad con sustratos fluorescentes específicos. Solamente se incluyeron controles de las células incubadas con tampón de HBSS. Los sustratos fluorescentes eran tetrapéptidos específicos conjugados con 7-amido-4-metilcoumarina (AMC) y se sintetizaron a petición del cliente por un proveedor de péptido adaptado. Los sustratos específicos fueron: VANR-AMC para granzima A; KVPL-AMC para granzima M; PTSY-AMC para granzima H; YRFK-AMC para granzima K; PEEI-AMC para elastasa de neutrófilos humana; PTSY-AMC para quimasa humana; PTSY-AMC para catepsina G humana; VADC-AMC para proteinasa 3 humana e IEPD-AMC para granzima B humana. La AMC liberada se midió por excitación a 360 nm y emisión a 460 nm en un fluorímetro de microplaca BMG Labtech en microplacas de 96 pocillos usando 125 microlitros de sobrenadante y 125 microlitros de sustrato específico a 400 micromoles por litro en tampón de HBSS. Las microplacas se incubaron a 37 grados Celsius en el lector y se leyeron cinéticamente a 0, 15, 30, 45 y 60 minutos. El porcentaje de electroporación transitoria medido usando el marcador de hNGFR truncado y el anticuerpo anti-hNGFR-FITC fue de aproximadamente 60 por ciento. Todas las enzimas estaban activas y por lo tanto eran adecuadas para los métodos de la presente invención pero: entre las enzimas de tipo triptasa (granzimas A y K con escisión después de lisina de arginina) la granzima A tenía mayor actividad que la granzima K; entre las enzimas de tipo quimasa (granzima H humana, quimasa humana y catepsina G humana con escisión después de tirosina o fenilalanina) la quimasa humana tenía la mayor actividad; entre las enzimas de tipo elastasa (granzima M humana, elastasa de neutrófilos humana y proteinasa 3 humana con escisión después de la masa de aminoácidos hidrófobos o cisteína) elastasa de neutrófilos y proteinasa 3 tenían actividad equivalente que era mayor que la de granzima M humana. Por lo tanto, pueden usarse enzimas de tipo triptasa, enzimas de tipo quimasa, enzimas de tipo elastasa o enzimas de tipo asp-asa en los métodos de la

presente de la invención.

EJEMPLO 5. Desarrollo de líneas celulares estables que expresan granzima A, granzima B, quimasa humana y proteinasa humana 3 bajo el control del promotor quimérico hCMV-MoLV5'LTR

Como las enzimas de tipo triptasa, las enzimas de tipo quimasa, las enzimas de tipo elastasa o las enzimas de tipo asp-asa son útiles para los métodos de la presente invención, los inventores seleccionaron la granzima A humana (enzima de tipo triptasa); la granzima B humana (enzima de tipo Asp-asa); la quimasa humana (enzima de tipo quimasa) y la proteinasa 3 humana (enzima de tipo elastasa) para los ejemplos adicionales. Los vectores se desarrollaron para la expresión estable de las granzima A humana, granzima B humana, quimasa humana y proteinasa 3 humana bajo el control del promotor quimérico hCMV-MoMLV5'LTR. Se incluyó un casete de resistencia a higromicina en la cadena principal del vector para la selección de poblaciones estables de células. El vector también incluyó un casete de IRES-NGFR clonado cadena debajo de laproteasa reportera almacenada en los gránulos y, por lo tanto, bajo el control del promotor hCMV- hCMVMoMLV5'LTR para citometría de flujo y/o selección por MACS de las células estables que expresan la granzima humana A o la granzima B humana o la quimasa humana o la proteinasa 3 humana. Cada vector se electroporó individualmente usando un microporador (Digital Bio Technology, Corea del Sur) en RBL-2H3 y después de 48 horas se añadió higromicina a 1500 µg/ml al cultivo para la selección. Después de la selección durante aproximadamente 2 semanas, las células se analizaron por citometría de flujo (Guava Technologies, Estados Unidos) con un anticuerpo contra NGFR acoplado a FITC. La población positiva se separó de forma magnética por MACS usando anti-NGFR-MACS^R (Miltenyi Biotec, Alemania). Las poblaciones clasificadas se analizaron de nuevo por citometría de flujo para comprobar la eficacia de clasificación. El porcentaje de células positivas para NGFR siempre fue mayor del 65 por ciento. Las células se sembraron la noche antes del experimento en microplacas de 24 pocillos a 650.000 células por pocillo en 800 microlitros de medio de cultivo celular completo. Al día siguiente, las células se lavaron con tampón de HBSS y se trataron con ionomicina 10 µM durante 1 hora a 37 grados Celsius en 200 µl de tampón HBSS y después de centrifugarse a 400 g durante 5 minutos los sobrenadantes se analizaron con respecto a la actividad con sustratos fluorescentes específicos. Se incluyeron solamente controles de células incubadas con tampón de HBSS. Los sustratos fluorescentes fueron: VANR-AMC para granzima A; PEEI-AMC para elastasa de neutrófilos humana; PTSY-AMC para quimasa humana; VADC-AMC para proteinasa 3 humana e IEPD-AMC para granzima B humana. Se midió AMC liberada por excitación a 360 nm y emisión a 460 nm en un fluorímetro de microplaca BMG Labtech en microplacas de 96 pocillos usando 125 microlitros de sobrenadante y 125 microlitros de sustrato específico a 400 micromoles por litro en tampón de HBSS. Las microplacas se incubaron a 37 grados Celsius en el lector y se leyeron cinéticamente a 0, 15, 30, 45 y 60 minutos. Los pocillos de control solamente con sustrato en tampón de HBSS se incluyeron para restar la autofluorescencia de sustratos tanto para las células tratadas con ionomicina como para las células tratadas solamente con tampón de HBSS. La autofluorescencia de los sustratos peptídicos en tampón de HBSS fue de aproximadamente 3000 mientras que la fluorescencia de las células tratadas con tampón de HBSS solamente durante 60 minutos a 37 grados Celsius fue de aproximadamente 5000, es decir, la liberación basal en ausencia de modulador de exocitosis fue de aproximadamente 2000. Por el contrario, la fluorescencia de liberación inducida por ionomicina de granzimas humanas A y B fue de aproximadamente 20.000 para una señal con respecto a fondo de 10 cuando se usó el sobrenadante equivalente a 100.000 células; la fluorescencia de liberación inducida por ionomicina de quimasa humana fue de aproximadamente 30.000 para una señal con respecto a fondo de 15 cuando se usó el sobrenadante equivalente a 100.000 células y la fluorescencia de liberación inducida por ionomicina de proteinasa 3 humana fue de aproximadamente 12.000 para una señal con respecto a fondo de 6 cuando se usó el sobrenadante equivalente a 100.000 células. Por lo tanto, las enzimas de tipo triptasa, enzimas de tipo quimasa, enzimas de tipo elastasa o enzimas de tipo asp-asa pueden expresarse de forma estable en los gránulos de las células hemopoyéticas con exocitosis regulada profesional y dichas proteasas almacenadas en gránulos se liberan por moduladores de exocitosis para producir sensores con buenas relaciones de señal con respecto al fondo usando sustratos peptídicos acoplados a AMC específico. Todos esos tipos de enzimas son por lo tanto útiles para los métodos de la presente invención.

EJEMPLO 6. Selección de proteasas reporteras almacenadas en los gránulos de diferentes especies.

Este experimento se diseñó para ensayar si las proteasas reporteras almacenadas en los gránulos de otras especies diferentes del ser humano podrían usarse para los métodos de la presente invención. Como ejemplo, se seleccionó la granzima B de diferentes especies. Se desarrollaron vectores para la expresión de granzima B humana, de rata, de caballo y de chimpancé y se transfectaron individualmente células RBL-2H3 con los plásmidos que comprenden el promotor quimérico de hCMV-MoMLV5'LTR-GranzymeBIRES-NGFR con resistencia a higromicina para transfecciones estables. Cada vector se electroporó individualmente usando un microporador (Digital Bio Technology, Corea del Sur) en RBL-2H3 y después de 48 horas se añadió higromicina a 1500 µg/ml al cultivo para la selección. Después de una selección durante aproximadamente 2 semanas las células se analizaron por citometría de flujo (Guava Technologies, Estados Unidos) con un anticuerpo contra NGFR acoplado a FITC. La población positiva se separó de forma magnética por MACS usando anti-NGFR-MACS^R (Miltenyi Biotec, Alemania). Las poblaciones clasificadas se analizaron de nuevo por citometría de flujo para comprobar la eficacia de clasificación. El porcentaje de células positivas para NGFR siempre fue mayor del 65 por ciento. Las células se

sembraron la noche antes del experimento en microplacas de 96 pocillos a 100.000 células por pocillo en 100 microlitros de medio. Al día siguiente las células se lavaron con tampón de HBSS y se trataron con ionomicina 10 μ M durante 1 hora a 37 grados Celsius en 105 μ l de tampón HBSS y después de centrifugarse a 400 g durante 5 minutos los sobrenadantes se analizaron con respecto a la actividad con sustratos fluorescentes específicos. Se incluyeron controles de las células incubadas con tampón de HBSS. El sustrato fluorescente fue IEPD-AMC para todas las granzimas B ensayadas. La AMC liberada se midió por excitación a 360 nm y emisión a 460 nm en un fluorímetro de microplacas de BMG Labtech en microplacas de 96 pocillos usando 105 microlitros de sobrenadante y 145 microlitros de sustrato específico a 345 micromoles por litro en tampón de HBSS. Las microplacas se incubaron a 37 grados Celsius en la lectura y se leyeron cinéticamente a 0, 15, 30, 45 y 60 minutos. Los pocillos de control con sustrato solamente en tampón de HBSS se incluyeron para restar la autofluorescencia de los sustratos tanto a las células tratadas con ionomicina como a las células tratadas solamente con tampón de HBSS.

Especie de origen de la granzima B	Fluorescencia del sobrenadante de las células tratadas solamente con tampón HBSS (Basal)	Fluorescencia del sobrenadante de las células tratadas con ionomicina	Señal con respecto al fondo
Humano	2000	20.000	10
Caballo	2000	30.000	15
Chimpancé	2000	20.000	10
Rata	2000	22.000	11

Los resultados anteriores demuestran que la granzima B de diferentes especies puede usarse para los métodos de la presente invención. Por lo tanto, las proteasas almacenadas en los gránulos útiles para los métodos de la presente invención no se limitan a enzimas de origen humano y pueden usarse enzimas de muchas otras especies con eficacia igual o incluso mayor que las enzimas de origen humano.

EJEMPLO 7. Promotores adecuados para la expresión en superficie de receptores acoplados a proteína G (GPCR) usados como moduladores de la exocitosis en los métodos de la presente invención.

Los receptores acoplados a proteína G (GPCR) es la clase principal de receptores de superficie celular con más de 350 receptores diferentes y aproximadamente el 30 por ciento de los fármacos aprobados en la actualidad. Además, varios GPCR inducen un aumento del calcio intracelular tras la unión al ligando agonista y, por lo tanto, los GPCR son moduladores de la exocitosis muy importantes para los métodos de la presente invención. No obstante, la expresión heteróloga de GPCR en la superficie de ciertas células, por ejemplo, en la superficie de las células hemopoyéticas con exocitosis regulada profesional, es difícil. Más del 90 por ciento de los GPCR no tienen péptido señal, y para muchos GPCR no hay ningún anticuerpo adecuado para detección en la superficie. Por lo tanto, este ejemplo se diseñó para ensayar el efecto de la adición del péptido señal en la expresión en la superficie de un GPCR modelo y el efecto de la adición de un marcador peptídico amino terminal para la detección en la superficie por citometría de flujo de cualquier GPCR marcado. Se seleccionó el receptor de Interleucina 8 Humana como el GPCR modelo porque está disponible un anticuerpo de Becton Dickinson para la detección en la superficie por citometría de flujo. Los vectores se desarrollaron para la expresión de receptor de la Interleucina-8 humana (hIL8R) bajo el control de los siguientes promotores: 5'-LTR de virus de Leucemia de Moloney (MoMLV5'LTR, SEQ ID NO: 3), promotor de fosfoglicerato quinasa humano y promotor para el factor de elongación 1 alfa humano (hEF1alfa, SEQ ID NO: 1). Se desarrollaron dos variantes del vector para cada promotor: una variante del vector con péptido señal de la inmunoglobulina kappa de ratón seguido de un marcador c-myc (péptido EQKLISEEDLN) y el GPCR completo sin metionina en la posición 1, y una variante del vector que comienza en la metionina 1 y por lo tanto sin péptido señal y sin marcador c-myc. Todos los vectores tenían el gen de resistencia a neomicina para la selección de las células eucariotas estables. Cada vector se electroporó individualmente usando un microporador (Digital Bio Technology, Corea del Sur) en RBL-2H3 y después de 48 horas se añadió neomicina a 500 μ g/ml al cultivo para selección. Después de la selección durante aproximadamente 2 semanas, las células se analizaron por citometría de flujo (Guava Technologies, Estados Unidos) con un anticuerpo contra el receptor de la Interleucina-8 humana acoplado a FITC (anti-hIL8R-FITC, clon 5A12, Cat. n.º 555939, Becton Dickinson, Estados Unidos) y con el anticuerpo anti-marcador cmyc (anti-cmyc-FITC, clon 9E10, Sigma-Aldrich, Estados Unidos) para vectores que incluían este marcador. Todos los promotores fueron útiles para la expresión del receptor de la Interleucina-8 humano en la superficie celular de células RBL-2H3 y por lo tanto, todos son útiles para los métodos de la presente invención aunque la expresión del promotor de fosfoglicerato quinasa humano (promotor de hPGK) era menor que la del promotor de hEF1alfa (promotor de hEF1alfa) o del promotor de 5'-LTR de virus de Leucemia de Moloney (promotor MoMLV5'LTR). No hubo ninguna diferencia en el nivel de expresión del GPCR marcado y no marcado y por lo tanto un marcador universal y un péptido señal permiten detección en la superficie de GPCR útiles para los métodos de la presente invención.

EJEMPLO 8. Influencia de las combinaciones de promotores, péptido señal y secuencia de glicosilación para la expresión en la superficie de GPCR usados como moduladores de la exocitosis en células hemopoyéticas con exocitosis regulada profesional en los métodos de la presente invención

Se desarrollaron vectores para la expresión estable de GPCR en células hemopoyéticas con exocitosis regulada profesional bajo el control de los siguientes promotores: 5'-LTR del virus de la Leucemia de Moloney (MoMLV5'LTR, SEQ ID NO: 3), promotor de fosfoglicerato quinasa humana y promotor de factor de elongación alfa 1 humano (hEF1alfa, SEQ ID NO: 1). Todos los vectores tenían el gen de resistencia a neomicina para la selección de células eucariotas estables, el péptido señal de la inmunoglobulina kappa de ratón seguido de un marcador c-myc (péptido EQKLISEEDLN) y el GPCR completo sin la metionina en la posición 1. Cada vector se electroporó individualmente usando un microporador (Digital Bio Technology, Corea del Sur) en RBL-2H3 y después de 48 horas se añadió neomicina a 500 µg/ml al cultivo para la selección. Después de la selección durante aproximadamente 2 semanas las células se analizaron por citometría de flujo (Guava Technologies, Estados Unidos) con el anticuerpo anti-marcador cmyc (anti-cmyc-FITC, clon 9E10, Sigma-Aldrich, Estados Unidos) para la expresión en superficie. Basándose en la expresión en superficie, los GPCR se clasificaron en tres categorías: GPCR que eran positivos con todos los promotores ensayados con el receptor de interleucina 8 humana como prototipo; GPCR que eran positivos con al menos uno de los promotores ensayados con el receptor de bradiquinina humana de tipo B1 como prototipo (fue positivo solamente con el promotor 5'-LTR del virus de Leucemia de Moloney) y GPCR que eran negativos con todos los promotores ensayados con el receptor de HTR1 B humano como prototipo. Por lo tanto, se desarrollaron nuevos vectores con el receptor de HTR1 B como un prototipo de un receptor que es difícil de expresar en células hemopoyéticas como las RBL-2H3. Se desarrollaron vectores para la expresión estable de HTR1 B humano en las células RBL-2H3 con exocitosis regulada profesional bajo el control de los siguientes promotores: 5'-LTR del virus de la Leucemia de Moloney (MoMLV5'LTR, SEQ ID NO: 3), promotor de fosfoglicerato quinasa humana y promotor de factor de elongación 1 alfa humano (hEF1alfa, SEQ ID NO: 1). Todos los vectores tenían el gen de resistencia a neomicina para la selección de las células eucariotas estables, el péptido señal de la inmunoglobulina kappa de ratón seguido de un marcador c-myc (péptido EQKLISEEDLN), una secuencia de glicosilación derivada de un GPCR viral (VGS, SEQ ID NO: 4) y el HTR1 B humano completo sin la metionina en la posición 1. Dicha secuencia de glicosilación se incluyó para ensayar si la etapa limitante para la expresión en la superficie es la exportación desde el retículo endoplásmico que se regula por las modificaciones postraduccionales de proteínas tales como glicosilación. Cada vector se electroporó individualmente usando un microporador (Digital Bio Technology, Corea del Sur) en RBL-2H3 y después de 48 horas se añadió neomicina a 500 µg/ml a cultivo para la selección. Después de la selección durante aproximadamente 2 semanas las células se analizaron por citometría de flujo (Guava Technologies, Estados Unidos) con el anticuerpo anti-marcador cmyc (anti-cmyc-FITC, clon 9E10, Sigma-Aldrich, Estados Unidos) para la expresión en superficie. Los resultados se expresaron como el porcentaje de células positivas después de restar los valores de las células RBL-2H3 no transfectadas incubadas con el mismo anticuerpo anti-marcador cmyc. Se indicó un porcentaje de menos del 2 por ciento como tal y se consideró negativo, ya que el aislamiento de dichas células positivas por MACS no tuvo éxito (datos no mostrados). Para las células positivas se tomó la intensidad de fluorescencia media (IFM) como un marcador de la densidad del receptor de superficie en la superficie de las células positivas. Los resultados se muestran en la siguiente tabla:

Promotor	Secuencia de glucosilación (VGS) en vector (sí o no)	Porcentaje de células positivas después de selección	Intensidad de fluorescencia media de células positivas (IFM)
Promotor hPGK	No VGS	<2	-
Promotor hPGK	Sí	5,6	49,2
Promotor hEF1alfa	No VGS	<2	-
Promotor hEF1alfa	Sí	10	56,9
Promotor MoMLV5'LTR	No VGS	<2	-
Promotor MoMLV5'LTR	Sí	13,7	40,3
Promotor RSV	No VGS	5	29,3
Promotor RSV	Sí	5,6	82,4

Por lo tanto, para HTR1 B la inclusión de una secuencia de glicosilación en el vector para aumentar la expresión en la superficie fue positiva con todos los promotores ensayados. Resulta curioso que para un nuevo promotor ensayado con respecto a la expresión de HTR1 B, la inclusión de una secuencia de glicosilación no mejora el porcentaje de células positivas pero la IFM de células positivas aumentó 2,8 veces. Cuando se desarrollaron vectores para el nuevo GPCR incluyendo el VGS y promotor de hEF1alfa o promotor MoMLV-5'LTR y vectores transfectados de forma estable con VGS rindieron casi igual o mejor que sus homólogos negativos para VGS.

Dichos GPCR ensayados hasta la fecha incluían: BDKRB1, AGTR1, CX3CR1, GRM4, AVPR2, DRD1, DRD2, EDNRB, TACR3, ADORA3, HTR1B, CHRM2, IL8RA, NPY1 R, ADRA2A, ADRAB2, CCKBR, SSTR2, MC1R, BB2R y CHHR1 (datos no mostrados). Los mismos resultados también fueron ciertos en otras células hemopoyéticas como las células 32D y P815 y los resultados mostrados para HTR1B en RBL-2H3 son representativos del efecto de una secuencia de glicosilación en la expresión en la superficie de todos los GPCR ensayados en varias líneas celulares hemopoyéticas. Por lo tanto, los resultados anteriores indican que la adición de una secuencia de glicosilación a un GPCR mejora la expresión en la superficie y es por lo tanto útil para los métodos de la presente invención.

EJEMPLO 9. Desarrollo de células estables que expresan tanto una proteasa reportera almacenada en los gránulos como un GPCR como un modulador de la exocitosis útil para los métodos de la presente invención. La exocitosis regulada de los reporteros almacenados en los gránulos tras la unión del ligando con el modulador de la exocitosis (agonista) al GPCR expresado en la superficie celular.

Después de la selección de células útiles, reporteros, promotores para los reporteros y vectores para la expresión en la superficie de GPCR usados como moduladores de exocitosis para los métodos de la presente invención, se realizó una combinación de todos los componentes en este ejemplo. Se seleccionó la granzima B humana como reportero, el promotor quimérico de hCMV-MoLV5'LTR como promotor para la expresión del promotor, RBL-2H3 como las células hemopoyéticas con exocitosis regulada profesional y varios GPCR como moduladores de la exocitosis bajo el control de 5'-LTR del virus de la Leucemia de Moloney (MoMLV5'LTR, SEQ ID NO: 3), como promotor para la expresión de los moduladores de la exocitosis. Todos los vectores para la expresión de los moduladores de la exocitosis tenían el gen de resistencia a neomicina para la selección de células eucariotas estables, el péptido señal de la inmunoglobulina kappa de ratón seguido de un marcador c-myc (péptido EQKLISEEDLN), una secuencia de glicosilación derivada de un GPCR viral (VGS, SEQ ID NO: 4) y el GPCR humano completo sin la metionina en la posición. 1. Los vectores para la expresión de la granzima B tenían el promotor quimérico de hCMV-MoLV5'LTR- GranzymeB-IRES-NGFR con resistencia a higromicina para transfecciones estables. Los vectores para GPCR se electroporaron en primer lugar, se seleccionaron las células con neomicina a 500 µg/ml durante aproximadamente dos semanas y las células se analizaron por citometría de flujo (Guava Technologies, Estados Unidos) con el anticuerpo anti-marcador cmc (anti-cmyc-FITC, clon 9E10, Sigma-Aldrich, Estados Unidos) para expresión en superficie. Las células positivas se separaron por separación magnética usando el anticuerpo monoclonal anti-cmyc conjugado con biotina (Miltenyi Biotec, Alemania) y estreptavidina-MACS (Miltenyi Biotec, Alemania). Después de cultivar una fracción positiva de las células, se analizó de nuevo por citometría de flujo con el anticuerpo anti-marcador cmc. Las células positivas se electroporaron individualmente con el vector para expresión de granzima B humana usando un microporador (Digital Bio Technology, Corea del Sur) y después de 48 horas se añadieron higromicina a 1500 µg/ml y neomicina a 500 µg/ml al cultivo para la selección. Después de la selección durante aproximadamente 2 semanas las células se analizaron por citometría de flujo (Guava Technologies, Estados Unidos) con un anticuerpo contra NGFR acoplado a FITC. La población positiva se separó de forma magnética por MACS usando anti-NGFR-MACS^R (Miltenyi Biotec, Alemania). Las poblaciones clasificadas se analizaron de nuevo por citometría de flujo para comprobar tanto la expresión del GPCR con el anticuerpo anti-marcador cmc, como con el anticuerpo anti-NGFR para comprobar la expresión de la granzima B. Se detectó expresión de GPCR en más del 70 por ciento aisladas como fracción positiva mientras que la granzima B era positiva para más del 65 por ciento de células. Los GPCR incluidos fueron: SSTR2 y CHRM2 como GPCR acoplados a alfa-i; AGTR1 y receptor de bradiquinina de tipo B1 (BDKRB1) como GPCR acoplados a alfa-q y AVPR2 como GPCR acoplados a alfa-s. Se obtuvieron ligandos para los GPCR anteriores de Sigma-Aldrich (Estados Unidos) y se usaron a una concentración final de 10 µM en tampón HBSS a no ser que se indicara otra cosa: seglitida (para SSTR2); carbacol (para CHRM2); angiotensina (para AGTR1); kalinina (para bradiquinina de tipo B1) y arginina-vasopresina (para AVPR2). Las células se sembraron la noche anterior al experimento a 100.000 células por pocillo de una microplaca de 96 pocillos en 100 µl de medio de cultivo celular completo. Al día siguiente, las células se lavaron con tampón HBSS y se incubaron con el ligando (agonista) a 10 µM de cada GPCR en 30 µl de tampón HBSS a 37 grados Celsius durante 60 minutos y después de centrifugarse a 400 g durante 5 minutos los sobrenadantes se analizaron con respecto a proteína granzima B humana mediante un ELISA de tipo sándwich específico para granzima B humana (Ucytech, Países Bajos). Se incluyeron controles con células tratadas con HBSS solamente para liberación basal. El fondo del ELISA fue de 0,2. El factor de dilución máximo para un ELISA positivo se usó para calcular el número mínimo de células para cuantificación de la granzima B usando los siguientes datos: se sembraron 100.000 células, se realizó exocitosis en 30 µl y en la placa de ELISA se cargaron 100 µl de sobrenadante por pocillo. Por ejemplo, si se usan 30 µl de sobrenadante de las células tratadas con el ligando (agonista) por pocillo de placa de ELISA, y el volumen se completa a 100 µl, entonces la sensibilidad de dicho ensayo para dicho GPCR es de 100.000 células porque se dividen 100.000 células por 30 µl, se multiplica por 100 µl usados por pocillo de placa de ELISA y se dividen por un factor de dilución de 3,33 ya que el volumen se completa de 30 µl a 100 µl. Un mejor ensayo es aquel para el que es necesaria una cantidad menor de células. Los resultados fueron los siguientes:

GPCR como modulador de la exocitosis (tipo)	Ligando usado (agonista)	Dilución máxima de ELISA ensayado	Absorbancia a dilución máxima de ELISA ensayado (1)	Sensibilidad (cantidad mínima de células necesarias)
SSTR2 (acoplado a alfa-i)	Seglitida	2250	2,4	<150 células
CHRM2 (acoplado a alfa-i)	Carbacol	2250	0,6	<150 células
AGTR1 (acoplado a alfa-q)	Angiotensina	2250	1,8	<150 células
BDKRB1 (acoplado a alfa-q)	Calinina	2250	0,8	<150 células
AVPR2 (acoplado a alfa-s)	Arginina-vasopresina	2250	0,2	150 células
(1) Después de resta de 0,2 correspondiente a pocillos blancos				

Los resultados anteriores demuestran que las células hemopoyéticas con exocitosis regulada profesional que portan GPCR como moduladores de la exocitosis de proteasas reporteras almacenadas en los gránulos podrían ser sensores extremadamente sensibles para ensayar interacciones entre ligandos y moduladores de la exocitosis.

EJEMPLO 10. Detección directa de proteasas de gránulos secretados con sustratos de alta sensibilidad

El experimento del ejemplo 9 demostró que los sensores basados en la exocitosis de proteínas almacenadas en gránulos pueden ser extremadamente sensibles (la enzima secretada desde menos de 100 células puede detectarse fácilmente por ELISA) pero en los experimentos del ejemplo 6 para la detección de actividad enzimática fueron necesarias aproximadamente 100.000 células para una relación de señal con respecto a fondo de 10. Por lo tanto, el factor que limitó la sensibilidad del ensayo en los ensayos homogéneos fue la combinación de proteasas almacenadas en gránulos con péptidos acoplados a AMC. Se conoce en el estado de la técnica que los aminoácidos en ambos lados del sitio de escisión son determinantes principales tanto de la especificidad como de la eficacia de la escisión. Por lo tanto, para aumentar la sensibilidad de detección de la actividad enzimática de las proteasas secretadas, pueden sintetizarse sustratos peptídicos con aminoácidos en ambos lados de sitios de escisión. Como alternativa, pueden utilizarse cascadas de amplificación de la proteasa con zimógenos para la amplificación de la señal. En este ejemplo se diseñó a medida un sustrato basado en FRET para comprobar si una tecnología de detección diferente, es decir FRET frente a fluorescencia de AMC liberada, o una mejor secuencia de escisión debido a la existencia de aminoácidos en ambos lados del sitio de escisión, mejora la detección de la actividad enzimática de la proteasa liberada de los gránulos. Se usó granzima B humana como una enzima modelo. Los sustratos para la detección de granzima B humana secretada fueron: IEPD-AMC que se usó a una concentración final de 200 μ M y se leyó a 505 nm después de excitación a 400 nm y AM-Ser-Ile-Glu-Pro-Asp-Ser-Gly-Ser-TAMRA (FAMSIEPDSGS-TAMRA) que se sintetizó a medida por un proveedor de péptidos. Se detectó la escisión del péptido marcado con FAM-TAMRA por fluorescencia usando excitación a 485 nm y emisión a 535 nm y péptido marcado a una concentración final de 1 μ M.

Para cada sustrato se analizó la exocitosis de 50.000, 25.000, 12.500, 6.250, 3.125, 1560, 780 y 390 células. Las células se sembraron la noche antes del experimento a las densidades anteriores en placas de 96 pocillos usando 100 μ l de medio de cultivo celular completo por pocillo. El día del experimento las células se lavaron con tampón HBSS y se inició la exocitosis mediante la adición de ionomicina a una concentración final de 10 μ M en tampón HBSS y se incubó durante 60 minutos a 37 grados Celsius. Solamente se incluyeron controles de células tratadas con tampón HBSS para la determinación de la liberación basal. Se sembraron cinco réplicas de cada densidad celular para cada sustrato. El sobrenadante de las células se centrifugó a 400 g durante 5 minutos y se usó para la determinación de fluorescencia en placas de 96 pocillos. La AMC liberada se midió por excitación a 360 nm y emisión a 460 nm en un fluorímetro de microplacas BMG Labtech en microplacas de 96 pocillos mientras que se midió FAM liberado por excitación a 485 nm y emisión a 535 nm en el mismo lector. Las microplacas se incubaron a 37 grados Celsius en el lector y se leyeron cinéticamente a 0, 15, 30, 45 y 60 minutos. Se incluyeron pocillos de control con sustrato solamente en tampón HBSS para restar la autofluorescencia de los sustratos para ambas células tratadas con ionomicina y para las células tratadas con tampón HBSS solamente. Se seleccionó una señal arbitraria con respecto al fondo de aproximadamente dos como sensibilidad. Los resultados fueron los siguientes: para IEPD-AMD la sensibilidad fue de 25.000 células las que produjeron una señal con respecto al fondo de 2 mientras que para FAM-TAMRA la sensibilidad peptídica fue entre 390 y 780 células ya que 780 células producían una señal con respecto a fondo de 3 mientras que 390 producían una señal con respecto a fondo por debajo del límite arbitrario de 2. La selección de la sensibilidad como 780 células del péptido FAM-TAMRA es más de 30 veces más sensible para la detección de la granzima B que el péptido IEPD-AMC. Por lo tanto, este ejemplo ilustra que la selección de los sustratos de la proteasa altamente sensibles como los péptidos de FRET es útil para los métodos de la presente invención.

EJEMPLO 11. Desarrollo de zimógenos para una cascada de amplificación.

El último ejemplo demostró que sustratos de alta sensibilidad son útiles para la detección sensible de proteasas reporteras almacenadas en los gránulos cuando se liberan, por lo tanto, este ejemplo se diseñó para demostrar que otro modo de amplificación de la señal sensible es el uso de una cascada proteolítica. Como modelo se seleccionó la granzima B humana. Se desarrolló un zimógeno activado por granzima B humana de la procaspasa-3 no modificada nativa humana (huCasp3) y de una procaspasa-3 humana mutada (mut-huCasp3) en la que los aminoácidos de 172 a 179 se han cambiado de Ile-Glu-Thr-Asp-Ser-Gly-Val-Asp a Ile-Glu-Pro-Asp-Val-Leu-Met-Glu, es decir, se ha mutado la Treonina en 174 a Prolina porque IEPD es un mejor sustrato de granzima B que IETD y la serina en 176 se ha mutado a valina, la glicina en 177 se ha mutado a leucina, la valina en 178 se ha mutado a metionina y el ácido aspártico en 179 se ha mutado a ácido glutámico para mejorar la eficacia de escisión por la granzima B humana y para reducir la autoactivación de procaspasa-3. Se clonó ADNc de ambas variantes de la procaspasa-3 humana que comprendía los aminoácidos Serina en 29 a ácido aspártico en 192 en el vector pET43a+ de Novagen. Después de secuenciar los vectores de expresión se transformaron en la cepa de *E. coli* BL21 DE3pLys para la expresión de proteínas. Cada proteína se clonó con un marcador de polihistidina en el extremo C terminal para purificación. Se indujo la procaspasa-3 nativa humana (huCasp3) durante solamente 30 minutos para evitar la autoactivación, mientras que se indujo procaspasa-3 mutada (mut-huCasp3) tanto durante 30 minutos como durante 2 horas. Se usó el sustrato de DEVD-AMC para la detección de la caspasa-3 activa con excitación a 360 nm y emisión a 460 nm. Se usó un sobrenadante equivalente a 15.000 RBL-2H3 transfectadas de forma estable con granzima B humana tratada con ionomicina 10 μ M durante 60 minutos para activación de zimógeno. La actividad de la granzima B humana de dicho sobrenadante cuando se midió con IEPD-AMD produjo una señal con respecto al fondo de 2,6 después de la incubación durante 60 minutos a 37 grados Celsius, usando un sobrenadante equivalente a 25.000 células. El fondo de fluorescencia del sustrato de DEVD-AMC fue 2775 y se restó tanto de la caspasa-3 tratada con granzima B como de la caspasa-3 no tratada con granzima B (caspasa-3 solamente) usada como control y todas las muestras se ensayaron por triplicado. Los resultados fueron los siguientes:

Caspasa-3 humana	Fluorescencia de Caspasa 3 solamente	Fluorescencia de caspasa-3 tratada con granzima B	Señal con respecto a fondo (S/B)
huCasp-3 nativa (no modificada)	15775	43548	2,8
Mut-huCasp-3 (mutada en 172 a 179)	588	45472	77

Los resultados anteriores demuestran que la procaspasa-3 humana es útil para la detección de granzima B secretada en gránulos y es aproximadamente 1,7 veces más sensible que la detección directa de granzima B secretada con el sustrato IEPD-AMC como la señal con respecto a fondo usando el sobrenadante equivalente a 15.000 células, y la pro-caspasa-3 es la misma que la detección directa de la granzima B humana usando el sobrenadante equivalente a 25.000 células. Aunque la mutación de la procaspasa-3 no mejora la escisión por la granzima B humana ya que la fluorescencia es aproximadamente la misma (45472 frente a 43548), la autoactivación basal de la procaspasa-3 humana mutada fue 27 veces menor que la de la procaspasa-3 nativa humana. La relación de la señal con respecto al fondo de la procaspasa-3 humana mutada fue de 77, es decir, aproximadamente 27 veces mayor que la de procaspasa-3 nativa humana. Usando el sobrenadante equivalente a 5.000 células y una placa de 384 pocillos, la señal con respecto al fondo fue mayor de 20, por lo tanto, la procaspasa-3 humana mutada permitió el desarrollo de un sensor basado en células homogéneo útil para los métodos de la presente invención. Además, la pro-caspasa-3 mutada humana puede expresarse hasta aproximadamente 10 mg/l de cultivo de *E. coli* (aproximadamente 10 veces más proteína que la pro-caspasa-3 nativa expresada durante solamente 30 minutos para evitar la autoactivación), no tiene actividad basal incluso después de 120 minutos de incubación a 37 °C en condiciones de reacción óptimas, y puede almacenarse durante al menos 6 meses a -20 grados Celsius sin autoactivación. Por lo tanto, los zimógenos con un alto índice de zimogenicidad y actividad basal baja son útiles tanto para la mejora de la sensibilidad como para una relación de señal con respecto al fondo alta que beneficia los sensores basados en células de la presente invención.

Ejemplo 12. Optimización de las condiciones de ensayo: tiempo de exocitosis.

Se diseñó un experimento para optimizar las condiciones de ensayo tales como: tiempo de exocitosis, número de etapas necesarias para los ensayos y usos de células en suspensión. Se usaron en este ejemplo para la optimización del tiempo de exocitosis las células desarrolladas en el ejemplo n.º 9 que expresan tanto un GPCR como una granzima B humana

Los GPCR incluidos fueron CHRM2 (un GPCR acoplado a alfa-i) y el receptor de bradiquinina de tipo B1 (un GPCR acoplado a alfa-q). Se usaron carbacol y kalinina de Sigma-Aldrich (Estados Unidos) como ligandos para CHRM2 y receptor de bradiquinina de tipo B1, respectivamente, y se usaron a una concentración final 10 μ M en tampón HBSS. Las células se sembraron la noche antes del experimento a 20.000 células por pocillo de una microplaca de 96 pocillos en 100 μ l de medio de cultivo celular completo. Al día siguiente las células se lavaron con tampón HBSS y

se incubaron con el ligando (agonista) de cada GPCR a 10 μ M en 30 μ l de tampón HBSS a 37 grados Celsius durante 5, 15, 30 o 60 minutos y después de centrifugarse a 400 g durante 5 minutos se analizaron los sobrenadantes con respecto a la actividad de la granzima B humana usando FAM-SIEPDSGS-TAMRA a una concentración final 1 μ M como sustrato de la granzima B humana. La FAM liberada se midió por excitación a 485 nm y emisión a 535 nm en un fluorímetro de microplacas BMG Labtech en microplacas de 96 pocillos. Las microplacas se incubaron a 37 grados Celsius en el lector y se leyeron cinéticamente a 0, 15, 30, 45 y 60 minutos. Se incluyeron pocillos de control solamente con sustrato en tampón HBSS para restar la autofluorescencia de los sustratos tanto a las células tratadas con los ligandos como a las células tratadas sólo con tampón HBSS. Tanto para el receptor de bradiquinina de tipo B1 como para CHRM2 se descubrió que la exocitosis es de más del 90 % del máximo a los 5 minutos y la señal con respecto al fondo (S/B) es de aproximadamente 20-22 si el medio se toma a los 5 a 15 minutos; S/B es aproximadamente 15-17 si el medio se toma a los 30 minutos y S/B es de aproximadamente 8-10 si el medio se toma a los 60 minutos. La señal con respecto al fondo es menor en tiempos de exocitosis más largos debido al mayor aumento de la liberación basal que el aumento de señal específica después de los primeros 5 a 15 minutos. Por lo tanto, puede usarse cualquier tiempo de exocitosis de probablemente menos de 5 minutos a al menos 60 minutos para los métodos de la presente invención, pero los tiempos de exocitosis más largos producen un sensor con una señal con respecto al fondo menor, la exocitosis está casi completa a los 5 minutos y la señal con respecto al fondo es buena para un sensor robusto. Este ejemplo también sugiere que debido a un tiempo de exocitosis bajo es posible mezclar un sustrato indicador impermeable celular directamente con las células para una mezcla y leer el ensayo para el aumentar el rendimiento.

Ejemplo 13. Optimización de las condiciones de ensayo: número de etapas necesarias para el ensayo.

Este experimento se diseñó para ensayar cuántas etapas son necesarias para un ensayo con el sensor basado en células, en particular si es necesaria una etapa de lavado antes del ensayo. Como la RBL-2H3 es una línea celular adherente, es necesaria al menos una etapa de aspiración del medio de cultivo celular. Si se aspira todo el medio de cultivo celular entonces las células se secarán y con el tiempo morirán, en particular si hay un intervalo de tiempo entre la aspiración y la adición de los compuestos para ensayar la exocitosis. Por esta razón se incluyó un tratamiento adicional en el que no se aspiraba todo el medio de cultivo celular. No obstante, si no se aspira todo el medio de cultivo celular entonces algo del reportero secretado por las células después del cultivo de una noche contribuye a la exocitosis basal. Se usaron en este experimento las células que expresaban CHRM2 y granzima B del ejemplo n.º 12, pero se sembraron las células 16 horas antes del experimento a 5.000 células por pocillo de una placa de 384 pocillos con paredes negras en 20 μ l de medio de cultivo. Antes del experimento se realizaron tres tratamientos: (1) descartar los 20 μ l de medio sin lavar; (2) descartar solamente 15 μ l del medio de cultivo celular y (3) descartar solamente 15 μ l del medio de cultivo celular y lavar las células usando 75 μ l de Solución Salina Equilibrada de Hanks (HBSS) que contiene BSA al 0,1 % y aspiración de 75 μ l de tampón de lavado. La exocitosis se realizó en HBSS que contenía carbacol (un agonista del receptor CHRM2) a una concentración final 10 μ M. Para la exocitosis basal, se incluyó HBSS sin carbacol. Los pocillos para la secreción tanto basal como inducida por el agonista incluyeron FAM-SIEPDSGS-TAMRA a una concentración final 1 μ M como sustrato de granzima B humana tanto para la exocitosis como para la determinación de la actividad en el mismo pocillo. Las placas se incubaron a 37 °C en el lector de fluorescencia y se leyeron a 0, 15, 30, 45 y 60 minutos. Los resultados fueron los siguientes: (a) cuando todo el medio de cultivo se aspira de los pocillos no hay necesidad de realizar una etapa de lavado adicional de las células, ya que la actividad de la granzima B correspondiente a la exocitosis basal en los pocillos sin carbacol es baja y la señal con respecto al fondo es de 18 a 20 en 30 minutos; (b) cuando solamente se aspiran 15 μ l de medio de cultivo celular de los pocillos la actividad basal reduce la señal con respecto al fondo a 8-10 en 30 minutos; cuando solamente se aspiran 15 μ l de medio de cultivo celular y se incluye una etapa de lavado con 75 μ l de HBSS entonces la señal con respecto al fondo es similar al tratamiento en el que se aspira todo el medio de cultivo celular. Por lo tanto, si se aspira todo el medio de cultivo celular entonces no es necesaria una etapa de lavado y solamente es necesaria una única etapa antes del experimento (descartar el medio de cultivo celular). Si solamente se aspira una parte del medio del cultivo celular entonces es necesaria una etapa de lavado y son necesarias dos etapas antes del experimento (descartar el medio de cultivo celular y una etapa de lavado con una adición-descarte de tampón de lavado). Por lo tanto, podría desarrollarse un buen sensor por aspiración de todo el medio de cultivo celular o por aspiración de una cantidad fija y realizar una etapa de lavado adicional.

Ejemplo 14. Desarrollo de un sensor para medir más de una reacción por pocillo.

Este ejemplo se diseñó para ilustrar que los sensores de la presente invención pueden usarse para desarrollar reacciones múltiples, es decir, para medir más de una reacción en el mismo recipiente de reacción. El principio de las reacciones múltiples se ilustra en la Figura 5. Se transfectaron de forma estable células RBL2H3 con un par de un GPCR como modulador de exocitosis y una granzima como reportero almacenado en gránulos como se ha descrito en el ejemplo 9. Las combinaciones incluidas fueron: receptor de hIL8 (hIL8RA) y granzima A humana (Sensor A) y células que expresan CHRM2 y granzima B del ejemplo n.º 12 (Sensor B). Se usó IL8 humana como agonista de hIL8R mientras que se usó carbacol como agonista de CHRM2. El sustrato basado en FRET de la granzima A fue: FAM-EVANRSVSEK-TAMRA mientras que el sustrato basado en FRET de la granzima B fue FAM-

SIEPDSGS-TAMRA. Como ambos sustratos usan el mismo par de fluoróforo (FAM) e interruptor (TAMRA), solamente podría añadirse un sustrato al recipiente de reacción para la detección específica a 535 nm después de la excitación a 485 nm. En un primer experimento se descubrió que la actividad enzimática máxima de la granzima A humana secretada por el sensor A tras el tratamiento de IL8 fue aproximadamente el 40 por ciento de la actividad de la granzima B secretada por el sensor B tras el tratamiento de carbacol (datos no mostrados), por lo tanto, se mezclaron 12.500 células del sensor A con 5000 células del sensor B. Cada pocillo se ensayó por triplicado. Los sensores, agonistas y sustratos se mezclaron en un volumen total de 20 μ l de HBSS en una microplaca de 384 pocillos de pared negra y la microplaca se incubó a 37 grados Celsius en un fluorímetro de microplaca BMG-Labtech y se leyó a 0, 15, 30, 45 y 60 minutos. La señal con respecto al fondo después de 30 minutos de incubación a 37 grados Celsius se resume en la siguiente tabla. La condición 1 se seleccionó como señal con respecto al fondo de 1 para el sensor A y la condición 6 se seleccionó como señal con respecto al fondo de 1 para el sensor B porque hay diferentes liberaciones basales debido a la diferencia en el número total de células en el ensayo. Las condiciones 5 y 10 ilustran que puede combinarse más de un sensor en el mismo pocillo de reacción para producir un biosensor múltiple con buena relación de señal con respecto al fondo en cada canal. Por lo tanto, los resultados demuestran que pueden mezclarse al menos dos sensores en el mismo recipiente de reacción para producir un ensayo múltiple siempre que los reporteros liberados de los gránulos no tengan interferencia entre sí. Este ejemplo también demuestra que podrían mezclarse sensores con diferentes actividades máximas en diferentes proporciones para producir un sensor con señal equivalente en cada canal.

Condición	Células del Sensor A	IL8 (μ M)	Sustrato de granzima A (μ M)	Células del Sensor B	Carbacol (μ M)	Sustrato de granzima B (μ M)	Señal con respecto al fondo a los 30 min.
1	12500	0	1	0	0	0	1
2	12500	10	1	0	0	0	16
3	12500	0	1	5000	0	0	0,83
4	12500	0	1	5000	10	0	0,78
5	12500	10	1	5000	10	0	12,5
6	0	0	0	5000	0	1	1
7	0	0	0	5000	10	1	20
8	12500	0	0	5000	0	1	0,97
9	12500	10	0	5000	0	1	0,95
10	12500	10	0	5000	10	1	20

Ejemplo 15. Desarrollo de un sensor útil para receptores de superficie de tirosina quinasa.

Se clonó el receptor de superficie EGFR en un vector pcDNA3.1 modificado para expresar proteínas bajo el control del promotor quimérico hCMV-MoMLV-5'LTR con un péptido señal y un marcador de c-myc para la detección en superficie y/o separación. Dicho receptor de EGF se transfectó de forma estable en células RBL-2H3 y dichas células se transfectaron de forma estable con granzima B humana (reportero de la exocitosis) bajo el control del promotor quimérico hCMV-MoMLV-5'LTR. Se usaron células en suspensión a 5.000 células por pocillo en una placa de 384 pocillos en un volumen total de 20 μ l. Los pocillos para la secreción tanto basal como inducida por el agonista incluían FAM-SIEPDSGS-TAMRA a una concentración final 1 μ M como sustrato de la granzima B humana tanto para exocitosis como para la determinación de la actividad en el mismo pocillo. El agonista del receptor fue el Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF) y se usó a una concentración final de 10 μ M. Las placas se incubaron a 37 °C en el lector de fluorescencia y se leyeron a los 0, 15, 30, 45 y 60 minutos. Los resultados fueron los siguientes: el tratamiento con EGF indujo liberación específica fuerte de granzima B humana en comparación con las células no tratadas con EGF. La señal con respecto al fondo fue de 15 después de 45 minutos. Los resultados anteriores demuestran que los receptores de tirosina quinasa podrían usarse como moduladores de la exocitosis en los métodos de la presente invención y por lo tanto que los sensores de la presente invención pueden aplicarse para ensayar la interacción entre receptores de tirosina quinasa y sus ligandos.

Ejemplo 16. Usos del sensor para ensayar las interacciones de IgE-alérgeno.

Este ejemplo describe el uso del sensor para ensayar moduladores de la exocitosis de los gránulos de mastocitos

ampliamente usados para encontrar nuevos compuestos antialérgicos como se ilustra en la figura 1. Se transfectaron de forma estable RBL2H3 con granzima B humana bajo el control del promotor quimérico hCMV-MoLV5'LTR como se ha descrito en el ejemplo 3. Se purificó un anticuerpo monoclonal IgE de ratón contra hapteno de trinitrofenilo a partir del hibridoma IgELb4 obtenido de ATCC (TIB-141). Se obtuvo TNP-N-hidroxisuccinimida éster de Biosearch Technologies Inc y se conjugó con seroalbúmina bovina (BSA) usando un protocolo convencional. La conjugación se determinó a pH 7,0 midiendo la absorbancia de TNP a 348 nm usando 15400 unidades por mol por cada 10 mm de longitud del pase de la luz como el coeficiente de extinción de TNP. La relación molar de TNP con respecto a BSA en el conjugado de TNP-BSA se calculó suponiendo que el peso molecular de BSA es 60000. Se cultivaron las células sensoras como células adherentes durante 48 horas en placas de 6 pocillos y después se lavaron con HBSS y se recogieron por pipeteo. Se marcaron 500.000 células con IgE anti TNP a 1 µg/ml en HBSS durante 60 minutos a 37 grados Celsius, se lavaron con 10 ml de HBSS, se centrifugaron y se resuspendió el sedimento en 1 ml de HBSS. En una placa de 384 pocillos de pared negra se añadieron 10 µl de diluciones seriadas de TNP-BSA en HBSS que contenían cada una el sustrato de la granzima B basado en FRET FAM-Ser-Ile-Glu-Pro-Asp-Ser-Gly-Ser-TAMRA (FAM SIEPDSGS-TAMRA) a una concentración final de 1 µM, cuya escisión se detectó por fluorescencia usando excitación a 485 nm y emisión a 535 nm. Las diluciones de TNP-BSA ensayadas fueron: 1 µg/ml, 1 ng/ml, 1 pg/ml y 1 fg/ml. A cada pocillo se añadieron 10 µl (5000 células) de células marcadas con IgE anti-TNP y las placas se incubaron a 37 grados Celsius en un fluorímetro de microplaca BMG-Labtech. La microplaca se leyó a los 0, 15, 30, 45 y 60 minutos. Se incluyeron los siguientes controles: (1) pocillos con células marcadas con IgE anti-TNP más sustrato de granzima B pero sin TNP-BSA; (2) pocillos con células no marcadas más sustrato de granzima B y TNP-BSA a 1 µg/ml; (3) pocillos con sustrato de granzima B y TNP-BSA a 1 µg/ml pero sin células. Cada pocillo se incluyó por triplicado. Los resultados después de 30 minutos de incubación a 37 grados Celsius se resumen en la siguiente tabla:

Células RBL2H3-hGB	IgE anti-TNP	Cantidad de TNP-BSA	Sustrato de granzima B basado en FRET	Fluorescencia después de 30 minutos a 37 °C
5000	Sí	1 ug/ml	1 uM	30942
5000	Sí	1ng/ml	1 uM	34556
5000	Sí	1 pg/ml	1 uM	35884
5000	Sí	1 fg/ml	1 uM	29826
5000	Sí	0	1 uM	2872
5000	No	1 ug/ml	1 uM	2935
0	Sí	1 ug/ml	1 uM	1535

Los resultados anteriores indican que el sensor desarrollado en los métodos de la presente invención es altamente sensible para la detección de alérgenos como el alérgeno de modelo TNP-BSA usado en este ejemplo, ya que la señal se satura incluso a 1 fg/ml. Diluyendo adicionalmente TNP-BSA se descubrió que el límite de detección para TNP-BSA era de 0,1 ag/ml, es decir 10^{-19} g/ml lo que probablemente hace a este sensor el más sensible desarrollado hasta la fecha (datos no mostrados). Por lo tanto, puede usarse el sensor de la presente invención para detección de alérgenos altamente sensibles y para ensayar moduladores de exocitosis de gránulos de mastocitos ampliamente usados para encontrar nuevos compuestos anti alérgicos.

LISTADO DE SECUENCIAS

	<110> Canvax Biotech SL	
5	<120> Nuevos sensores basados en células ultrasensibles y usos de los mismos	
	<130> AX100076WO	
	<160> 90	
10	<170> Patent In version 3.3	
	<210> 1	
15	<211> 1205	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
20	<223> Promotor del factor de elongación 1 alfa humano	
	<400> 1	
	ttgctgactt gcgtgaggct ccggtgcccg tcagtgggca gagcgacat cggccacagt	60
	ccccgagaag ttgggggggag gggtcggcaa ttgaaccggt gcctagagaa ggtggcgcg	120
	ggtaaaactgg gaaagtgatg tcgtgtactg gctccgcctt tttcccgagg gtgggggaga	180
	accgtatata agtgcagtag tcgccgtgaa cgttcttttt cgcaacgggt ttgccgccag	240
	aacacaggta agtgccgtgt gtggttcccg cgggcctggc ctctttacgg gttatggccc	300
	ttgcgtgcct tgaattactt ccacgccct ggctgcagta cgtgattctt gatcccgagc	360
	ttcgggttg aagtgggtgg gagagtgcga ggccttgcgc ttaaggagcc ccttcgcctc	420
	gtgcttgagt tgaggcctgg cctgggcgct ggggccgccc cgtgcgaatc tgggtggacc	480
	ttcgcgcctg tctcgtgctt ttcgataagt ctctagccat ttaaaatttt tgatgacctg	540
	ctgcgacgct ttttttctgg caagatagtc ttgtaaagtc gggccaagat ctgcacactg	600
	gtatttcggt ttttggggcc gcggggcgcg acggggcccc tgcgctccag cgcacatgtt	660
	cggcgaggcg gggcctgcga gcgcggccac cgagaatcgg acgggggtag tctcaagctg	720
	gccggcctgc tctggtgctt ggctcgcgc cgcctgttat cggcccgccc tgggcggcaa	780
	ggctggcccc gtgcgcacca gttgcgtgag cgaaaagatg gccgcttccc ggccctgctg	840
	cagggagctc aaaatggagg acgcggcgct cgggagagcg ggcgggtgag tcacccacac	900
	aaaggaaaag ggcctttccg tcctcagccg tcgcttcatg tgactccacg gactaccggg	960
	cgcctccag gcacctcgat tagttctcga gcttttgag tacgtcgtct ttaggttggg	1020
	gggaggggtt ttatgcgatg gagtttcccc aactgagtg ggtggagact gaagttaggc	1080
	cagcttgga cttgatgtaa ttctccttgg aatttgccct ttttgagttt ggatcttgg	1140
	tcattctcaa gcctcagaca gtggttcaaa gttttttctt tccatttcag gtgtcgtgct	1200
	agctt	1205
25	<210> 2	
	<211> 428	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	

ES 2 577 607 T3

<220>

<223> Promotor de virus de sarcoma de Rous

<400> 2

5

```
cgacctcatg gctgcgcccc gacacccgcc aacacccgct gacgcctgac gggettgtct      60
gctcccggca tccgcttaca gacaagctgt gaccgtctcc gggagctgca tgtgtcagag      120
gttttcaccg tcattcaccga aacgcgcgag gcagccggat cataatcagc cataccacat      180
ttgtagaggt tttacttgct ttaaaaaacc tcccacacct cccctgaac ctgaaacata      240
aatgaatgc aattgttggt gttaacttgt ttattgcagc ttataatggt taaaaataaa      300
gcaatagcat cacaaatttc acaataaaag catttttttc actgcattct agttgtggtt      360
tgtccaaact catcaatgta tcttatcatg tctggatccg gccttgccgg cctcgagcgg      420
ccgctagc                                     428
```

<210> 3

<211> 479

<212> ADN

<213> Artificial

10

<220>

<223> Promotor MoMLV-5'LTR

15

<400> 3

```
agtctccaga aaaagggggg aatgaaagac cccacctgta ggtttgcaa gctagcttaa      60
gtaacgccat ttgcaaggc atggaataat acataactga gaatagagaa gttcagatca      120
aggtcaggaa cagatggaac agctgaatat gggccaaaca ggatatctgt ggtaagcagt      180
tcctgccccg gctcagggcc aagaacagat ggaacagctg aatatgggcc aaacaggata      240
tctgtggtta gcagttcttg ccccggtctc gggccaagaa cagatggtcc ccagatgcgg      300
tccagccctc agcagtttct agagaacctc cagatgttct cagggtgccc caaggacctg      360
aaatgacctt gtgccttatt tgaactaacc aatcagttcg cttctcgctt ctgttcgcgc      420
gcttctgctc cccgagctca ataaaagagc ccacaacccc tactcgggg cgccagtcc      479
```

20

<210> 4

<211> 36

<212> ADN

<213> Artificial

25

<220>

<223> Señal de glicosilación viral

<400> 4

ctgagcaciaa tggccccagg ctccaccgtg ggaaca 36

30

<210> 5

<211> 5348

<212> ADN

<213> Artificial

35

<220>

<223> Vector con la estructura PMo-MLV-5'LTR-SP-cmyc-VGS-MCS-poliA

<400> 5

gacggatcgg gagatctccc gatccctat ggtgcaactct cagtacaatc tgctctgatg	60
ccgcatagtt aagccagtat ctgctccctg cttgtgtgtt ggaggtcgt gagtagtgcg	120
cgagcaaaat ttaagctaca acaaggcaag gcttgaccga caattgcatg aagaatctgc	180
ttagggttag gcgttttgcg ctgcttcgtg atatcgaatt cagtctccag aaaaaggggg	240
gaatgaaaga cccacactgt aggtttggca agctagctta agtaacgcca ttttgcaagg	300
catggaaaaa tacataactg agaatagaga agttcagatc aaggtcagga acagatggaa	360
cagctgaata tgggccaaac aggatatctg tggtaaagcag ttcttgcccc ggctcagggc	420
caagaacaga tggaacagct gaatatgggc caaacaggat atctgtggta agcagttcct	480
gccccggctc agggccaaga acagatggtc cccagatgcg gtccagccct cagcagtttc	540
tagagaacca tcagatgttt ccagggtgcc ccaaggacct gaaatgacct tgtgccttat	600
ttgaactaac caatcagttc gcttctcgct tctgttcgcg cgcttctgct ccccgagctc	660
aataaaagag ccacacaacc ctcaactcggg gcgccagtc aagcttggtta ccgagctcgg	720
atcgatcatg gagacagaca cactcctgct atgggtactg ctgctctggg ttccaggttc	780
caccggtgac gaacaaaaac tcattctcaga agaggatctg gggccatcgc gactgagcac	840
aatggcccca ggctccaccg tgggaacact cgagggatcc gcggccgctc tagagggccc	900
tattctatag tgtcacctaa atgctagagc tcgctgatca gcctcgactg tgcttctag	960
ttgccagcca tctgttggtt gccctcccc cgtgccttcc ttgaccttg aaggtgccac	1020
tcccactgtc ctttcctaat aaaatgagga aattgcatcg cattgtctga gtaggtgtca	1080
ttctattctg gggggtgggg tggggcagga cagcaagggg gaggattggg aagacaatag	1140
caggcatgct ggggatgcgg tgggctctat ggcttctgag gcggaaagaa ccagctgggg	1200
ctctaggggg tatccccacg cgcctgtag cggcgcatca agcgcggcgg gtgtgggtgt	1260
taocgcgacg gtgaccgcta cacttgccag cgcctagcg cccgctcctt tgccttctt	1320
cccttcttt ctcgcacgt tcgcgggtt tccccgtcaa gctctaaatc gggggctccc	1380
tttaggggtc cgatttagtg ctttacggca cctcgacccc aaaaaacttg attaggtgga	1440
tggttcacgt agtgggcat cgcctgata gacggttttt cgcctttga cgttggagtc	1500
cacgttcttt aatagtggac tcttgttcca aactggaaca acactcaacc ctatctcgg	1560

ctattctttt gatttataag ggattttgcc gatttcggcc tattgggttaa aaaatgagct 1620
 gatttaacaa aaatttaacg cgaattaatt ctgtggaatg tgtgtcagtt aggggtgtgga 1680
 aagtcctcag gctccccagc aggcagaagt atgcaaagca tgcattctca ttagtcagca 1740
 accaggtgtg gaaagtcccc aggcctccca gcaggcagaa gtatgcaaag catgcatctc 1800
 aattagtcag caaccatagt cccgccccta actccgcca tcccgccct aactccgccc 1860
 agttccgccc attctccgcc ccatggctga ctaatttttt ttatttatgc agaggccgag 1920
 gccgcctctg cctctgagct attccagaag tagtgaggag gcttttttgg aggcctaggc 1980
 ttttgcaaaa agctcccggg agcttgata tccatttttc gatctgatca agagacagga 2040
 tgaggatcgt ttgcgatgat tgaacaagat ggattgcaag caggttctcc ggccgcttgg 2100
 gtggagaggc tattcggtta tgactgggca caacagacaa tcggctgtct tgatgccgcc 2160
 gtgttcggc tgtcagcgca ggggcgccc gttctttttg tcaagaccga cctgtccggt 2220
 gccctgaatg aactgcagga cgaggcagcg cggctatcgt ggctggccac gacgggcgtt 2280
 ccttgcgag ctgtgctga cgttgctact gaagcgggaa gggactggct gctattgggc 2340
 gaagtgcggg ggcaggatct cctgtcatct caccttgctc ctgccgagaa agtatccatc 2400
 atggctgatg caatgcggcg gctgcatacg cttgatccgg ctacctgcc attcgaccac 2460
 caagcgaac atcgatcga gcgagcacgt actcgatgg aagccggtct tgcgatcag 2520
 gatgatctgg acgaagagca tcaggggctc gcgccagccg aactgttcgc caggctcaag 2580
 gcgcgatgc ccgacggcga ggatctctc gtgacccatg gcgatgcctg cttgccgaat 2640
 atcatgggtg aaaatggccg cttttctgga ttcatcgact gtggccggct ggggtgtggc 2700
 gaccgctatc aggacatagc gttggctacc cgtgatattg ctgaagagct tggcggcgaa 2760
 tgggctgacc gcttcctcgt gctttacggg atcgccgctc ccgattcgca gcgcacgcc 2820
 ttctatcgcc ttcttgacga gttctttctga gcgggactct ggggttcgaa atgaccgacc 2880
 aagcgacgcc caacctgcca tcacgagatt tcgattccac cgcgccttc tatgaaaggt 2940
 tgggcttcgg aatcgtttcc cgggacgccg gctggatgat cctccagcgc ggggatctca 3000
 tgctggagtt cttcgcccac cccaacttgt ttattgcagc ttataatggt taaaaataaa 3060
 gcaatagcat caaaaatttc aaaaataaag catttttttc actgcattct agttgtgggt 3120
 tgtccaaact catcaatgta tcttatcatg tctgtatacc gtcgacctct agctagagct 3180
 tggcgtaatc atggatcatg ctgtttcctg tgtgaaattg ttatccgctc acaattccac 3240
 acaacatacg agccggaagc ataaagtgt aagcctgggg tgccaatga gtgagctaac 3300
 tcacattaat tgcggtgcgc tcaactgccc ctttccagtc gggaaacctg tcgtgccagc 3360
 tgcattaatg aatcgcccaa cgcgcgggga gaggcggttt gcgtattggg cgctcttcgc 3420
 cttcctcgt cactgaactc ctgcgctcgg tcgttcggct gcggcgagcg gtatcagctc 3480

actcaaaggc ggtaaacggt ttatccacag aatcagggga taacgcagga aagaacatgt 3540
gagcaaaagg ccagcaaaag gccaggaacc gtaaaaaggc cgcgttgctg gcgtttttcc 3600
ataggctccg cccccctgac gagcatcaca aaaatcgacg ctcaagtcag aggtggcgaa 3660
acccgacagg actataaaga taccaggcgt ttccccctgg aagctccctc gtgcgctctc 3720
ctgttccgac cctgcgcgtt accggatacc tgtccgcctt tctcccttcg ggaagcgtgg 3780
cgcttttctca tagctcacgc tgtaggtatc tcagttcggg gtaggtcgtt cgctccaagc 3840
tggtgtgtgt gcacgaaccc ccggttcagc ccgaccgctg cgccttatcc ggtaactatc 3900
gtcttgagtc caaccggta agacacgact tatcgccact ggcagcagcc actggtaaca 3960
ggattagcag agcgaggtat gtaggcgggt 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 actcacgtta agggattttg gtcattgagat 4260
tatcaaaaag gatcttcacc tagatccttt taaattaaaa atgaagtttt aaatcaatct 4320
aaagtatata tgagtaaact tggctctgaca gttaccaatg cttaatcagt gaggcaccta 4380
tctcagcgat ctgtctatct cgttcattcca tagttgcctg actccccgtc gtgtagataa 4440
ctacgatacg ggagggtta ccatctggcc ccagtgcctg aatgataccg cgagacccac 4500
gctcaccggc tccagattta tcagcaataa accagccagc cggaaggggc gagcgagaa 4560
gtggtcctgc aactttatcc gcctccatcc agtctattaa ttgttgccgg gaagctagag 4620
taagttagtc gccagttaat agtttgogca acgttggtgc cattgctaca ggcattcgtg 4680
tgtaacgctc gtcgttttgt atggcttcac tcagctccgg ttcccaacga tcaaggcgag 4740
ttacatgac ccccatgttg tgcaaaaaag cggttagctc cttcgggtcct ccgatcgttg 4800
tcagaagtaa gttggccgca gtgttatcac tcatggttat ggcagcactg cataattctc 4860
ttactgtcat gccatccgta agatgctttt ctgtgactgg tgagtactca accaagtcac 4920
tctgagaata gtgtatgcgg cgaccgagtt gctcttgccc ggcgtcaata cgggataata 4980
ccgcgccaca tagcagaact ttaaaagtgc tcatcattgg aaaacgttct tcggggcgaa 5040
aactctcaag gatcttaccg ctgttgagat ccagttcgat gtaaccact cgtgcaccca 5100
actgatcttc agcatctttt actttcacca gcgtttctgg gtgagcaaaa acaggaaggc 5160
aaaatgccgc aaaaaaggga ataaggcgca cacggaaatg ttgaatactc atactcttcc 5220
tttttcaata ttattgaagc atttatcagg gttattgtct catgagcgga tacatatttg 5280
aatgtattta gaaaaataaa caaatagggg ttccgcgcac atttccccga aaagtgccac 5340

ctgacgtc 5348

<210> 6
<211> 790
<212> ADN
<213> Artificial

<220>

<223> Promotor fosfoglicerato quinasa humana

<400> 6

5

```

agatctcccg atcccctatg gtgcactctc agtacaatct gctctgatgc cgcatagtta      60
agccagtata tgcctccctgc ttgtgtgttg gaggtcgctg agtagtgogc gagcaaaatt      120
taagctacaa caaggcaagg cttgaccgac aattgcatga agaactctgct tagggttagg      180
cgtttttgogc tgccttcgca tgtacggggc agatatacgc gttgacattg attattgact      240
agagtcatat ctgttttgat ccaaccgggt agggggaggcg cttttcccaa ggcagtctgg      300
agcatgcgct ttagcagccc cgctggggcac ttggcgctac acaagtggcc tctggcctcg      360
cacacattcc acatccaccg gtagggcgca accggctccg ttctttgggtg gcccttcgc      420
gccaccttct actcctcccc tagtcaggaa gtccccccc gccccgcagc tcgcgtcggtg      480
caggacgtga caaatggaag tagcacgtct cactagtctc gtgcagatgg acagcaccgc      540
tgagcaatgg aagcgggtag gcctttgggg cagcggccaa tagcagcttt gtccttcgc      600
tttctgggct cagaggctgg gaaggggtgg gtccgggggc gggctcaggg gcgggctcag      660
gggcggggcg ggcgcccga ggtcctccgg aggccgggca ttctgcacgc ttcaaaagcg      720
cacgtctgcc gcgctgtcct cctcttctc atctcgggct cgagtaggaa ttatctgcgg      780
cctagctagc                                     790

```

<210> 7

<211> 182

<212> ADN

<213> Artificial

10

<220>

<223> Promotor timidina quinasa

15

<400> 7

```

gggtgtcccg qaagaaatat atttgcattg ctttagttct atgatgacac aaaccccgcc      60
cagcgtcttg tcattggcga attcgaacac gcagatgcag tcggggcggc gcggctccgag      120
gtccacttcg catattaagg tgacgcgtgt ggcctcgaac accgagcgac cctgcagcga      180
cc                                     182

```

20

<210> 8

<211> 589

<212> ADN

<213> Artificial

25

<220>

<223> Promotor inmediato temprano de citomegalovirus humano

<400> 8

ES 2 577 607 T3

```

tagttattaa tagtaatcaa ttacgggggc attagttcat agcccatata tggagttccg      60
cgttacataa cttacggtaa atggcccgcc tggctgaccg cccaacgacc cccgcccatt      120
gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt aacgccaata gggactttcc attgacgtca      180
atgggtggag tatttacggg aaactgccca cttggcagta catcaagtgt atcatatgcc      240
aagtacgccc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt atgccagta      300
catgacctta tgggactttc ctacttggca gtacatctac gtattagtca tcgctattac      360
catggtgatg cggttttggc agtacatcaa tgggcgtgga tagcggtttg actcacgggg      420
atttccaagt ctccacccca ttgacgtcaa tgggagtttg ttttggcacc aaaatcaacg      480
ggactttcca aaatgtcgta acaactccgc ccattgacg caaatgggcg gtaggcgtgt      540
acggtgggag gtctatataa gcagagctgg tttagtgaac cgtcagatc      589

```

<210> 9
 <211> 1092
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Granzima B de caballo con codones optimizados

<400> 9

```

ggatccaccg gtcgccacca tgcaaccgat actcctgctg ctgcgttttc tccgtctccc      60
tcgtgctgac gccggcgaga ttatcggggg acacgaagct aggccacata gcagacccta      120
catggccctg gtgcaatttc tggtcgagga aaagaaacat cggtgcggtg gtgtgctggt      180
ccgccaggat ttcgtcctga ccgcagctca ttgttggggg agctccttca aggtgacact      240
cggtgcccac gacattgaga aacaggagac tacacaacag aacttctcag tgaaagcagc      300
tatccctcat ccggatccac cggtcgccac catgcaaccg atactcctgc tgctcgcttt      360
tctcctgctc cctcgtgctg acgccggcga gattatcggg ggacacgaag ctaggccaca      420
tagcagaccc tacatggccc tggtgcaatt tctggtcgag gaaaagaaac atcgggtgcgg      480
tgggtgtgctg gtccgccagg atttcgtcct gaccgcagct cattgttggg gtagctcctt      540
caaggtgaca ctcggtgccc acgacattga gaaacaggag actacacaac agaacttctc      600
agtgaagca gctatccctc atccagatta taatcccaag aactacagta atgacattat      660
gctgctgaag ctggagcgaa aagctaagct cacagtcgca gtcaggactc tgagcctgcc      720
tcgggcaaaa gcccaagttc gaccacgaca agtgtgccgg gttgccgggt ggggcagggt      780
gtccctgatg gggcttttta gtgataccct ccaagaggtc gaactgaccg tgcagcaaga      840
ccgggaatgt gagagttatc tgcgcaacta ctataattcc acaactcagc tgtgcgtggg      900
agatcccaag gaaaagaaat ctagttttaa gggcgactcc gggggccctc tgggtctgtaa      960
gaacgtgatc cagggaattg tcagttacgg cagaaataac ggtactccac ccagggcttt      1020
tactaagggtg tcaagcttcc tgccctggat caaaaagacc atgaaatctc tgtgatagta      1080
agatctgaat tc      1092

```

<210> 10
 <211> 767
 <212> ADN
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Promotor quimérico hCMV-MoMLV-5'LTR

10

<400> 10

```

actagttatt aatagtaatc aattacgggg tcattagtgc atagcccata tatggagttc      60
cgcggttacat aacttacggt aaatggcccg cctggctgac cgcccaacga ccccgcccca      120
ttgacgtcaa taatgacgta tgttcccata gtaacgcaa tagggacttt ccattgacgt      180
caatgggtgg agtatttacg gtaaactgcc cacttggcag tacatcaagt gtatcatatg      240
ccaagtacgc cccctattga cgtcaatgac ggtaaatggc ccgcctggca ttatgccag      300
tacatgacct tatgggactt tctacttgg cagtacatct agtattagtc atcgctatta      360
ccatgggtgat gcggttttgg cagtacatca atgggcgtgg atagcggttt gactcacggg      420
gatttccaag tctccacccc attgacgtca atgggagttt gttttggcac caaaatcaac      480
gggactttcc aaaatgtcgt aacaactccg cccatttga cgcaaatggg gcggtaggcg      540
tgtacggtgg ggaggtctat ataagcagag ctcaataaaa gagcccacaa ccttctactc      600
ggcgcgccag tctccgatt gactgagtcg cccgggtacc cgtgtatcca ataaaccctc      660
ttgcagttgc atccgacttg tgggtctcgt gttccttggg agggctctct ctgagtgatt      720
gactaccggt cagcgggggt ctttcatttg ggggctcgtc cgggatac      767
    
```

<210> 11
 <211> 249
 <212> PRT
 <213> Artificial

15

<220>
 <223> Procaspasa 3 humana desde Serina29 a histidina277 sin autoactivación

20

<400> 11

```

Ser Gly Ile Ser Leu Asp Asn Ser Tyr Lys Met Asp Tyr Pro Glu Met
1           5           10           15

Gly Leu Cys Ile Ile Ile Asn Asn Lys Asn Phe His Lys Ser Thr Gly
    
```

ES 2 577 607 T3

	20		25		30										
Met	Thr	Ser	Arg	Ser	Gly	Thr	Asp	Val	Asp	Ala	Ala	Asn	Leu	Arg	Glu
		35					40					45			
Thr	Phe	Arg	Asn	Leu	Lys	Tyr	Glu	Val	Arg	Asn	Lys	Asn	Asp	Leu	Thr
	50					55					60				
Arg	Glu	Glu	Ile	Val	Glu	Leu	Met	Arg	Asp	Val	Ser	Lys	Glu	Asp	His
65					70					75					80
Ser	Lys	Arg	Ser	Ser	Phe	Val	Cys	Val	Leu	Leu	Ser	His	Gly	Glu	Glu
				85					90					95	
Gly	Ile	Ile	Phe	Gly	Thr	Asn	Gly	Pro	Val	Asp	Leu	Lys	Lys	Ile	Thr
			100					105					110		
Asn	Phe	Phe	Arg	Gly	Asp	Arg	Cys	Arg	Ser	Leu	Thr	Gly	Lys	Pro	Lys
		115					120					125			
Leu	Phe	Ile	Ile	Gln	Ala	Cys	Arg	Gly	Thr	Glu	Leu	Asp	Cys	Gly	Ile
	130					135					140				
Glu	Pro	Asp	Val	Leu	Met	Glu	Asp	Asp	Met	Ala	Cys	His	Lys	Ile	Pro
145					150					155					160
Val	Glu	Ala	Asp	Phe	Leu	Tyr	Ala	Tyr	Ser	Thr	Ala	Pro	Gly	Tyr	Tyr
				165					170					175	
Ser	Trp	Arg	Asn	Ser	Lys	Asp	Gly	Ser	Trp	Phe	Ile	Gln	Ser	Leu	Cys
			180					185					190		
Ala	Met	Leu	Lys	Gln	Tyr	Ala	Asp	Lys	Leu	Glu	Phe	Met	His	Ile	Leu
		195					200					205			
Thr	Arg	Val	Asn	Arg	Lys	Val	Ala	Thr	Glu	Phe	Glu	Ser	Phe	Ser	Phe
	210					215					220				
Asp	Ala	Thr	Phe	His	Ala	Lys	Lys	Gln	Ile	Pro	Cys	Ile	Val	Ser	Met
225					230					235					240
Leu	Thr	Lys	Glu	Leu	Tyr	Phe	Tyr	His							
				245											

<210> 12
 <211> 1432
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Secuencia IRES-NGFR

<400> 12

ES 2 577 607 T3

ccgccccctct cccctcccccc cccctaacgt tactggccga agccgcttgg aataaggccg 60
 gtgtgcgttt gtctatatgt tattttccac catattgccg tcttttggca atgtgagggc 120
 ccggaacctt ggccctgtct tcttgacgag cattcctagg ggtctttccc ctctcgccaa 180
 aggaatgcaa ggtctgttga atgtcgtgaa ggaagcagtt cctctggaag cttcttgaag 240
 acaacaacg tctgtagcga ccctttgcag gcagcggaac ccccccactg gcgacaggtg 300
 cctctgcggc caaaaagccac gtgtataaga tacacctgca aaggcggaac aaccccagtg 360
 ccacgttgtg agttggatag ttgtggaaag agtcaaattg ctctcctcaa gcgtattcaa 420
 caaggggctg aaggatgccc agaaggtacc ccattgtatg ggatctgacg tggggcctcg 480
 gtacacatgc tttacatgtg tttagtcgag gttaaaaaaa cgtctaggcc ccccgaaaca 540
 cggggacgtg gttttccttt gaaaaacacg atgataatat ggccacaacc atgggggcag 600
 gtgccaccgg ccgcgcgatg gacggggcgc gcctgctgct gtgtctgctt ctgggggtgt 660
 cccttgaggg tgccaaggag gcatgcccc aaggcctgta cacacacagc ggtgagtgt 720
 gcaaagcctg caacctgggc gaggggtgtg cccagccttg tggagccaac cagaccgtgt 780
 gtgagccctg cctggacagc gtgacgttct ccgacgtggt gagcgcgacc gagccgtgca 840
 agccgtgcac cgagtgcgtg gggctccaga gcatgtcggc gccgtgcgtg gaggccgacg 900
 acgccgtgtg ccgctgcgcc tacggctact accaggatga gacgactggg cgctgcgagg 960
 cgtgccgctg gtgcgaggcg ggctcggggc tcgtgttctc ctgccaggac aagcagaaca 1020
 ccgtgtgcga ggagtgtccc gacggcacgt attccgacga ggccaaccac gtggaccctg 1080
 gcctgccctg caccgtgtgc gaggacaccg agcgcagct ccgcgagtgc acacgctggg 1140
 ccgacgccga gtgcgaggag atccctggcc gttggattac acggtccaca ccccagagg 1200
 gctcggacag cacagccccc agcaccagc agcctgaggc acctccagaa caagacctca 1260
 tagccagcac ggtggcaggt gtggtgacca cagtgatggg cagctcccag cccgtggtga 1320
 cccgaggcac caccgacaac ctcatccctg tctattgctc catcctggct gctgttggtt 1380
 gtgggccttg tggcctacat agccttcaag aggtggacag ggggattctc ta 1432

<210> 13
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador con sentido

<400> 13
 gttacatgt tctggaatat cctggacaa cag 33

<210> 14
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador antisentido

<400> 14
 gttctgctg aggtgataga aatagagttc tttgtga

38

5
 <210> 15
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador con sentido
 <400> 15
 tttctcgag agcagccaca atgaggaact 30
 <210> 16
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador antisentido
 <400> 16
 gtgcggccgc ttaactgctc ccttgatagt cataatt 37
 <210> 17
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador con sentido
 <400> 17
 gatactcgag ggcagccttc ctgagaagat g 31
 <210> 18
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador antisentido
 <400> 18
 gttgtgcgg ccgcttagta gcgtttcatg gttttctt 38
 <210> 19
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador con sentido
 <400> 19
 tttctcgag ccttcaggg aagatgaagc t 31
 <210> 20
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador antisentido
 <400> 20
 tttgcggcc gctagttagc tcttttcat agtttc 37

5 <210> 21
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador con sentido
 10 <400> 21
 gttgttctcg agatgcaacc gatactctg ctg 33
 <210> 22
 <211> 39
 <212> ADN
 15 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador antisentido
 20 <400> 22
 tttgcggcc gctcagagag attcatggt cttttgat 39
 <210> 23
 <211> 31
 25 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador con sentido
 30 <400> 23
 gttactcgag atgaagtcac tgagcctgct c 31
 <210> 24
 <211> 38
 35 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador antisentido
 40 <400> 24
 gttgttgcgg ccgcttagtg gcgtttcatg gttttctt 38
 45 <210> 25
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Artificial
 50 <220>
 <223> Cebador con sentido
 <400> 25
 gttgttctcg agatgcagcc gatcctcctg ctgctc 36
 55 <210> 26
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Artificial
 60 <220>
 <223> Cebador antisentido
 <400> 26
 65 tttgcggcc gctcacacac taccttgacg ttata 36

5	<210> 27	
	<211> 31	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
10	<223> Cebador con sentido	
	<400> 27	
	ttatctcgag gagaaaatgc agccattcct c 31	
	<210> 28	
	<211> 33	
15	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador antisentido	
	<400> 28	
20	ttttgcggcc gcttagaggc gcttcattgt tct 33	
	<210> 29	
	<211> 35	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
25	<220>	
	<223> Cebador con sentido	
	<400> 29	
	ttatctcgag aatatgacta agttttcttc ctttt 35	
	<210> 30	
30	<211> 33	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador antisentido	
35	<400> 30	
	ttttgcggcc gcttaatttg tatgaggcgg gac 33	
	<210> 31	
	<211> 30	
	<212> ADN	
40	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador con sentido	
	<400> 31	
	ttttctcgag agcgccatgg aggcctgcgt	30
45	<210> 32	
	<211> 33	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
50	<223> Cebador antisentido	
	<400> 32	
	ttttgcggcc gccatcacc cagggcacatca ggc 33	
	<210> 33	
	<211> 33	
55	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador antisentido	
	<400> 32	
60	ttttgcggcc gccatcacc cagggcacatca ggc 33	
	<210> 33	
	<211> 33	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
65	<220>	
	<223> Cebador antisentido	
	<400> 32	
	ttttgcggcc gccatcacc cagggcacatca ggc 33	
	<210> 33	

<211> 31
 <212> ADN
 <213> Artificial
 5 <220>
 <223> Cebador con sentido
 <400> 33
 ttttctcgag atgcaaccga tactcctgct c 31
 10 <210> 34
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Artificial
 15 <220>
 <223> Cebador antisentido
 <400> 34
 20 ttttgccgcc gcttagcggt tatcttcag agtttt 36
 <210> 35
 <211> 32
 <212> ADN
 25 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador con sentido
 30 <400> 35
 ttttctcgag tggccccctc tagagcttca at 32
 <210> 36
 <211> 34
 35 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador antisentido
 40 <400> 36
 ttttgccgcc gcttggttca atgctgttt aatt 34
 <210> 37
 <211> 30
 45 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 50 <223> Cebador con sentido
 <400> 37
 gaagctcgag cccaacaaca gcactgctct 30
 55 <210> 38
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Artificial
 60 <220>
 <223> Cebador antisentido
 <400> 38
 65 gatggccgcc gctaactact cagaatttt ctcaatg 37
 <210> 39

<211> 29
 <212> ADN
 <213> Artificial
 5 <220>
 <223> Cebador con sentido
 <400> 39
 acgcctcgag ggatccctgc agccggacg 29
 10 <210> 40
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Artificial
 15 <220>
 <223> Cebador antisentido
 <400> 40
 20 ttctgcggcc gctcacacga tccgttct gtcccc 36
 <210> 41
 <211> 29
 <212> ADN
 25 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador con sentido
 30 <400> 41
 aactctcgag gggcaaccag ggaacggca 29
 <210> 42
 <211> 34
 35 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador antisentido
 40 <400> 42
 cttgcggcc gcttacagca gtgagtcatt tgta 34
 <210> 43
 <211> 34
 45 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 50 <223> Cebador con sentido
 <400> 43
 aatagcctcg agattctcaa ctcttctact gaag 34
 55 <210> 44
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Artificial
 60 <220>
 <223> Cebador antisentido
 <400> 44
 gatgatgcgg ccgctcactc aacctcaaaa catgg 35
 65 <210> 45

	<211> 29	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
5	<220>	
	<223> Cebador con sentido	
	<400> 45	
10	ttatctcgag ctcatggcgt ccaccactt	29
	<210> 46	
	<211> 32	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
15	<220>	
	<223> Cebador antisentido	
	<400> 46	
20	tttagcggcc gctcacgatg aaggtgcctt gg 32	
	<210> 47	
	<211> 31	
	<212> ADN	
25	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador con sentido	
30	<400> 47	
	gtatctcgag gaccagttcc ctgaatcagt g	31
	<210> 48	
	<211> 33	
35	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador antisentido	
40	<400> 48	
	atcagcggcc gcttcagaga aggagcaatg cat 33	
	<210> 49	
45	<211> 31	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
50	<223> Cebador con sentido	
	<400> 49	
	gtacctcgag gatgtggttg acagccttct t 31	
55	<210> 50	
	<211> 35	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
60	<220>	
	<223> Cebador antisentido	
	<400> 50	
65	gttggtgcgg ccgctcactg gggtgggacc gaggc 35	
	<210> 51	

	<211> 31	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
5	<220>	
	<223> Cebador con sentido	
	<400> 51	
10	ttttctcgag aacacttcag cccacacgtc t 31	
	<210> 52	
	<211> 40	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
15	<220>	
	<223> Cebador antisentido	
	<400> 52	
20	ttttgaattc gcggccgctc agcattgacg agagggagtg	40
	<210> 53	
	<211> 34	
	<212> ADN	
25	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador con sentido	
30	<400> 53	
	ctcactcgag aataactcaa caaactcctc taac 34	
	<210> 54	
	<211> 36	
35	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador antisentido	
40	<400> 54	
	ttatgcggcc gcttaccttg ttgctcctat gttctt 36	
	<210> 55	
45	<211> 28	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
50	<223> Cebador con sentido	
	<400> 55	
	aggtctcgag tccctccagg accagcac 28	
55	<210> 56	
	<211> 33	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
60	<220>	
	<223> Cebador antisentido	
	<400> 56	
65	ttaagcggcc gctcagactg ctgtggactg ctt 33	
	<210> 57	

<211> 30
 <212> ADN
 <213> Artificial
 5 <220>
 <223> Cebador con sentido
 <400> 57
 ccttctcgag aggactctga acacctctgc 30
 10 <210> 58
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Artificial
 15 <220>
 <223> Cebador antisentido
 <400> 58
 20 aatagcggcc gcttaggttg ggtgctgacc gttt 34
 <210> 59
 <211> 32
 <212> ADN
 25 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador con sentido
 30 <400> 59
 gttttctcga ggatccactg aatctgtcct gg 32
 <210> 60
 <211> 33
 35 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador antisentido
 40 <400> 60
 gtaagcggcc gctcagcagt ggaggatctt cag 33
 <210> 61
 <211> 28
 45 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 50 <223> Cebador con sentido
 <400> 61
 gatgctcgag gagagaggat tccgcct 28
 55 <210> 62
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Artificial
 60 <220>
 <223> Cebador antisentido
 <400> 62
 65 ttttgcggcc gctcaagatg aactgtattt attactg 37
 <210> 63

<211> 29
 <212> ADN
 <213> Artificial
 5 <220>
 <223> Cebador con sentido
 <400> 63
 acacctcgag ctggcggtcg ggaacctca 29
 10 <210> 64
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Artificial
 15 <220>
 <223> Cebador antisentido
 <400> 64
 20 cgtagcggcc gctcacacat gatgacaatt gggtg 35
 <210> 65
 <211> 33
 <212> ADN
 25 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador con sentido
 30 <400> 65
 ttttctcgag gctctaaatg actgttcct tct 33
 <210> 66
 <211> 35
 35 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador antisentido
 40 <400> 66
 ttttgcgcc gcctagacat accgttcgtg acaga 35
 <210> 67
 <211> 31
 45 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 50 <223> Cebador con sentido
 <400> 67
 gtcagtcgac aaacccaaag gccaccctca c 31
 55 <210> 68
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Artificial
 60 <220>
 <223> Cebador antisentido
 <400> 68
 65 ttttgcgcc gcctagattg catggttggt gtaa 34
 <210> 69

<211> 28
 <212> ADN
 <213> Artificial
 5 <220>
 <223> Cebador con sentido
 <400> 69
 10 ctggctcgag gaaccgggtg ctcagtgc 28
 <210> 70
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Artificial
 15 <220>
 <223> Cebador antisentido
 <400> 70
 20 ttaggcggcc gctcaactg tgcactaaa acgt 34
 <210> 71
 <211> 32
 <212> ADN
 25 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador con sentido
 30 <400> 71
 cagcctcgag aatattacag atccacagat gt 32
 <210> 72
 <211> 33
 35 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador antisentido
 40 <400> 72
 tacagcggcc gctcagaggt tggaagagac att 33
 <210> 73
 <211> 31
 45 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 50 <223> Cebador con sentido
 <400> 73
 agacctcgag gctgtgcagg gatcccagag a 31
 55 <210> 74
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Artificial
 60 <220>
 <223> Cebador antisentido
 <400> 74
 65 cactgcggcc gctcaccag gagcacgtca gcac 34
 <210> 75

	<211> 34	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
5	<220>	
	<223> Cebador con sentido	
	<400> 75	
10	gacggctgcac aattcaacat tattttccca gggtt 34	
	<210> 76	
	<211> 37	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
15	<220>	
	<223> Cebador antisentido	
	<400> 76	
20	tatcgcggcc gctcagattt ttccattatc atcattg 37	
	<210> 77	
	<211> 31	
	<212> ADN	
25	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador con sentido	
30	<400> 77	
	aatactcgag cctgcagcag aaacctggat a 31	
	<210> 78	
	<211> 36	
35	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador antisentido	
40	<400> 78	
	attgcggcc gcggaaatgg aattaagaat attcat 36	
	<210> 79	
45	<211> 31	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
50	<223> Cebador con sentido	
	<400> 79	
	gtcactcgag gacatggcgg atgaaccact c 31	
55	<210> 80	
	<211> 33	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
60	<220>	
	<223> Cebador antisentido	
	<400> 80	
65	tggtgcggcc gctcagatac tggtttggag gtc 33	
	<210> 81	

	<211> 31	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
5	<220>	
	<223> Cebador con sentido	
	<400> 81	
10	ggtatctcga gatggctcac cgtccccca g	31
	<210> 82	
	<211> 34	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
15	<220>	
	<223> Cebador antisentido	
	<400> 82	
20	gttggtgcgg ccgctgtggg aggggcagtt cagg	34
	<210> 83	
	<211> 28	
	<212> ADN	
25	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador con sentido	
30	<400> 83	
	ttttctcgag cgacctcag ggacggcc 28	
	<210> 84	
	<211> 35	
35	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador antisentido	
40	<400> 84	
	ttttgcggcc gcggtcatgc tccaataaat tcaact 35	
	<210> 85	
45	<211> 31	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
50	<223> Cebador con sentido	
	<400> 85	
	gttactcgag atgctgcttc ttctctccc c 31	
55	<210> 86	
	<211> 35	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
60	<220>	
	<223> Cebador antisentido	
	<400> 86	
65	gttggtgcgg ccgcttaatt tgctgcagg atctg 35	
	<210> 87	

	<211> 31	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
5	<220>	
	<223> Cebador con sentido	
	<400> 87	
10	aaaactcgag ggaagatgc agccactct g	31
	<210> 88	
	<211> 32	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
15	<220>	
	<223> Cebador antisentido	
	<400> 88	
20	aaaagcggcc gccagtcaca ggggggtctc ca	32
	<210> 89	
	<211> 32	
	<212> ADN	
25	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador con sentido	
30	<400> 89	
	gatgactcga gatgaccctg ggccgccgac tc 32	
	<210> 90	
	<211> 33	
35	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador antisentido	
40	<400> 90	
	gttgtcggc cgctcagtgg gtctgctgg ccg 33	

REIVINDICACIONES

1. Un sensor basado en células que comprende:

- a) Una línea celular hemopoyética con exocitosis regulada de gránulos secretores.
- b) Granzima B como proteasa reportera transfectada en la línea celular de (a) que se almacena en los gránulos secretores de dicha línea celular.
- c) Un receptor de superficie heterólogo transfectado usado como un modulador de la exocitosis regulada de los gránulos secretores de la línea celular de (a).
- d) Un sustrato específico para detección de la proteasa reportera almacenada en los gránulos secretores o un medio de ELISA para detectar la proteasa reportera.

2. El sensor basado en células de la reivindicación 1, en el que la línea celular con exocitosis regulada de los gránulos secretores es una línea celular hemopoyética y/o su descendencia, seleccionada del grupo que consiste en líneas celulares mieloides que comprenden monocitos, macrófagos, neutrófilos, basófilos, eosinófilos, mastocitos, eritrocitos, megacariocitos, plaquetas y células dendríticas o seleccionada de un grupo que consiste en líneas celulares linfoides que comprenden linfocitos T, linfocitos B y linfocitos NK.

3. El sensor basado en células de las reivindicaciones 1 o 2, en el que las células se seleccionan del grupo que consiste en la línea celular de leucemia basófila de rata RBL-2H3, la línea celular hemopoyética de médula ósea de ratón 32D, la línea celular citolítica natural línea celular NK92 humana, la línea celular citolítica natural línea celular YT humana y la línea celular de mastocitos de ratón MC/9 de ratón.

4. El sensor basado en células de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el receptor de superficie usado como un modulador de la exocitosis es un polipéptido que, cuando se activa o se inhibe, induce un cambio en los niveles de calcio intracelular, AMPc, diacilglicerol (DAG) fosfolípidos o ATP que a su vez regulan o modulan la exocitosis desencadenada por calcio.

5. El sensor basado en células de la reivindicación 1, en el que el receptor de superficie es un receptor acoplado a proteína G (GPCR).

6. Método para obtener la célula de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende transformar una línea celular hemopoyética con un vector para la expresión del receptor de superficie usado como un modulador heterólogo de la exocitosis de los gránulos secretores, regulado bajo el control de un promotor adecuado, y con un vector que codifica una granzima B como proteasa reportera almacenada en los gránulos secretores bajo el control de un promotor adecuado.

7. El método de la reivindicación 6, en el que el promotor para la expresión del modulador de exocitosis regulada de los gránulos secretores se selecciona de un promotor inducible o del grupo de promotores fuertes constitutivos que consiste en promotores del factor de elongación 1 alfa humano o de ratón (hEF1 alfa) (SEQ ID NO: 1), promotores de fosfoglicerato quinasa de especie humana (hPGK), de ratón y rata, promotor del Virus del Sarcoma de Rous (VSR) (SEQ ID NO: 2) y promotor 5' LTR del virus de leucemia murina de Moloney MoMLV-5'LTR (SEQ ID NO: 3).

8. El método de las reivindicaciones 6 o 7, en el que el vector para expresión de un modulador de exocitosis regulada de gránulos secretores comprende una secuencia para la sobreexpresión en superficie que comprende SEQ ID NO: 4.

9. El método de las reivindicaciones 7 u 8, en el que el promotor para la expresión de la proteasa reportera almacenada en los gránulos se selecciona del grupo que consiste en promotores inducibles o de expresión proteica de media a fuerte, seleccionados del grupo que consiste en un promotor quimérico de hCMV y el promotor MoMLV-5'LTR (SEQ ID NO: 10); el promotor MoMLV-5'LTR (SEQ ID NO: 3); el promotor del Factor de Elongación 1 alfa (SEQ ID NO: 1); el promotor de VSR (SEQ ID NO: 2), el promotor de citomegalovirus humano y el promotor de la timidina quinasa.

10. Método para ensayar 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 un sensor basado en células de las reivindicaciones 1 a 5 en un medio compatible con la viabilidad celular, exocitosis y actividad enzimática de la granzima B como proteasa reportera almacenada en los gránulos secretados,
- b) añadir un ligando específico del modulador de exocitosis, y
- c) detectar la granzima B como proteasa reportera almacenada en los gránulos secretados con un sustrato específico o por medio de ELISA.

11. El método de la reivindicación 10, en el que la actividad enzimática de las proteasas reporteras almacenada en los gránulos secretados se mide usando un sustrato impermeable celular seleccionado del grupo que consiste en un

sustrato colorimétrico, fluorescente, FRET, FRET resuelto en el tiempo o luminiscente.

5 12. Uso del sensor basado en células de las reivindicaciones 1 a 5 para ensayar interacciones entre moléculas en el descubrimiento de fármacos, o para cuantificar moléculas para diagnóstico, o para la detección de moléculas en muestras de la industria alimentaria, en muestras ambientales y en la industria farmacéutica.

13. Kit que comprende el sensor basado en células de las reivindicaciones 1 a 5 para ensayar si un compuesto modula la exocitosis.

FIGURA 1

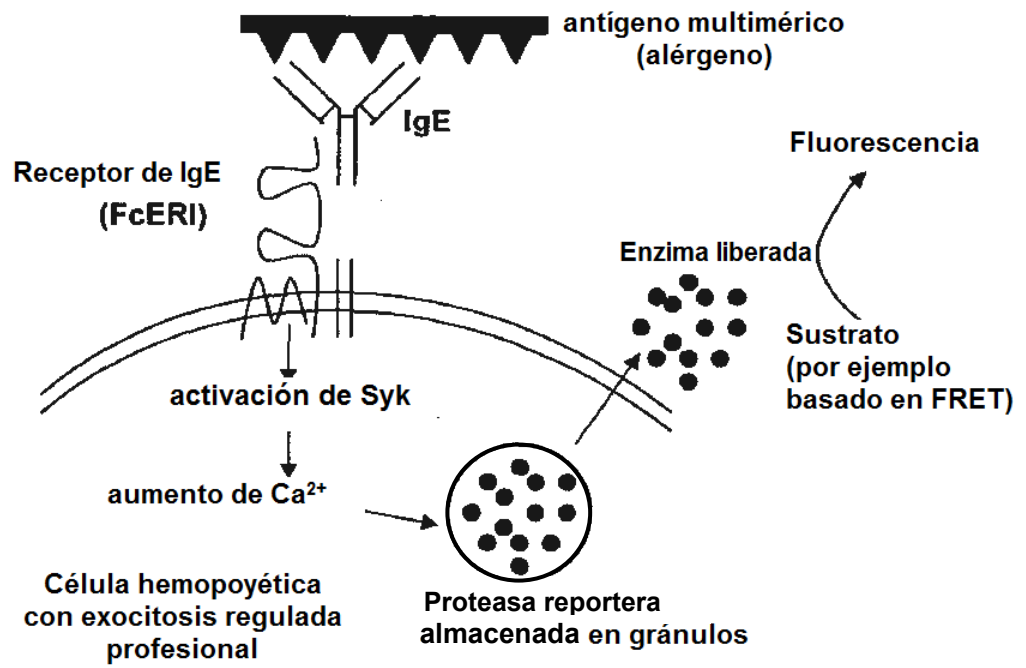


FIGURA 2

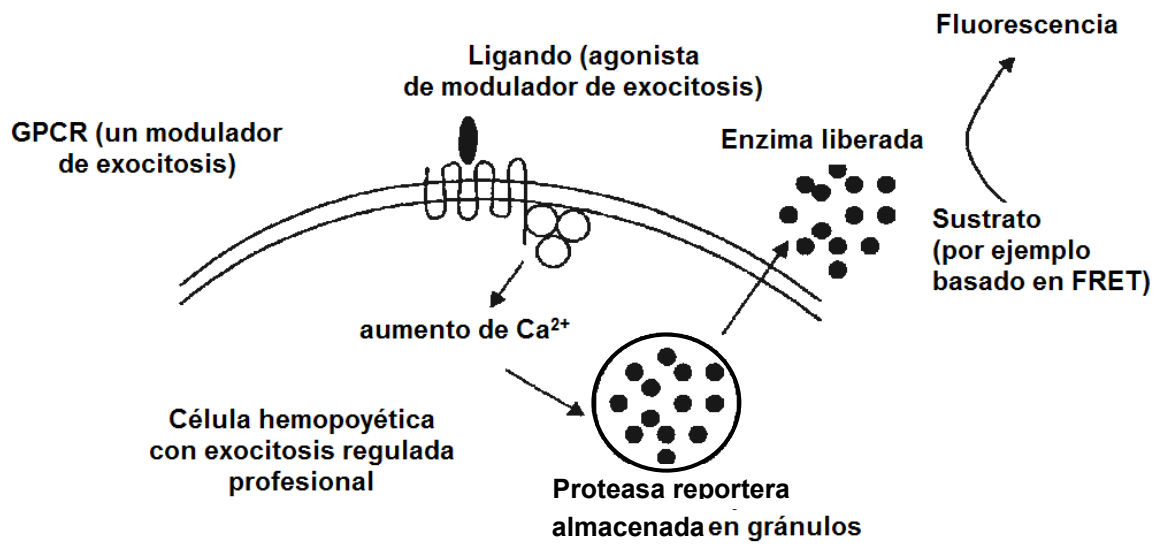


FIGURA 3

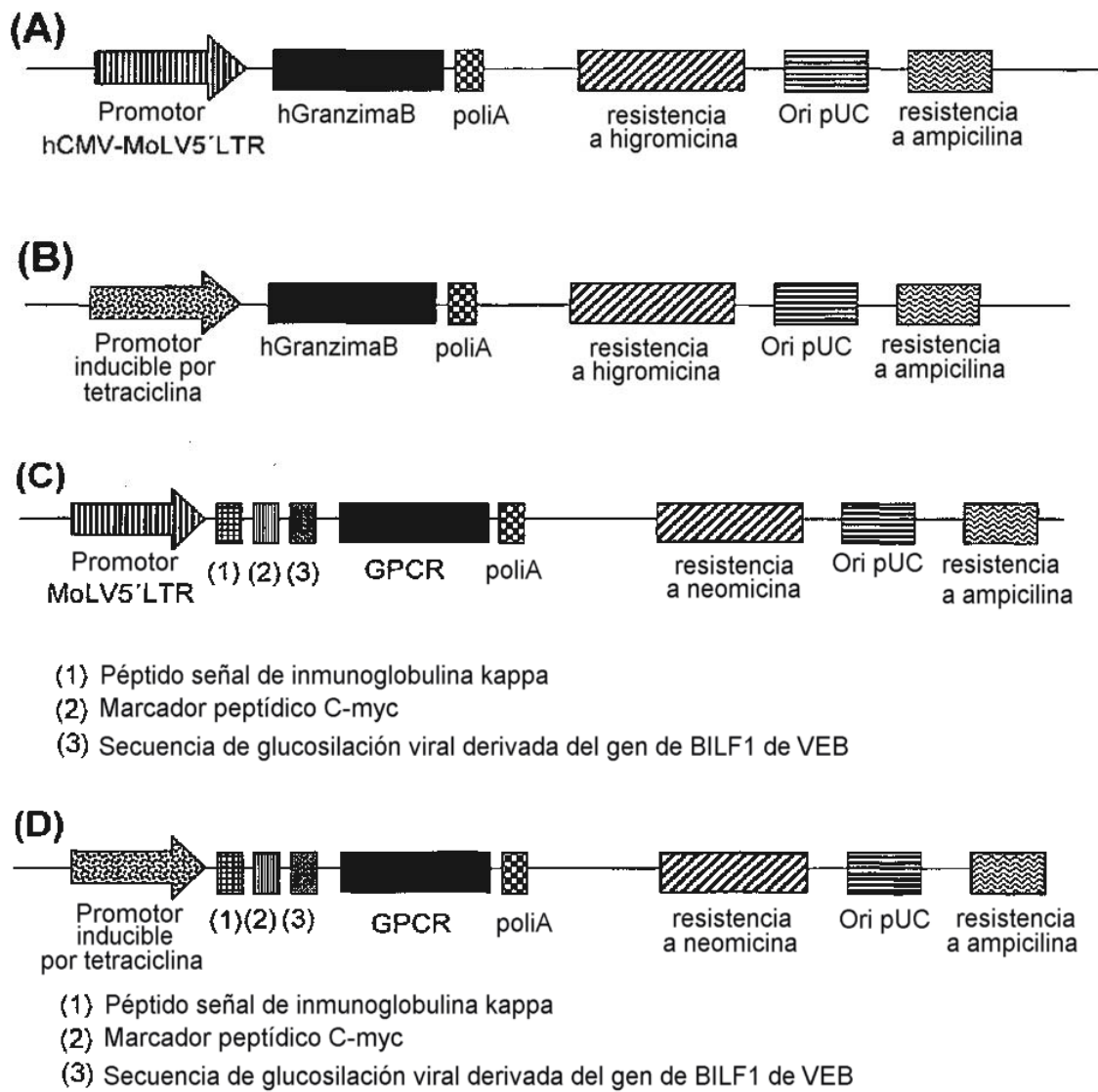


FIGURA 4

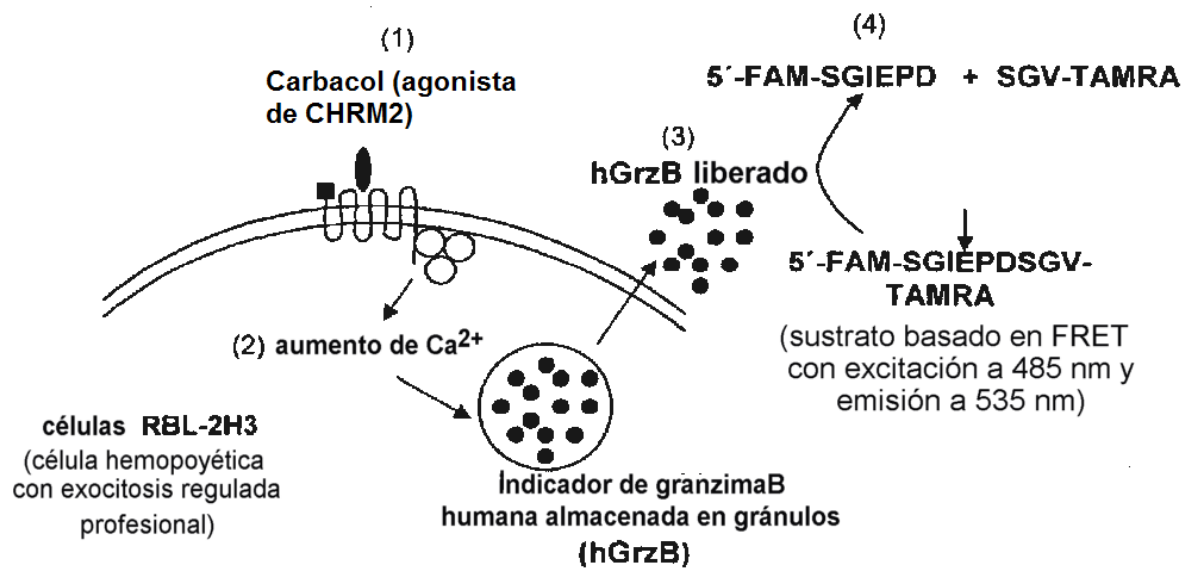
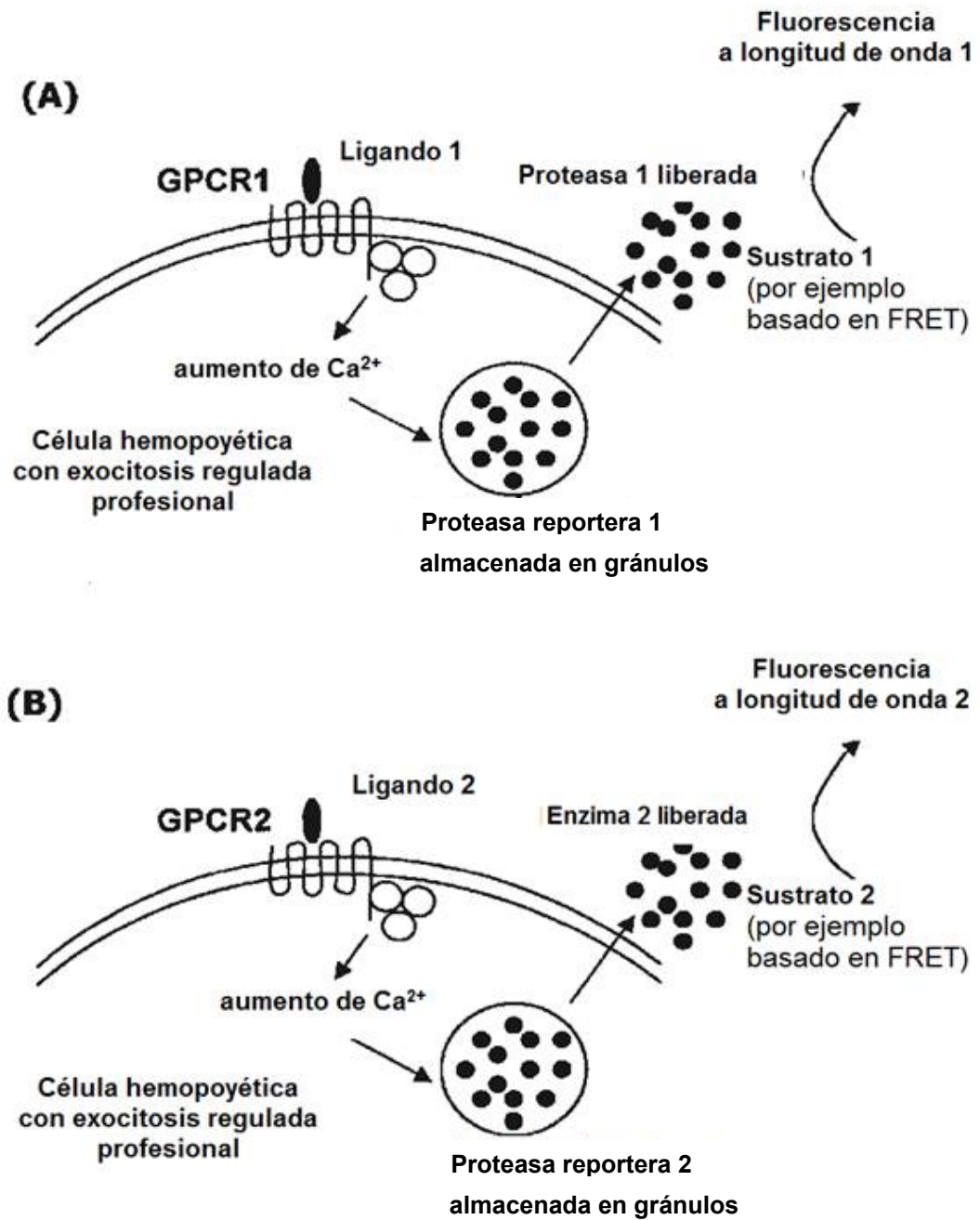


FIGURA 5



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.

Documentos de patente citados en la descripción

- WO 2004016212 A [0015]
- US PTO5035999 A, Geiger R and Miska W [0115]
- US PTO4557862 A, Mangel W [0116]
- US PTO4463090 A, Harris, C. [0118]
- US PTO8115252 A, Verheijen JH [0120]

Literatura no patente citada en la descripción

- TIBERGHIE et al. *Journal of Immunological Methods*, 1999, vol. 223, 63-75 [0012]
- NAAL RM et al. *Biosens Bioelectron*, 01 November 2004, vol. 20 (4), 791-6 [0013]
- GRAMINSKI GF et al. *J. Biol. Chem.*, 1993, vol. 268 (8), 5957-5964 [0014]
- EL MESKINI R et al. *Endocrinology*, 2001, vol. 142-2, 864-873 [0015]
- SCHWARTZ et al. *J. Immunol.*, 1979, vol. 123, 1445-1450 [0017]
- DRAGONETTI et al. *Cell*, 2000, vol. 1 (13), 3289-3298 [0017]
- SHIVER et al. *Cell*, 1992, vol. 71 (2), 315-322 [0018]
- SCHECHTER I ; BERGER A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1968, vol. 32, 898-902 [0027]
- SMITH MJ et al. *J. Leukoc. Biol.*, 1996, vol. 60, 555-562 [0030]
- TURK V ; TURK B ; TURK D. *EMBO J*, 2001, vol. 20, 4629-33 [0031] [0100]
- GROSSMAN, WJ. et al. *Curr. Opin. Immunol.*, 2003, vol. 15, 544-552 [0032]
- PREININGER AM ; HAMM HE. *Sci. STKE*, 2004, re3 [0039]
- CABRERA-VERA TM et al. *Endocr Rev.*, December 2003, vol. 24 (6), 765-81 [0039]
- MANIATIS et al. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, 1990 [0048]
- AUSUBEL et al. *Current Protocols In Molecular Biology*. John Wiley & Sons, 1996 [0048]
- STENNICKE HR ; SALVESEN GS. *Cell Death and Differentiation*, 1999, vol. 6, 1054-1059 [0058]
- BURGOYNE RD ; MORGAN A. *Physiol Rev*, 2003, vol. 83, 581-632 [0063]
- ARVAN P ; CASTLE D. *Biochem J*, 1998, vol. 332, 593-610 [0063]
- BURGOYNE RD ; DUNCAN JS. *J Mamm Gland Biol Neoplasia*, 1998, vol. 3, 275-286 [0063]
- BURGOYNE, RD ; MORGAN, A. *Physiological Reviews*, April 2003, vol. 83 (2), 581-632 [0081]
- ANDERSSON et al. *Mol Pharmacol*, 2003, vol. 64, 570-577 [0093]
- EL MESKINI, R et al. *Endocrinology*, 2001, vol. 142 (2), 864-873 [0096]
- TAM WWH et al. *Eur J Cell Biol*, 1993, vol. 62, 294-306 [0096]
- ROY P et al. *Mol Cell Endocrinol*, 1991, vol. 82, 237-250 [0096]
- COOL DR et al. *J Biol Chem*, 1995, vol. 270, 8723-8729 [0096]
- HUANG et al. *J Clin Immunol.*, 1998, vol. 18, 169-183 [0097]
- KAUR, J ; CUTLER DF. *J. Biol. Chem.*, 2002, vol. 277 (12), 10498-10505 [0097]
- OWEN CA ; CAMPBELL EJ. *J. Leukoc. Biol.*, 1999, vol. 65, 137-150 [0100]
- ISAAZ et al. *Eur J Immunol*, 1995, vol. 25 (4), 1071-9 [0101]
- PHAM W et al. *Bioconj. Chem.*, 2004, vol. 15, 1403-1407 [0111]
- PENG X et al. A nonfluorescent, broad-range quencher dye for Förster resonance energy transfer assays. *Analytical Biochemistry*, 25 February 2009 [0111]
- MUZIO M. et al. *J. Biol. Chem.*, 1998, vol. 273, 2926-2930 [0118]
- MAHRUS S ; CRAIK CS. *Chemistry & Biology*, 2005, vol. 12, 567-577 [0119]
- VERHEIJEN JH et al. *Biochem. J.*, 1997, vol. 323, 603-609 [0120]
- LI Y. et al. *Molecular Biotechnology*, 2001, vol. 18 (1), 1-10 [0120]
- VOCERO-AKBANI AM et al. *Nat Med.*, 1999, vol. 5 (1), 29-33 [0120]
- PLAINKUM P et al. *Nat Struct Biol.*, February 2003, vol. 10 (2), 115-9 [0127]
- JOHNSON RJ et al. *FEBS Journal*, 2006, vol. 273 (23), 5457-5465 [0127]
- JUCOVIC M et al. *Protein Engineering Design and Selection*, 2008, vol. 21 (10), 631-638 [0127]