

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 592 263**

51 Int. Cl.:

C07K 14/72 (2006.01)

G01N 33/74 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.01.2012 PCT/EP2012/051532**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.08.2013 WO13113370**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.01.2012 E 12705809 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.06.2016 EP 2809680**

54 Título: **GPCR con expresión mejorada en superficie celular**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
29.11.2016

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

ILLESCAS TABOADA, Manuel

ES 2 592 263 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

GPCR con expresión mejorada en superficie celular

5 **Campo de la invención**

La presente invención puede incluirse en los campos biotecnológico y farmacéutico. La presente invención muestra que la adición de una secuencia derivada de GPCR (receptor acoplado a proteína G) viral en el extremo amino terminal de las GPCRs mejora la expresión en la superficie celular de dichos receptores en células eucariotas. Esta mejora en la expresión en la superficie celular por dicha secuencia heteróloga derivada de GPCR viral puede conseguirse en líneas celulares primarias o establecidas, por ejemplo, en líneas celulares hematopoyéticas o no hematopoyéticas de mamífero y en células transfectadas de forma estable o transfectadas de forma transitoria. Dicha secuencia heteróloga puede combinarse con un péptido señal y/o una etiqueta peptídica para la detección en la superficie y/o separación de células positivas para GPCR. Además, pueden seleccionarse promotores útiles para la expresión de un GPCR que comprende al menos una secuencia heteróloga derivada del GPCR viral, de entre promotores constitutivos no silenciados o promotores inducibles.

Las células transfectadas que expresan los GPCR virales heterólogos anteriores en su superficie son útiles para ensayos basados en células para identificar compuestos de ensayo/candidatos que aumentan o modulan la actividad de un GPCR o un ligando de un GPCR, por ejemplo, para descubrimiento de fármacos, desarrollo de sabores nuevos en la industria alimentaria o desarrollo de sensores aromáticos basados en GPCR. Además, pueden usarse extractos de membrana derivados de células transfectadas, por ejemplo, para ensayos de compuestos en descubrimiento de fármacos o para desarrollo de sensores que comprenden dichos extractos de membrana para la identificación y/o cuantificación de compuestos orgánicos volátiles.

25 **Estado de la técnica**

Los receptores de superficie celular para ligandos son las entidades moleculares por las que una célula detecta su ambiente circundante. Después de una interacción de ligando-receptor, la célula dirige los procesos celulares en respuesta a esta interacción. Los GPCRs, también conocidos como receptores de siete dominios transmembrana, comprenden la mayor familia de receptores de superficie celular identificados hasta la fecha. Más del 60 % de los fármacos con receta actuales se dirigen a GPCR y, como tales, los GPCR son una de las dianas más importantes para investigación de descubrimiento de fármacos. Hasta la fecha, se han identificado aproximadamente 400 genes como GPCR. Pero también, los GPCR son los receptores usados para identificar olores y sabores.

Los GPCR actúan a través de un mecanismo molecular similar. La activación del GPCR por estímulos extracelulares provoca cambios conformacionales en el receptor, que dan 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 subunidades α , β y γ codificadas por genes distintos. La subunidad α es la responsable de la unión de GDP y GTP. La unión de un ligando con un GPCR da como resultado una transición de la subunidad α de una forma unida a GDP a una forma unida a GTP y conduce a la activación del heterotrímero mediante la disociación del α -GTP del dímero $\beta\gamma$. Tanto α -GTP como el dímero $\beta\gamma$ regulan las actividades de una diversidad de efectores que transmiten la señal al interior de la célula mediante la producción de moléculas segundos mensajeros (por ejemplo, calcio, AMPc, etc.). Existen al menos 17 genes de Ga, y los miembros de proteínas G pueden agruparse en cuatro clases principales denominadas $G_{ai/o}$, G_{α_q} , $G_{\alpha_{15}}$ y $G_{\alpha_{12}}$. Tras la unión al ligando, los GPCR pueden acoplarse a una diversidad de proteínas G, conduciendo de este modo a la activación de muchas rutas de señalización complejas, que pueden complicar la lectura para el cribado de alto rendimiento (HTS) de GPCR.

La unión de un ligando a un GPCR particular inicia una señal que se detecta midiendo algún cambio en las propiedades de algún elemento de la ruta de señalización, principalmente segundos mensajeros como calcio intracelular, AMP cíclico y metabolitos de fosfato de inositol. Una lectura universal para la mayoría de los GPCR es beneficiosa para el descubrimiento de fármacos tanto por la simplicidad como por la desorfanización de receptores sin ligandos conocidos. Se conoce en el estado de la técnica que ciertas proteínas G promiscuas endógenas pueden acoplarse con muchos GPCR [Wilkie TM, Scherle PA, Strathman MP, Slepak VZ y Simon MI. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 10049-10053 (1991)] y [Amatruda TT., Steele DA., Slepak VZ. y Simon MI. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 5587-5591 (1991)] pero dichas proteínas G promiscuas endógenas se expresan de forma natural solamente en algunas células hematopoyéticas como células mielomonocíticas y linfocitos T en seres humanos y células mielomonocíticas, linfocitos B y algunos linfocitos T en ratón y rata. No obstante, la expresión de la mayoría de los GPCR es difícil de conseguir en la mayoría de las células hematopoyéticas.

Una alternativa es cotransfectar tanto un GPCR como un receptor acoplado a proteína G promiscuo en células no hematopoyéticas, pero también existe la necesidad de expresar el GPCR en dichas líneas celulares a alto nivel para mejorar la sensibilidad. Además, algunos investigadores desean usar células primarias para cribado, pero esas células expresan normalmente niveles bajos de GPCR y por lo tanto la sensibilidad es baja. Una alternativa podría ser transfectar el GPCR diana en dichas células primarias para mejorar la sensibilidad manteniendo, al mismo tiempo, el fondo celular tan cercano como sea posible al de la enfermedad diana. Pero las células primarias son

difíciles de transfectar, no pueden cultivarse *in vitro* durante periodos de tiempo largos y por lo tanto no pueden transfectarse de forma estable. Por lo tanto, tanto para células no hematopoyéticas como para células primarias son necesarios métodos mejorados para la expresión de GPCR.

5 Una tecnología común para cribar dianas farmacológicas de GPCR es medir los cambios en el calcio intracelular tras la unión de ligandos con el GPCR de una manera de alto rendimiento. Sin embargo, no todos los GPCR se acoplan con $G\alpha_q$ conduciendo a la movilización del calcio.

10 Se conoce en el estado de la técnica que las células hematopoyéticas expresan proteínas G endógenas promiscuas tales como $G\alpha_{15}$ y/o $G\alpha_{16}$ a altos niveles [Wilkie TM, Scherle PA, Strathman MP, Slepak VZ y Simon MI. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 10049-10053 (1991)] y [Amatruda TT., Steele DA., Slepak VZ. y Simon MI. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 5587-5591 (1991)]. Desafortunadamente muchos GPCR son difíciles de expresar a altos niveles en la superficie celular, particularmente en la superficie de células hematopoyéticas.

15 Un método alternativo para acoplar a la ruta de calcio un receptor no acoplado a $G\alpha_q$ es cotransfectar una proteína G promiscua (por ejemplo, $G\alpha_{15}$) o quimeras de $G\alpha_q$ para enlazar la activación del GPCR a la movilización del calcio. En este método también existe la necesidad de expresar el GPCR en la superficie celular a niveles adecuados para el cribado.

20 En ocasiones además se desea usar líneas celulares primarias para cribar fármacos, particularmente para usar una línea celular tan parecida como sea posible al tipo celular de la enfermedad diana para la que se van a desarrollar los fármacos. Los niveles de GPCR endógenos en la superficie celular son bajos para las células primarias y, por tanto, solamente se han identificado en células primarias agentes de unión de alta afinidad. No obstante, las líneas celulares primarias son difíciles de transfectar y no pueden cultivarse durante periodos largos de tiempo y, por lo tanto, normalmente no es posible la transfección estable.

30 Los GPCRs también son los receptores expresados en el bulbo olfatorio que median en el reconocimiento de olores. Los seres humanos expresan aproximadamente 400 GPCRs funcionales en su bulbo olfatorio y los roedores expresan aproximadamente 1.000 GPCRs funcionales. No obstante, la expresión de GPCRs en la superficie de células heterólogas es extremadamente baja. Una de las estrategias usadas para mejorar la expresión en la superficie celular de GPCRs olfatorios en la superficie de células heterólogas es el uso de chaperonas como RTP1S y REEP solas o junto con secuencias N-terminales derivadas del receptor de rodopsina. Son necesarias nuevas secuencias que mejoren la expresión en la superficie celular.

35 Se conoce bien en el estado de la técnica que la glicosilación es una modificación postraducciona habitual de receptores acoplados a proteínas G de siete dominios transmembrana (GPCR). Se conocen en el estado de la técnica dos formas comunes de glicosilación: N-glicosilación y O-glicosilación. La N-glicosilación es el proceso de modificación mediante oligosacáridos de asparagina o cadenas laterales de arginina, y es importante para el plegamiento de algunas proteínas eucariotas. La N-glicosilación sucede normalmente en eucariotas en el lumen del retículo endoplásmico. La O-glicosilación implica la unión del glucano con la cadena lateral de hidroxilo de serina o de treonina mediante una N-acetilgalactosamina. La O-glicosilación ocurre en el aparato de Golgi.

45 Aunque se ha mostrado que la glicosilación es importante para el plegamiento de proteínas, el tráfico y la dirección de los receptores a la superficie celular, los ejemplos de glicosilación que son relevantes para la expresión en la superficie de GPCRs están limitados a N-glicosilación. De hecho, no hay ninguna técnica anterior con respecto a O-glicosilación en GPCRs. Como consecuencia, en la actualidad, no se sabe si la O-glicosilación mejora la expresión en la superficie de GPCRs o si la adición de una secuencia heteróloga en el extremo amino terminal del GPCR produce una O-glicosilación y el efecto de dicha glicosilación potencial en la expresión en superficie de GPCRs.

50 La síntesis y clasificación intracelular del receptor de interleucina 2 (IL-2) se ha estudiado en una línea de células de ovario de hámster chino (CHO) mutantes con un defecto reversible en la O-glicosilación de proteínas (Kozarsky, KF *et al*, Mol. Cell. Biol. 1988, 8 (8), 3357). Los receptores de IL-2 deficientes en carbohidratos se clasificaron erróneamente y dieron como resultado muy poca expresión en la superficie. Se conocen en el estado de la técnica varios otros receptores que están ligados a O-glicosilación por su expresión mejorada en superficie o su estabilidad frente a la proteólisis aumentada. Son ejemplos de dichos receptores el receptor de lipoproteínas de baja densidad, el factor de aceleración de la degradación y la proteína del antígeno principal de la envuelta del virus de Epstein-Barr. No obstante, para otras proteínas secretadas y receptores tales como la gonadotropina coriónica humana (Matzuk *et al*. 1987); la apoproteína E (Zanni *et al* (1989); la proteína de la envuelta del VIH gp120/41 no hay ningún efecto de O-glicosilación en sus niveles de expresión o estabilidad. No obstante, de nuevo, los ejemplos anteriores no enseñan si existe O-glicosilación en GPCRs y el efecto de dicha O-glicosilación potencial en los niveles de expresión en superficie de GPCRs. Además, los ejemplos anteriores usando receptores nativos no relacionados con GPCRs no demuestran o anticipan que la adición de dichas secuencias a GPCR heterólogos mejoren su expresión en la superficie.

65 En la presente invención se describe que ciertas secuencias de GPCR derivadas de virus, cuando se añaden al extremo amino terminal de GPCRs heterólogos, mejoran su expresión en la superficie. También se ha demostrado

que mutaciones de serinas y treoninas presentes en dichas secuencias de GPCRs derivadas de virus reducen parcialmente, pero no toda, la mejora de la expresión en la superficie celular alcanzada por la inclusión de dichas secuencias virales. Además, los inventores demuestran que dicha mejora en la expresión en la superficie de GPCRs se consigue en células de origen tanto hematopoyético como no hematopoyético. Dichas células que expresan este receptor modificado pueden usarse para ensayos basados en células, por ejemplo, para el descubrimiento de fármacos, o membranas derivadas de dichas células deberían usarse en ensayos en los que se necesiten GPCRs.

Descripción de la invención

Como se ha indicado anteriormente, la presente invención muestra sorprendentemente que la adición de una secuencia derivada de GPCR viral en el extremo amino terminal de GPCR mejora la expresión en la superficie celular de dichos receptores. Esta mejora en la expresión en la superficie celular mediante una secuencia derivada de GPCR viral puede alcanzarse en células eucariotas, por ejemplo, líneas celulares primarias o establecidas de mamífero tales como líneas celulares hematopoyéticas o no hematopoyéticas.

En una realización particular de la presente invención, la secuencia derivada del GPCR viral es SEQ ID NO: 1. En una realización preferida la secuencia derivada del GPCR viral es una forma más corta de SEQ ID NO: 1 designada como SEQ ID NO: 2. En otra realización, las secuencias anteriores pueden estar presentes una vez o en tándem de dos o más secuencias. En una realización preferida, la SEQ ID NO: 1 codifica la SEQ ID NO: 8 y la SEQ ID NO: 2 codifica la SEQ ID NO: 9.

Las secuencias virales añadidas al extremo amino terminal de los GPCRs se realizan como moléculas quiméricas de ADN en las que las secuencias virales se añaden, por ejemplo, entre una secuencia que codifica un marcador peptídico y el segundo aminoácido que codifica un GPCR maduro. Dichas secuencias virales añadidas en el extremo amino terminal del GPCR se aíslan preferentemente de marco abierto de lectura de BILF1 del virus Epstein-Barr. Dichas secuencias cuando se añaden al extremo amino terminal de GPCRs heterólogos mejoran su expresión en la superficie, mejorando el porcentaje de células positivas o mejorando la media o la mediana del número de moléculas de GPCR en la superficie de cada célula. Sin embargo, las secuencias de GPCR virales de la invención pueden derivar de otros beta y gammaherpesvirus, por ejemplo, de todos los miembros de la familia de betaherpesvirus, por ejemplo, citomegalovirus (CMV), homólogos que codifican GPCR y gamma2-herpesvirus, por ejemplo, herpesvirus asociado con sarcoma de Kaposi (KSHV) y herpesvirus gamma1, por ejemplo, el virus Epstein-Barr, también codifican homólogos de GPCRs. En ciertas realizaciones de la presente invención, la secuencia derivada de GPCR viral usada para mejorar la expresión de GPCR en la superficie se selecciona de los primeros 30 aminoácidos de un grupo de GPCR viral que comprende UL33, M33, R33, UL78, M78, R78, US27 y US28.

En otra realización preferida, los vectores que comprenden la secuencia derivada de GPCR viral de la invención también comprenden un ácido nucleico que codifica un péptido señal para mejorar adicionalmente la expresión en la superficie (sobrexpresión) y/o un ácido nucleico que codifica un etiqueta de secuencia para la detección y/o separación en la superficie de células positivas para el GPCR, por ejemplo, mediante citometría de flujo o por perlas magnéticas.

En otra realización de la presente invención, la secuencia derivada del GPCR viral está transfectada de forma estable en una línea celular. En una realización preferida, la secuencia derivada de GPCR viral de la invención está transfectada de forma transitoria en una línea celular eucariota o en una célula primaria eucariota. En una realización adicional de la presente invención, se clasifican líneas celulares o células primarias transfectadas de forma transitoria o estable con el GPCR para la separación física de células positivas para GPCR. En una realización, la célula transfectada con un GPCR que comprende al menos una secuencia derivada de GPCR viral heterólogo, es una célula eucariota. En una realización específica la célula transfectada con un GPCR que comprende al menos una secuencia heteróloga derivada de GPCR viral es una célula hematopoyética de mamífero o una célula no hematopoyética de mamífero.

En una realización de la presente invención, el GPCR que comprende al menos una secuencia heteróloga derivada de GPCR viral se expresa bajo el control de un promotor constitutivo. En una realización adicional, los promotores se seleccionan de promotores no silenciados para la línea celular específica para transfectar. En una realización adicional, más los promotores no silenciados se seleccionan de promotores ubicuos o virales. En una realización, pueden seleccionarse promotores adecuados para la expresión de GPCR constitutiva de un grupo que comprende promotores de factor de elongación 1-alfa de ratón o de ser humano (SEQ ID NO: 3), promotores de fosfoglicerato quinasa (SEQ ID NO: 4) de especies humana, de ratón y de rata, promotor de virus de sarcoma de Rous (VSR) (SEQ ID NO: 5), 5'LTR del promotor del virus de leucemia murina de Moloney MoMLV-5'LTR (SEQ ID NO: 6) y el promotor de ubiquitina de especies humana, de ratón y de rata. Dichos promotores no se silencian a lo largo del tiempo cuando se usan células hematopoyéticas en los métodos de la presente invención y también son adecuados cuando se usan células no hematopoyéticas en los métodos de la presente invención. En otra realización de la presente invención, son promotores adecuados para expresión en la superficie del GPCR promotores inducibles.

En una realización de la presente invención, el GPCR que comprende al menos una secuencia heteróloga derivada de GPCR viral se expresa bajo el control de un promotor inducible. En una realización particular, se seleccionan

promotores inducibles adecuados de un grupo que comprende promotor inducible por tetraciclina, promotor inducible por ecidisona, promotor inducible por cumato y promotor inducible por progesterona.

5 Como se ha descrito anteriormente, se introducen secuencias de ácido nucleico exógenas que codifican uno o más GPCRs con al menos una secuencia heteróloga derivada del GPCR viral en la región amino terminal en células eucariotas. Como se usa en el presente documento, una secuencia de ácido nucleico exógena se refiere a una secuencia de ácido nucleico que no aparece de forma natural en la célula y/o se ha introducido en una célula (por ejemplo, una célula hospedadora, una célula progenitora (antecesora)). Puede usarse en la presente invención cualquier secuencia de ácido nucleico (por ejemplo, ADN, ARN) que pueda codificar un GPCR con al menos una
10 secuencia heteróloga derivada de GPCR viral tal como SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 en la región amino terminal y que se expresa de forma exógena en la presente invención.

Se conoce bien en la técnica la introducción de secuencias de ácido nucleico exógenas, y puede aplicarse, por ejemplo, mediante transfección. En una realización, una secuencia de ácido nucleico exógena que codifica un GPCR
15 con al menos una secuencia heteróloga derivada de GPCR viral en la región amino terminal se introduce en una célula como un plásmido o vector. En una realización de la presente invención la transfección puede ser transfección transitoria o estable.

En una realización, la invención se refiere a un plásmido o vector que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un GPCR con al menos una secuencia heteróloga derivada del GPCR viral tal como SEQ ID NO: 1 o
20 SEQ ID NO: 2 en la región amino terminal, en el que el GPCR se expresa a un alto nivel. En otra realización, el plásmido comprende la secuencia de ácido nucleico que codifica un receptor acoplado a proteína G (GPCR) con al menos una secuencia heteróloga derivada de GPCR viral tal como SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 en la región amino terminal, en el que la secuencia de ácido nucleico que codifica el GPCR comprende además un promotor que
25 está unido operativamente con el GPCR.

En una realización particular un vector útil para expresión de GPCR constitutiva es P-MoMLV-5'LTR-SP-cmyc-marcador-VGS-MCS-poliA (SEQ ID NO: 7) que comprende un promotor constitutivo fuerte que no se silencia en células hematopoyéticas o células no hematopoyéticas, un péptido señal para ayudar a la translocación a través de
30 la membrana, un marcador para selección de las células con el GPCR en la superficie, una secuencia heteróloga derivada del GPCR viral para mejorar la expresión de 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: 7 se reemplaza por el promotor inducible de tetraciclina, entonces se obtiene un vector adecuado para la expresión del GPCR inducible. La presente invención es la primera en demostrar que la adición de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2,
35 una secuencia heteróloga derivada de GPCR viral, en el extremo N-terminal de un GPCR, mejora la expresión del receptor en la superficie celular en células eucariotas y que esta mejora no se restringe a células hematopoyéticas de mamífero como se ha descubierto previamente por los inventores.

Las células con expresión mejorada de GPCRs en la superficie de la presente invención, son en general útiles para
40 ensayar interacciones entre al menos dos moléculas, actuando al menos, una como ligando agonista y al menos un GPCR. Por ejemplo, en el descubrimiento de fármacos se ensayan miles e incluso millones de moléculas pequeñas frente a una diana para encontrar moléculas pequeñas que modifiquen la actividad de dicha diana. En un ejemplo particular, los compuestos se criban con respecto a agonistas o antagonistas de receptores acoplados a proteína G, una clase de receptores altamente utilizable como fármaco. Dichas interacciones pueden probarse usando ensayos
45 basados en células o fracciones enriquecidas en membrana de células con expresión mejorada de GPCR en la superficie. Son ejemplos de ensayos basados en células: ensayos sin marcador, ensayos dependientes de segundos mensajeros que miden los niveles de, por ejemplo, calcio intracelular, AMP cíclico y metabolitos de fosfato de inositol. Son ejemplos de usos de fracciones de membrana de células positivas para GPCR tecnologías de exploración basadas en afinidad tales como ensayos de unión a radioligando y sensores de resonancia a plasmón
50 superficial recubiertos con fracciones de membrana de células que expresan GPCR en su superficie. Además, los sensores basados en GPCR con secuencias derivadas de GPCR viral pueden usarse para diagnóstico, en particular sensores para detección de compuestos orgánicos volátiles. Pueden usarse plásmidos con secuencias derivadas de GPCR viral para el desarrollo de líneas celulares con expresión mejorada de GPCRs como poblaciones celulares bien estables o bien transitorias, para usar en ensayos basados en células o para la producción de fracciones de
55 membrana enriquecidas en GPCR.

Por lo tanto, la presente invención también comprende métodos y kits para ensayar si un compuesto interacciona con un GPCR y/o para cuantificar la interacción entre un GPCR y un compuesto. Dicho kit comprende al menos: una
60 línea celular o una fracción de membrana enriquecida de una línea celular que comprende un receptor acoplado a proteína G con al menos una secuencia heteróloga derivada de GPCR viral en el extremo amino terminal bajo el control de un promotor adecuado. Dicha línea celular también puede expresar una proteína G promiscua transfectada o endógena. Para ensayos basados en células, el kit anterior debería comprender también un sustrato para la determinación de la actividad de GPCR (por ejemplo, un sustrato fluorescente para medir la elevación de calcio intracelular o un sustrato de aequorina o un sustrato para medir la excitotoxicidad regulada por células).

65 Las mejoras de la expresión en la superficie celular alcanzadas en la presente invención ofrecen la posibilidad de

preparar membranas enriquecidas en GPCRs, por ejemplo, para ensayos de unión a radioligando o para ensayos funcionales con células vivas tales como ensayos sin marcador, ensayos de segundos mensajeros como movilización de calcio intracelular, aumento de AMPc, producción de fosfatos de inositol o liberación de enzimas almacenadas en gránulos en células hematopoyéticas con exocitosis regulada profesional.

5 Las siguientes expresiones se definen solamente para el fin de la presente invención:

- 10 • **Receptor de superficie:** se refiere a moléculas que aparecen en la superficie de células, interactúan con el ambiente extracelular y transmiten o transducen la información con respecto al ambiente intracelularmente, de una manera que modula en última instancia la transcripción de promotores específicos, dando como resultado la transcripción de genes específicos. Son ejemplos de receptores de superficie receptores de tirosina quinasa, receptores de canales de iones, receptores de citoquinas, receptores acoplados a proteínas G (GPCR) tales como receptores peptídicos quimioatrayentes, receptores neuropeptídicos, receptores ligeros, receptores de neurotransmisores, receptores de hormonas polipeptídicas o receptores de odorizantes.
- 15 • **Receptores acoplados a proteína G (GPCRs),** 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-terminal extracelular y un extremo C-terminal citoplasmático. La unión de ligandos a GPCRs promueve cambios conformacionales que conducen al acoplamiento a proteína G pequeña, el inicio de rutas de transducción de señales y en última instancia, a respuestas celulares. Los ligandos que se unen con y activan estos receptores incluyen compuestos sensibles a la luz, odorizantes, feromonas, hormonas y neurotransmisores, y varían de tamaño de moléculas pequeñas a péptidos a grandes proteínas. Se encuentran receptores acoplados a proteína G solamente 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 GPCRs 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 subunidades α , β , y γ codificadas por genes distintos. La subunidad α es la responsable de la unión de GDP y GTP. La unión de un ligando con un GPCR da como resultado una transición de la subunidad α de una forma unida a GDP a una forma unida a GTP y conduce a la activación del heterotrímero mediante la disociación del α -GTP del dímero $\beta\gamma$. Tanto α -GTP como el dímero $\beta\gamma$ 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 de Ga, y los miembros de proteínas G pueden agruparse en cuatro clases principales denominadas $G_{ai/o}$, $G_{\alpha q}$, $G_{\alpha 15}$ y $G_{\alpha 12}$. Tras la unión a ligando los GPCR puede acoplarse a una diversidad de proteínas G, conduciendo de este modo a la activación de muchas rutas de señalización complejas, que pueden complicar la lectura para exploración de alto rendimiento (HTS) de GPCR.
- 20 • **"Secuencia heteróloga derivada de GPCR viral" o una "secuencia derivada de GPCR viral":** para el fin de la presente invención, se refiere a cualquier secuencia derivada de organismos no eucariotas, principalmente virus, transfiriéndose dicha secuencia a células eucariotas, que actúan como receptores, preferentemente por medio de vectores de expresión, para conseguir su expresión dentro de la célula eucariota (es decir expresión heteróloga). Como ejemplo, la presente invención comprende secuencias heterólogas derivadas de virus (SEQ ID NO: 1 y 2) que se transfieren a células eucariotas para mejorar la expresión de receptores de proteína G. Como se usa en el presente documento, esta expresión describe secuencias desde la metionina como el primer codón de la secuencia codificante de un GPCR viral hasta el último aminoácido del extremo amino terminal extracelular de dicha secuencia de GPCR viral antes de la región transmembrana 1 del GPCR viral anteriormente mencionado. Como se usa en los métodos de la presente invención, esta expresión también significa preferentemente, por ejemplo, secuencias o fragmentos de secuencias virales, aislados de GPCR de herpesvirus beta y gamma de mamífero.
- 25 • **Células hematopoyéticas:** son células derivadas de células madre de la médula ósea y comprenden todos los tipos celulares sanguíneos que incluyen los linajes tanto mieloides (monocitos y macrófagos, neutrófilos, basófilos, eosinófilos, eritrocitos, megacariocitos/plaquetas y algunas células dendríticas) como linfoides (linfocitos T, linfocitos B, linfocitos NK, algunas células dendríticas). Por el contrario, las células que no derivan de la médula ósea se conocen como células no hematopoyéticas.
- 30 • **Sensor:** es un tipo de transductor. Los sensores que transducen una señal biológica se denominan biosensores. Todos los organismos vivos contienen sensores biológicos con funciones similares a las de los sensores mecánicos. La mayoría de estos son células especializadas que son sensibles a: luz, movimiento, temperatura, campos magnéticos, gravedad, humedad, vibración, presión, campos eléctricos, sonido y otros aspectos físicos del ambiente externo; efectos físicos del ambiente interno, tal 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, tal como el nivel de glucosa, nivel de oxígeno u osmolalidad; y una serie variada de moléculas señales internas, tales como hormonas, neurotransmisores y citocinas. Los sensores artificiales que imitan los sensores biológicos usando un componente sensible biológico se denominan biosensores.
- 35 • **Línea celular con exocitosis regulada:** se refiere a líneas celulares generalmente diseñadas para expresar un

reportero almacenado en gránulos que se libera al medio de cultivo mediante un modulador de la exocitosis como un receptor de superficie celular, tal como un GPCR, después de una unión a ligando agonista. 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. Todas estas expresiones también incluyen su descendencia. Se entiende que toda la descendencia puede no ser idéntica debido a mutaciones deliberadas o involuntarias.

- **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 modificaciones con respecto a afinidad, efectos secundarios, biodisponibilidad, pero también ensayo del efecto de un fármaco previamente lanzado al mercado en una nueva indicación terapéutica, un proceso también conocido como redefinición.
- **Gen:** 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.
- **“Introducido de forma estable”, “transformado de forma estable”, “transducido de forma estable”, “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 usados, solamente una fracción de las células puede integrar el ADN ajeno en su genoma. Para identificar y seleccionar estos integrantes, se introduce en general 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 puromicina. El ácido nucleico que codifica un marcador seleccionable puede introducirse en una célula hospedadora en el mismo vector que el que codifica un producto de traducción detectable o puede introducirse en un vector separado. Las células transfectadas de forma estable con el ácido nucleico introducido pueden identificarse por selección farmacológica (por ejemplo, las células que han incorporado el gen marcador seleccionable sobrevivirán, mientras que las otras células morirán).
- **Receptores quiméricos:** son receptores basados en un receptor artificial que combinan partes de un receptor con partes de otro receptor, fragmentos proteicos, secuencias marcadoras o cualquier combinación de los mismos, incluyendo tanto dominios completos como parte 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 fusionada con al menos otra secuencia peptídica o con otro polipéptido.
- **Vector, vector plasmídico o plásmido:** el término “vector” se refiere 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 es homóloga a 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).
- **Vector de expresión:** la expresión “vector de expresión” se refiere a cualquier tipo de construcción genética que comprende un ácido nucleico que codifica ARN capaz de transcribirse. En algunos casos, las moléculas de ARN se traducen después en 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 refieren a secuencias de ácido nucleico necesarias para la transcripción y posiblemente traducción de una secuencia codificante unida operativamente en una célula hospedadora particular. Además de las secuencias de control que dominan la transcripción y traducción, los vectores y vectores de expresión pueden contener secuencias de nucleótidos que también cumplen otras funciones y se describen posteriormente.
- **Promotor:** es una región reguladora del ADN localizada aguas arriba de un gen, que proporciona un punto de control para la transcripción génica regulada. Puede contener elementos genéticos a los que pueden unirse proteínas y moléculas reguladoras, 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”, “ligado 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 expresión de esa secuencia.
- **Péptido señal o una secuencia señal:** un péptido señal es una cadena peptídica corta (3- 60 aminoácidos de longitud) que dirige el transporte postraduccional 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, el apoplasto y peroxisoma. Algunos péptidos señal se escinden de la proteína por peptidasa señal después de transportarse las proteínas.
- **Etiqueta de secuencia:** es una subsecuencia corta de una secuencia de ADNc que puede usarse para identificar transcritos génicos, y están implicadas en general en el descubrimiento génico y la determinación de secuencia génica, por ejemplo, con anticuerpos, cuando no están disponibles anticuerpos específicos para la proteína o para purificación de proteínas. Son ejemplos de etiquetas peptídicas conocidas que podrían usarse para detección en la superficie celular y separación la etiqueta c-myc, la etiqueta HA y la etiqueta FLAG sup.TM.

En general cualquier etiqueta peptídica para la que esté disponible una proteína de unión específica podría usarse para detección en superficie y/o separación siempre que dicha proteína de unión específica se marque directa o indirectamente con un fluoróforo o por ejemplo con una perla para separación de superficie.

- 5 • **Marcador seleccionable, secuencia marcadora seleccionable o gen marcador seleccionable:** es un gen introducido en una célula que confiere un rasgo adecuado para selección artificial. Son un tipo de gen reportero usado en microbiología de laboratorio, biología molecular e ingeniería genética para indicar el éxito de una transfección u otro procedimiento que se pretende que introduzca ADN ajeno en una célula. Los marcadores seleccionables son con frecuencia genes de resistencia a antibióticos; se cultivan bacterias que se han sometido a un procedimiento para introducir ADN ajeno en un medio que contiene un antibiótico, y las colonias bacterianas que pueden crecer han captado con éxito y han expresado el material genético introducido.
- 10 • **Transformación o transfección:** como se usa en el presente documento, se refiere a la introducción de ADN ajeno en las células (por ejemplo, células procariontas o eucariotas). La transformación puede conseguirse por una diversidad de medios conocidos en la técnica incluyendo coprecipitación de ADN con fosfato cálcico, 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 incluye un antibiótico adecuado en el medio de cultivo celular para la selección de las 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 se van a seleccionar con un antibiótico. Aunque podría usarse transfección transitoria en los métodos de la presente invención son células preferidas las hechas estables por selección de antibióticos.
- 15 • **Expresión mejorada del receptor GPCR en la superficie de células:** esta expresión significa en el contexto de la presente memoria descriptiva, que la expresión de dichos receptores aumenta cualitativamente (más expresión por célula) o cuantitativamente (más células que lo expresan). Ese concepto por lo tanto también significa o comprende el hecho experimental de que las células que no expresaron el GPCR en su superficie, comienzan a expresarlo. Por analogía, el término "sobreexpresión" con respecto a la presente descripción significa lo mismo, cambiando lo que deba cambiarse, que la expresión expresión mejorada cuando hace referencia a la expresión cualitativa por célula.
- 20 • **Comprendiendo:** este término, a lo largo de la presente descripción de patente, incluye, específicamente, el término "consistiendo", cuando se refiere, particularmente, a secuencias biológicas, como secuencias de aminoácidos o nucleótidos. Significa que la secuencia puede comprender un fragmento en el que reside principalmente la invención, tomada como actividad biológica o efecto técnico, opcionalmente junto con otros fragmentos de secuencia o partes de secuencia; o simplemente, restringiéndose precisamente al fragmento como tal.

35 Una realización de la presente invención se refiere al uso de una secuencia de ácido nucleico como se representa en SEQ ID NO: 2 o una secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos como se representa en SEQ ID NO: 9 o una secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos LAAMAPGAAVGA o una secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos LAAMAPGATVGT, para mejorar la expresión en la superficie celular de un receptor acoplado a proteína G eucariota (GPCR) en células eucariotas *in vitro*. En una realización preferida el receptor eucariota GPCR se sobreexpresa en células eucariotas *in vitro*. Otra realización de la presente invención se refiere a una secuencia de ácido nucleico aislada como se representa en SEQ ID NO: 2 o una secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos como se representa en SEQ ID NO: 9 o una secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos LAAMAPGAAVGA o una secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos LAAMAPGATVGT.

45 Otra realización de la presente invención, se refiere a una secuencia de ácido nucleico que codifica un receptor acoplado a proteína G (GPCR) que comprende un GPCR eucariota y la secuencia de aminoácidos como se representa en SEQ ID NO: 9 o la secuencia de aminoácidos LAAMAPGAAVGA o la secuencia de aminoácidos LAAMAPGATVGT, en la que la secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos como se representa en SEQ ID NO: 9 se representa en SEQ ID NO: 2. En una realización aún preferida dicha secuencia de ácido nucleico comprende además una secuencia de nucleótidos que codifica un péptido señal para mejorar la expresión en la superficie y/o secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia etiqueta para la detección en la superficie celular y/o separación de células que expresan de forma positiva la secuencia de ácido nucleico. En una realización aún preferida, la secuencia comprende además un promotor, en el que dicho promotor es un promotor inducible o un promotor constitutivo; en el que el promotor inducible se selecciona de: promotor inducible por tetraciclina, promotor inducible por ecdisoma, promotor inducible por cumato y promotor inducible por progesterona; y el promotor constitutivo se selecciona del grupo de secuencias que consiste en SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6.

60 Otra realización de la presente invención se refiere a un vector de expresión, preferentemente un plásmido, que comprende la secuencia de ácido nucleico descrita anteriormente o como se representa en SEQ ID NO: 7.

Otra realización de la presente invención se refiere a una célula no humana transfectada con las secuencias de ácido nucleico anteriormente citadas o con dicho plásmido o vector de expresión. En una realización preferida la célula aislada es una célula eucariota preferentemente una célula hematopoyética.

Otra realización de la presente invención se refiere al uso de las células anteriormente mencionadas para cribar la actividad o influencia de compuestos candidatos en un GPCR eucariota.

5 Otra realización de la presente invención se refiere a un GPCR que comprende un GPCR eucariota y las secuencias de aminoácidos como se representan en SEQ ID NO: 9, o la secuencia de aminoácidos LAAMAPGAAVGA o la secuencia de aminoácidos LAAMAPGATVGT.

10 Otra realización de la presente invención se refiere al uso de dicho GPCR para cribar la influencia de compuestos candidatos en un receptor eucariota GPCR.

Otra realización de la presente invención se refiere a una fracción de membrana celular que comprende el GPCR descrito anteriormente.

15 Otra realización de la presente invención se refiere al uso de dicha fracción de membrana celular para cribar la influencia de compuestos candidatos en un receptor eucariota GPCR.

20 Otra realización de la presente invención se refiere al kit para ensayar la interacción de un compuesto candidato con un GPCR eucariota que comprende una línea celular de acuerdo con las células anteriormente descritas, o dicha fracción de membrana celular que comprende el GPCR, o el GPCR anteriormente mencionado y un sustrato para determinación de la actividad del receptor eucariota. En una realización preferida, el sustrato es un sustrato fluorescente para medir la elevación de calcio intracelular, un sustrato de aequorina o un sustrato para medir la exocitosis regulada por células.

25 Otra realización de la presente invención se refiere a un método *in vitro* para ensayar la interacción de un compuesto candidato con un receptor eucariota GPCR que comprende la adición del compuesto candidato a un medio de cultivo junto con una línea celular de acuerdo con las células anteriormente mencionadas, o con dicha fracción de membrana celular que comprende GPCR, o el GPCR anteriormente mencionado y la determinación de la actividad de GPCR eucariota. En una realización preferida la determinación de la actividad del GPCR eucariota se lleva a cabo por medio de un sustrato, en el que el sustrato se selecciona de: un sustrato fluorescente para medir la elevación de calcio intracelular, un sustrato de aequorina o un sustrato para medir la exocitosis regulada por células.

Breve descripción de las figuras

35 **Figura 1.** 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 inmunoglobulina de ratón, una etiqueta c-myc para la detección en la superficie con anticuerpo monoclonal anti-cmyc y una secuencia derivada de GPCR viral para la sobreexpresión bajo el control del promotor MoMLV5'LTR (A) o bajo el control del promotor inducible por tetraciclina (B).

40 Ejemplos

Ejemplo 1. Influencia de las combinaciones de promotores, péptidos señal y la secuencia heteróloga del GPCR viral para la expresión del GPCR en la superficie de células hematopoyéticas.

45 Se desarrollaron vectores para la expresión estable de GPCRs en células hematopoyéticas con exocitosis regulada profesional bajo el control de los siguientes promotores: 5'-LTR de virus de la leucemia de Moloney (MoMLV5'LTR, SEQ ID NO: 6), promotor de fosfoglicerato quinasa humana (SEQ ID NO: 4) y promotor del factor de elongación 1 alfa humano (hEF1alfa, SEQ ID NO: 3). Todos los vectores tuvieron el gen de resistencia a neomicina para la selección de células eucariotas estables, el péptido señal de la inmunoglobulina kappa de ratón seguido de una etiqueta c-myc (péptido EQKLISEEDLN) y el GPCR completo sin la metionina en la posición 1. Cada vector se introdujo individualmente por electroporación 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-etiqueta cmyc (anti-cmyc-FITC, clon 9E10, Sigma-Aldrich, Estados Unidos) para expresión en superficie. Basándose en la expresión en la superficie, los GPCRs se clasificaron en tres categorías: GPCRs que eran positivos con todos los promotores ensayados con el receptor de interleucina 8 humano como prototipo; GPCRs 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 promotor 5'-LTR de virus de leucemia de Moloney) y GPCRs que eran negativos con todos los promotores ensayados con el receptor HTR1B como prototipo. Por lo tanto, se desarrollaron nuevos vectores con el receptor HTR1B humano como un prototipo de un receptor que es difícil de expresar en células hematopoyéticas como RBL-2H3. Se desarrollaron vectores para la expresión estable de HTR1B humano en células RBL-2H3 con exocitosis regulada profesional bajo el control de los siguientes promotores: 5'-LTR de virus de la leucemia de Moloney (MoMLV5'LTR, SEQ ID NO: 6), promotor de fosfoglicerato quinasa humana (SEQ ID NO: 4) y promotor del factor de elongación 1 alfa humano (hEF1alfa, SEQ ID NO: 3). 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 una etiqueta c-myc (péptido EQKLISEEDLN), una

secuencia derivada de una secuencia de GPCR viral (VGS, SEQ ID NO: 2) y el HTR1B humano completo sin la metionina en la posición 1. Dicha secuencia heteróloga derivada de GPCR viral se incluyó para probar si la expresión en superficie se mejora mediante ciertas secuencias heterólogas derivadas de GPCR viral. Cada vector se introdujo individualmente por electroporación 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 selección. Después de la selección durante aproximadamente 2 semanas, las células se analizaron por citometría de flujo (Guava Technologies, Estados Unidos) con anticuerpo anti-etiqueta cmyc (anti-cmyc-FITC, clon 9E10, Sigma-Aldrich, Estados Unidos) para 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-etiqueta 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. Para las células positivas se tomó la intensidad de fluorescencia media (IFM) como un marcador de la densidad de receptor en la superficie de las células positivas. Los resultados se muestran en la siguiente **Tabla 1**:

Tabla 1

Promotor	Secuencia derivada de GPCR viral (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 hEF1 alfa	No VGS	<2	-
Promotor hEF1 alfa	Sí	10	56,9
Promotor MoMLV5'LTR	No VGS	<2	-
Promotor MoMLV5'LTR	Sí	13,7	40,3
Promotor VSR	No VGS	5	29,3
Promotor VSR	Sí	5,6	82,4

Por lo tanto, para HTR1B la inclusión de una secuencia heteróloga derivada de GPCR viral en el vector para aumentar la expresión en la superficie fue positiva con todos los promotores ensayados. Curiosamente, para un nuevo promotor ensayado con respecto a la expresión de HTR1B, la inclusión de una secuencia heteróloga derivada de GPCR viral 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 que incluía la VGS y el promotor hEF1alfa o el promotor MoMLV-5'LTR y los vectores transfectados de forma estable con el VGS, rindieron casi igual o mejor que sus homólogos negativos para VGS. Dichos GPCRs ensayados hasta la fecha incluyeron: BDKRB1, AGTR1, CX3CR1, GRM4, AVPR2, DRD1, DRD2, EDNRB, TACR3, ADORA3, HTR1B, CHRM2, IL8RA, NPY1R, ADRA2A, ADRAB2, CCKBR, SSTR2, MC1R, BB2R y CHHR1. Los mismos resultados también sucedieron en otras células hematopoyéticas como las células 32D y P815 y los resultados mostrados para HTR1B en RBL-2H3 son representativos del efecto de una secuencia heteróloga derivada de GPCR viral en la expresión en la superficie de todos los GPCRs ensayados en varias líneas celulares hematopoyéticas. Por lo tanto, los resultados anteriores indican que la adición de una secuencia heteróloga derivada de GPCR viral a un GPCR mejora la expresión en la superficie y es por lo tanto útil para los métodos de la presente invención.

Ejemplo 2. Influencia de la secuencia heteróloga derivada de GPCR viral para expresión en la superficie de GPCRs en otras células eucariotas.

Se desarrollaron vectores para la expresión estable de GPCRs en células hematopoyéticas sin exocitosis regulada profesional bajo el control del 5'-LTR de virus de la leucemia de Moloney (MoMLV5'LTR, SEQ ID NO: 6), un buen promotor para la expresión de GPCRs ensayados previamente para más de 20 GPCRs diferentes. El vector tenía el gen de resistencia a neomicina para la selección de células eucariotas estables, el péptido señal de la inmunoglobulina kappa de ratón seguido de una etiqueta c-myc (péptido EQKLISEEDLN) y el GPCR HT1BR completo sin la metionina en la posición 1. Este GPCR es un prototipo de un receptor que es difícil de expresar en RBL-2H3. Se desarrollaron dos vectores: uno con una secuencia heteróloga derivada de GPCR viral (VGS) y uno sin VGS. Cada vector se introdujo individualmente por electroporación usando un microporador (Digital Bio Technology, Corea del Sur) en WEHI-3B, una línea celular de leucemia mielomonocítica de ratón (DSMZ, ACC26) y en BW5147.G.1.4.ovar.1, una línea de linfocitos T de linfoma de ratón (cultivos HPA, Cat. n.º 88100507) y después de 48 horas se añadió neomicina 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 anticuerpo anti-etiqueta cmyc (anti-cmyc-FITC, clon 9E10, Sigma-Aldrich, Estados Unidos) para expresión en la superficie. Los resultados se muestran en la siguiente **Tabla 2**:

Tabla 2

Promotor	Secuencia derivada de GPCR viral (VGS) en vector (sí o no)	Porcentaje de células positivas después de selección	Intensidad de fluorescencia media de células positivas (IFM)
Células WEHI 3B			
Promotor MoMLV5'LTR	No VGS	30,58	16,92
Promotor MoMLV5'LTR	Sí	50,24	18,81
Células BW5147			
Promotor MoMLV5'LTR	No VGS	2,70	20,90
Promotor MoMLV5'LTR	Sí	39,6	17,13

Por lo tanto, la inclusión de una secuencia derivada heteróloga de GPCR viral en el vector aumenta la expresión en la superficie de HT1BR tanto en células WEHI-3B como en células BW5147. Aunque en la primera línea celular la mejora es de aproximadamente el 30 % a aproximadamente el 50 % para una relación de 1,6 veces, el efecto en las células BW5147 es aproximadamente 15 veces mayor porcentaje de células con expresión en superficie. Por tanto, VGS es una secuencia que cuando se añade al extremo amino terminal del GPCR mejora su expresión en la superficie en líneas celulares hematopoyéticas sin exocitosis profesional.

10 Ejemplo 3. Influencia de la secuencia heteróloga derivada de GPCR viral en la expresión en la superficie de GPCRs en células no hematopoyéticas.

Se desarrollaron vectores para la expresión estable de GPCRs en células de mamífero bajo el control de los siguientes promotores: 5'-LTR de virus de la leucemia de Moloney (MoMLV5'LTR, SEQ ID NO: 6), promotor de fosfoglicerato quinasa humano (SEQ ID NO: 4) y promotor de factor de elongación 1 alfa humano (hEF1alfa, SEQ ID NO: 3). Todos los vectores tuvieron el gen de resistencia a neomicina para selección de las células eucariotas estables, el péptido señal de la inmunoglobulina kappa de ratón seguido de una etiqueta c-myc (péptido EQKLISEEDLN), una secuencia heteróloga derivada de un GPCR viral (VGS, SEQ ID NO: 2) y el HTR1B de humano completo sin la metionina en la posición 1. Dicha secuencia heteróloga derivada de GPCR viral se incluyó para probar si la expresión en la superficie mejora por ciertas secuencias derivadas de GPCR viral heterólogo en líneas celulares no hematopoyéticas. Cada vector se introdujo individualmente por electroporación usando un microporador (Digital Bio Technology, Corea del Sur) en células HEK293 (DSMZ, ACC305) y después de 48 horas se añadió neomicina a 1000 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 anticuerpo anti-etiqueta cmyc (anti-cmyc-FITC, clon 9E10, Sigma-Aldrich, Estados Unidos) para la expresión en la superficie. Los resultados se expresaron como el porcentaje de células positivas después de restar los valores de las células HEK293 no transfectadas incubadas con el mismo anticuerpo anti-etiqueta 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. Para las células positivas se tomó la intensidad de fluorescencia media (IFM) como un marcador de densidad del receptor de superficie en la superficie de células positivas. Los resultados se muestran en la siguiente **Tabla 3**:

Tabla 3

Promotor	Secuencia derivada de GPCR viral (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	6,88	28,36
Promotor hPGK	Sí	14,48	38,96
Promotor hEF1alfa	No VGS	11,48	29,85
Promotor hEF1alfa	Sí	17,52	46,51
Promotor MoMLV5'LTR	No VGS	5,76	32,79
Promotor MoMLV5'LTRr	Sí	15,48	38,66
Promotor VSR	No VGS	<2	-
Promotor VSR	Sí	3,74	29,16

Por lo tanto, para HTR1B transfectado de forma estable en HEK293, una línea celular no hematopoyética ampliamente usada de riñón embrionario humano, la inclusión de una secuencia heteróloga derivada de GPCR viral en el vector aumenta la expresión en la superficie para todos los promotores ensayados. El MoMLV5'LTR que es un buen promotor para expresión de GPCR en líneas celulares hematopoyéticas, es también un buen promotor para HEK293 y la inclusión de una VGS mejora 2,7 veces el porcentaje de células positivas. Este ejemplo demuestra que las secuencias derivadas de GPCR virales heterólogos son útiles para expresión en superficie de GPCR en células heterólogas y esta mejora no está limitada a células hematopoyéticas, sino también a otras células eucariotas.

Ejemplo 4: influencia de mutaciones de VGS en la expresión en la superficie de GPCRs.

Se desarrollaron vectores para la expresión estable de HTR1B sin la metionina en la posición 1 en células de mamífero bajo el control del promotor 5'-LTR de virus de la leucemia de Moloney (MoMLV5'LTR, SEQ ID NO: 6).
 5 Todos los vectores tenían el gen de resistencia a neomicina para la selección de células eucariotas estables y el péptido señal de la inmunoglobulina kappa de ratón seguido de una etiqueta c-myc (péptido EQKLISEEDLN). Los vectores incluyeron sin VGS, VGS nativa o dos mutantes de VGS (mutante de VGS 1 y mutante de VGS 2). Este experimento se diseñó para ensayar si la serina y la treonina en VGS que representan sitios potenciales de N-glicosilación son los determinantes moleculares de expresión mejorada en la superficie. En los mutantes de VGS 1
 10 las 5 serinas y treoninas se mutaron a alanina mientras que en el mutante de VGS 2 todas las serinas se mutaron y las 2 treoninas aún estaban presentes.

Las secuencias de los diferentes VGS usadas en este experimento son las siguientes:

- 15 • VGS corta nativa (LSTMAPGSTVGT).
- Mutante VGS 1 (LAAMAPGA AVGA).
- Mutante VGS 2 (LAAMAPGATVGT).

Cada vector se introdujo individualmente por electroporación por triplicado 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 anticuerpo anti-etiqueta cmyc (anti-cmyc-FITC, clon 9E10, Sigma-Aldrich, Estados Unidos) para la expresión en superficie. Se separaron las células seleccionadas usando perlas magnéticas de Miltenyi anti-etiqueta cmyc. Los resultados se expresaron como el porcentaje de células positivas
 25 después de restar los valores de las células RBL-2H3 no transfectadas incubadas con el mismo anticuerpo anti-etiqueta cmyc. Para las células positivas se tomó la mediana de intensidad de fluorescencia (mediana x) como un marcador de densidad del receptor de superficie en la superficie de las células positivas. Los resultados se muestran en la siguiente **Tabla 4**:

Tabla 4

Tipo de VGS usado para expresión	Porcentaje de células positivas después de la selección (intervalo)	Intensidad de fluorescencia mediana de células positivas, mediana x (intervalo)
Sin VGS	41,0 (39,8-42,1)	33,8 (33,3-34,3)
VGS nativa	50,2 (49,2-51,1)	89,3 (87,7-90,9)
Mutante VGS 1	49,1 (47,5-50,7)	45,6 (44,9-46,2)
Mutante VGS 2	49,2 (48,2-50,2)	62,4 (60,6-64,2)

Los resultados anteriores indican que la inclusión de la VGS nativa mejora la expresión en la superficie celular, ya que el porcentaje de células positivas aumentó del 41 % al 50 % pero también la mediana de la intensidad de fluorescencia de las células positivas aumentó de 33,8 a 89,3, es decir, aumentó 2,6 veces. Además, los resultados
 35 anteriores indican que la mutación de serina y treonina que se predijo por ordenador que sería O-glicosilada (mutante VGS 2) redujo la intensidad de fluorescencia mediana de 89,3 a 62,4, es decir redujo la mediana 1,43 veces pero no hubo ninguna variación en el porcentaje de células positivas por dicha mutación, mientras que la mutación de todas las serinas y treoninas de VGS, incluyendo las que no se predice que estén glicosiladas, redujo la mediana de intensidad de fluorescencia de 89,3 a 45,6, es decir aproximadamente a 2 veces, pero de nuevo no
 40 cambió el porcentaje de células positivas. Los resultados anteriores demuestran que el efecto de las secuencias de GPCR derivadas de virus en la expresión en la superficie de GPCRs es en parte, pero no completamente, debido a serinas y treoninas. Si dichas serinas y treoninas están glicosiladas no se sabe en la actualidad pero si lo estuvieran, entonces otras propiedades distintas de la O-glicosilación potencial también explican por qué la VGS mejora la expresión en la superficie de celular de los GPCRs.
 45

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Canvax Biotech S.L.

5 <120> SECUENCIAS HETERÓLOGAS DERIVADAS DE GPCR VIRAL Y USOS DE LAS MISMAS

<130> PCT-05143

<160> 9

10 <170> BiSSAP 1.0

<210> 1

<211> 105

15 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

20 <222> 1..105

<223> /mol_type = "ADN"

/nota = "Secuencia heteróloga derivada de GPCR viral (VGS)"

/organismo = "Secuencia artificial"

25 <400> 1

ctgagcaciaa tggccccagg ctccaccgtg ggaacactcg atgccaacat gaccagcgtg 60

aatgccacag aggacgcctg caccaagagc tacagcgcct tcctc 105

<210> 2

30 <211> 36

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

35 <222> 1..36

<223> /mol_type = "ADN"

/nota = "Secuencia heteróloga derivada de GPCR viral (secuencia más corta de VGS)"

/organismo = "Secuencia artificial"

40 <400> 2

ctgagcaciaa tggccccagg ctccaccgtg ggaaca 36

<210> 3

45 <211> 1205

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

50 <222> 1..1205

<223> /mol_type = "ADN"

/nota = "Promotor del factor de elongación humano 1 alfa "

/organismo = "Secuencia artificial"

55 <400> 3

ES 2 592 263 T3

ttgctgactt gcgtgaggct ccggtgcccc tcagtgggca gagcgcacat cccccacagt 60
 cccccgagaag ttgggggggag gggtcggcaa ttgaaccggt gcctagagaa ggtggcgagg 120
 ggtaaactgg gaaagtgatg tcgtgtactg gctccgcctt tttcccaggg gtgggggaga 180
 accgtatata agtgcagtag tcgccgtgaa cgttcttttt cgcaacgggt ttgccgccag 240
 aacacaggta agtgccgtgt gtggttcccc cgggcctggc ctctttacgg gttatggccc 300
 ttgctgacct tgaattactt ccacgcccc ttgctgagta cgtgattctt gatccccgagc 360
 ttcgggttgg aagtgggtgg gagagtcca ggccttgccg ttaaggagcc ccttcgcctc 420
 gtgcttgagt tgaggcctgg cctgggcgct ggggccgccg cgtgcgaatc tgggtggcacc 480
 ttcgagcctg tctcgtgct ttcgataagt ctctagccat ttaaaatfff tgatgacctg 540
 ctgagacgct ttttttctgg caagatagtc ttgtaaattc gggccaagat ctgcacactg 600
 gtatttcggt ttttggggcc gcgggcggcg acggggcccc tgcgtcccag cgcacatggt 660
 cggcgaggcg gggcctgcga gcgcggccac cgagaatcgg acgggggtag tctcaagctg 720
 gccggcctgc tctggtgcct ggcctcgcgc cgccgtgat cggccccccc tgggaggcaa 780
 ggctggcccc gtcggcacca gttgctgag cggaaagatg gccgcttccc ggcctgctg 840
 cagggagctc aaaatggagg acgcggcgct cgggagagcg ggcgggtgag tcaccacac 900
 aaaggaaaag ggcctttccg tcctcagccg tcgcttcatt tgactccacg gagtaccggg 960
 cgccgtccag gcacctgat tagttctcga gcttttggag tacgtcgtct ttaggttggg 1020
 gggaggggtt ttatgcgatg gagtttcccc acactgagtg ggtggagact gaagttaggc 1080
 cagcttgcca cttgatgtaa ttctccttgg aatttgcct ttttgagttt ggatcttggg 1140
 tcattctcaa gcctcagaca gtggttcaaa gtttttttct tccatttcag gtgtcgtgct 1200
 agctt 1205

5 <210> 4
 <211> 790
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 10 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..790
 <223> /mol_type = "ADN"
 /nota = "Promotor de fosfoglicerato quinasa humana"
 /organismo = "Secuencia artificial"
 15 <400> 4

ES 2 592 263 T3

agatctcccg atcccctatg gtgcaactctc agtacaatct gctctgatgc cgcataagtta 60
agccagtatc tgctccctgc ttgtgtgttg gaggtcgtg agtagtgccg gagcaaaatt 120
taagctacaa caaggcaagg cttgaccgac aattgcatga agaactctgct tagggttagg 180
cgttttgctg tgcttcgca tgtacgggcc agatatacgc gttgacattg attattgact 240
agagtcatac ctgtttgat ccaaccgggt aggggaggcg cttttcccaa ggcagtctgg 300
agcatgcgct ttagcagccc cgctgggcac ttggcgctac acaagtggcc tctggcctcg 360
cacacattcc acatccaccg gtaggcgcca accggctccg ttctttggtg gcccttcgc 420
gccaccttct actcctcccc tagtcaggaa gttccccccc gccccgcagc tcgctcgtg 480
caggacgtga caaatggaag tagcacgtct cactagtctc gtgcagatgg acagcaccgc 540
tgagcaatgg aagcgggtag gcctttgggg cagcggccaa tagcagctt gctccttcgc 600
tttctgggct cagaggctgg gaaggggtgg gtccgggggc gggctcaggg gcgggctcag 660

gggcggggcg ggcgcccga ggtcctccgg aggccggca ttctgcacgc ttcaaagcg 720
cacgtctgcc gcctgtcct cctcttctc atctcgggct cgagtaggaa ttatctcgg 780
cctagctagc 790

5 <210> 5
<211> 428
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<221> fuente
<222> 1..428
<223> /mol_type = "ADN"
/nota = "Promotor del virus del sarcoma de Rous"
/organismo = "Secuencia artificial"

15 <400> 5

cgacctcatg gctgcgcccc gacacccgcc aacaccgct gacgcctgac gggcttgtct 60
gctcccggca tccgcttaca gacaagctgt gaccgtctcc gggagctgca tgtgtcagag 120
gttttcaccg tcatcaccga aacgcgcgag gcagccggat cataatcagc cataccacat 180
ttgtagaggt ttacttgct ttaaaaaacc tcccacacct cccctgaac ctgaaacata 240
aaatgaatgc aattgtgtt gtttaactgt ttattgcagc ttataatggt tacaataaa 300
gcaatagcat cacaaattc acaaataaag cattttttc actgcattct agttgtggtt 360
tgtccaaact catcaatgta tcttatcatg tctggatccg gccttgccgg cctcgagcgg 420
ccgctagc 428

20 <210> 6
<211> 479
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<221> fuente
<222> 1..479
<223> /mol_type = "ADN"

ES 2 592 263 T3

/nota = "Promotor MoMLV-5'LTR"
/organismo = "Secuencia artificial"

<400> 6

5 agtctccaga aaaagggggg aatgaaagac cccacctgta ggtttggcaa gctagcttaa 60
 gtaacgccat tttgcaaggc atggaaaaat acataactga gaatagagaa gttcagatca 120
 aggtcaggaa cagatggaac agctgaatat gggccaaaca ggatatctgt ggtaagcagt 180
 tcctgccccg gctcagggcc aagaacagat ggaacagctg aatatgggcc aaacaggata 240
 tctgtggtaa gcagttcctg ccccggetca gggccaagaa cagatgggcc ccagatgcgg 300
 tccagccctc agcagtttct agagaacat cagatgtttc cagggtgccc caaggacctg 360
 aatgaccct gtgccttatt tgaactaacc aatcagttcg cttctcgctt ctgttcgcgc 420
 gcttctgctc cccgagctca ataaaagagc ccacaacccc tcaactcgggg cgccagtcc 479

<210> 7

<211> 5348

10 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

15 <222> 1..5348

<223> /mol_type = "ADN"

/nota = "Vector con la estructura PMo-MLV-5'LTR-SP-cmyc-VGS-MCS-poliA"

/organismo = "Secuencia artificial"

20 <400> 7

ES 2 592 263 T3

gacggatcgg gagatctccc gatcccctat ggtgcaactc cagtacaatc tgctctgatg	60
ccgcatagtt aagccagtat ctgctccctg cttgtgtggt ggaggctcgt gagtagtgcg	120
cgagcaaaat ttaagctaca acaaggcaag gcttgaccga caattgcatg aagaatctgc	180
ttagggttag gcgttttgcg ctgcttcgtg atatcgaatt cagtctccag aaaaaggggg	240
gaatgaaaga ccccacctgt aggtttggca agctagctta agtaacgcca ttttgcaagg	300
catggaaaaa tacataactg agaatagaga agttcagatc aaggtcagga acagatggaa	360
cagctgaata tgggccaaac aggatatctg tggtaagcag 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 gcttctcgtc tctgttcgcg cgcttctgct ccccagctc	660
aataaaagag cccacaacct ctcaactcggg gcgccagtcc aagcttggta ccgagctcgg	720
atcgatcatg gagacagaca cactcctgct atgggtactg ctgctctggg ttccaggttc	780
caccggtgac gaacaaaaac tcatctcaga agaggatctg gggccatcgc gactgagcac	840
aatggcccca ggctccaccg tgggaacact cgagggatcc gcggccgctc tagagggccc	900
tattctatag tgtcacctaa atgctagagc tcgctgatca gcctcgactg tgccttctag	960
ttgccagcca tctgttgttt gccctcccc cgtgccttcc ttgacctgg aaggtgccac	1020
tcccactgtc ctttccctaat aaaatgagga aattgcatcg cattgtctga gtaggtgtca	1080
ttctattctg gggggtgggg tggggcagga cagcaagggg gaggattggg aagacaatag	1140
caggcatgct ggggatgcgg tgggctctat ggcttctgag gcggaaagaa ccagctgggg	1200
ctctaggggg tatccccacg cgccctgtag cggcgcatta agcgcggcgg gtgtggtggt	1260
tacgcgcagc gtgaccgcta cacttgccag cgccctagcg cccgctcctt tcgcttctt	1320
cccttcctt ctcgccacgt tcgccggctt tccccgtaa gctctaaatc gggggctccc	1380
tttagggttc cgatttagtg ctttacggca cctcgacccc aaaaaacttg attagggtga	1440
tggttcacgt agtgggcat cgccctgata gacggttttt cgccctttga cgttgagtc	1500
cacgttcttt aatagtggaac tcttgttcca aactggaaca aactcaacc ctatctcgg	1560
ctattctttt gatttataag ggattttgcc gatttcggcc tattggttaa aaaatgagct	1620
gatttaacaa aaatttaacg cgaattaatt ctgtggaatg tgtgtcagtt aggggtgga	1680
aagtccccag gctccccagc aggcagaagt atgcaaagca tgcactcaaa ttagtcagca	1740

ES 2 592 263 T3

accaggtgtg gaaagtcccc aggctcccca gcaggcagaa gtatgcaaag catgcatctc 1800
 aattagtcag caaccatagt cccgccccta actccgcccc tcccgccct aactccgcc 1860
 agttccgccc attctccgcc ccatggctga ctaatTTTTT ttatttatgc agaggccgag 1920
 gccgcctctg cctctgagct attccagaag tagtgaggag gctTTTTTgg aggcctaggc 1980
 ttttgcaaaa agctcccggg agcttgata tccattttcg gatctgatca agagacagga 2040
 tgaggatcgt ttcgcatgat tgaacaagat ggattgcacg caggttctcc ggccgcttgg 2100
 gtggagaggc tattcggcta tgactgggca caacagacaa tcggctgctc tgatgccgcc 2160
 gtgttccggc tgtcagcgca ggggcgcccg gttctTTTTg tcaagaccga cctgtccggt 2220
 gccctgaatg aactgcagga cgaggcagcg cggctatcgt ggctggccac gacgggcgtt 2280
 ccttgcgag ctgtgctcga cgttgtcact gaagcgggaa gggactggct gctattgggc 2340
 gaagtgccgg ggcaggatct cctgtcatct caccttgctc ctgccgagaa agtatccatc 2400
 atggctgatg caatgcggcg gctgcatacg cttgatccgg ctacctgcc attcgaccac 2460
 caagcgaac atcgcacga gcgagcacgt actcggatgg aagccggtct tgctgatcag 2520
 gatgatctgg acgaagagca tcaggggctc gcgccagccg aactgttcgc caggctcaag 2580
 gcgcgcatgc ccgacggcga ggatctcgtc gtgacctatg gcgatgcctg cttgccgaat 2640
 atcatggtgg aaaatggccg ctttctgga ttcacgact gtggccggct ggggtgtggc 2700
 gaccgctatc aggacatagc gttggctacc cgtgatattg ctgaagagct tggcggcgaa 2760
 tgggctgacc gcttctcgt gctttacggt atcggcctc ccgattcgca gcgcatcgcc 2820
 ttctatcgcc ttcttgacga gttcttctga gcgggactct ggggttcgaa atgaccgacc 2880
 aagcgacgcc caacctgcca tcacgagatt tcgattccac cgccgcctc tatgaaaggt 2940
 tgggcttcgg aatcgtttc cgggacgccg gctggatgat cctccagcg ggggatctca 3000
 tgctggagtt cttcgccac cccaactgt ttattgcagc ttataatgg tacaataaaa 3060
 gcaatagcat cacaaattc acaataaag cattttttc actgcattct agttgtggtt 3120
 tgtccaaact catcaatgta tcttatcatg tctgtatacc gtcgacctct agctagagct 3180
 tggcgtaatc atggcatag ctgtttcctg tgtgaaattg ttatccgctc acaattccac 3240
 acaacatacg agccggaagc ataaagtga aagcctggg tgccaatga gtgagctaac 3300
 tcacattaat tgcgttgcg tcactgccg cttccagtc gggaaacctg tcgtgccagc 3360
 tgcattaatg aatcgccaa cgcgcgggga gaggcggtt gcgtattgg cgctcttccg 3420
 cttcctcgt cactgactcg ctgcgctcgg tcgttcggct gcggcgagcg gtatcagctc 3480
 actcaaaggc ggtaatacgg ttatccacag aatcagggga taacgcagga aagaacatgt 3540
 gagcaaaagg ccagcaaaag gccaggaacc gtaaaaaggc cgcgttgctg gcgttttcc 3600
 ataggctccg cccccctgac gagcatcaca aaaatcgacg ctcaagtca aggtggcgaa 3660
 acccgacagg actataaaga taccaggcgt tccccctgg aagctccctc gtgcgctctc 3720
 ctgttccgac cctgccgctt accggatacc tgtccgcctt tctccctcg ggaagcgtgg 3780

ES 2 592 263 T3

cgctttctca tagctcacgc tgtaggtatc tcagttcggg gtaggtcgtt cgctccaagc 3840
 tgggctgtgt gcacgaacc cccgttcagc ccgaccgctg cgccttatcc ggtaactatc 3900
 gtcttgagtc caaccggta agacacgact taticgccact ggcagcagcc actggtaaca 3960
 ggattagcag agcgaggtat gtaggcggtg ctacagagtt cttgaagtgg tggcctaact 4020
 acggctacac tagaagaaca gtatttggtg tctgcgctct gctgaagcca gttaccttcg 4080
 gaaaaagagt tggtagctct tgatccggca aacaaaccac cgctggtagc ggtttttttg 4140
 tttgcaagca gcagattacg cgcagaaaaa aaggatctca agaagatcct ttgatctttt 4200
 ctacggggtc tgacgctcag tggaacgaaa actcacgtta agggattttg gtcattgagat 4260
 tatcaaaaag gatcttcacc tagatccttt taaattaaat atgaagtttt aaatcaatct 4320
 aaagtatata tgagtaaact tggctctgaca gttaccaatg cttaatcagt gaggcaccta 4380
 tctcagcgat ctgtctatct cgttcatcca tagttgcctg actccccgtc gtgtagataa 4440
 ctacgatacg ggagggctta ccatctggcc ccagtgtctg aatgataccg cgagaccac 4500
 gctcaccggc tccagattta tcagcaataa accagccagc cgggaagggc gagcgcagaa 4560
 gtggtcctgc aactttatcc gcctccatcc agtctattaa ttgttgccgg gaagctagag 4620
 taagtagttc gccagttaat agtttgcgca acgttgttgc cattgctaca ggcattcgtgg 4680
 tgtcacgctc gtcgtttggg atggcttcat tcagctccgg ttccaacga tcaaggcgag 4740
 ttacatgata ccccatggtg tgcaaaaaag cggttagctc ctteggctct ccgatcgttg 4800
 tcagaagtaa gttggccgca gtgttatcac tcatggttat ggcagcactg cataattctc 4860
 ttactgtcat gccatccgta agatgctttt ctgtgactgg tgagtactca accaagtcatt 4920
 tctgagaata gtgtatgcgg cgaccgagtt gctcttgccc ggcgtcaata cgggataata 4980
 ccgcgccaca tagcagaact ttaaaagtgc tcatcattgg aaaacgttct tcggggcgaa 5040
 aactctcaag gatcttaccg ctgttgagat ccagttcgat gtaaccact cgtgcacca 5100
 actgatcttc agcatctttt actttcacca gcgtttctgg gtgagcaaaa acaggaaggc 5160
 aaaatgccgc aaaaaaggga ataagggcga cacggaaatg ttgaatactc atactcttcc 5220
 tttttcaata ttattgaagc atttatcagg gttattgtct catgagcgga tacatatttg 5280
 aatgtattta gaaaaataaa caaatagggg ttccgcgcac atttccccga aaagtgccac 5340
 ctgacgctc 5348

<210> 8
 <211> 35
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> FUENTE
 <222> 1..35
 <223> /mol_type = "proteína"
 /nota = "Secuencia heteróloga derivada de GPCR viral (VGS)"
 /organismo = "Secuencia artificial"

<400> 8

ES 2 592 263 T3

Leu Ser Thr Met Ala Pro Gly Ser Thr Val Gly Thr Leu Asp Ala Asn

1 Met Thr Ser Val Asn Ala Thr Glu Asp Ala Cys Thr Lys Ser Tyr Ser
20 25 30 35
Ala Phe Leu

5 <210> 9
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<221> FUENTE
<222> 1..12
<223> /mol_type = "proteína"
/nota = "Secuencia heteróloga derivada de GPCR viral (secuencia más corta de VGS)"
/organismo = "Secuencia artificial"

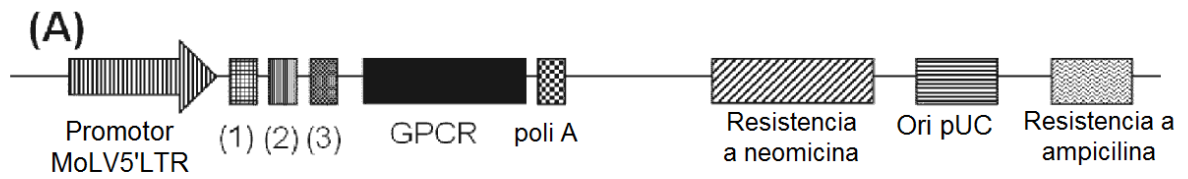
15 <400> 9

Leu Ser Thr Met Ala Pro Gly Ser Thr Val Gly Thr
1 5 10

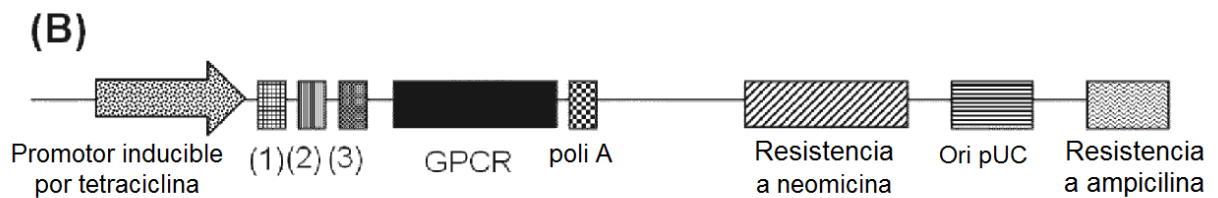
REIVINDICACIONES

1. Uso de una secuencia de ácido nucleico como se representa en SEQ ID NO: 2 o una secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos como se representa en SEQ ID NO: 9 o una secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos LAAMAPGAAVGA o una secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos LAAMAPGATVGT, para mejorar la expresión en superficie celular de un receptor acoplado a proteína G (GPCR) eucariota en células eucariotas *in vitro*.
2. Secuencia de ácido nucleico aislada como se representa en SEQ ID NO: 2 o una secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos como se representa en SEQ ID NO: 9 o una secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos LAAMAPGAAVGA o una secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos LAAMAPGATVGT.
3. Secuencia de ácido nucleico que codifica un GPCR que comprende un receptor eucariota GPCR y la secuencia de aminoácidos como se representa en SEQ ID NO: 9 o la secuencia de aminoácidos LAAMAPGAAVGA o la secuencia de aminoácidos LAAMAPGATVGT, en la que la secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos como se representa en SEQ ID NO: 9 se representa en SEQ ID NO: 2.
4. Secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 3, que comprende además una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia etiqueta para mejorar la expresión en superficie y/o una secuencia de nucleótidos que codifica un marcador de secuencia para la detección en superficie celular y/o separación de células que expresan positivamente la secuencia de ácido nucleico.
5. Secuencia de ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3 o 4, que comprende además un promotor, en el que dicho promotor es un promotor inducible o un promotor constitutivo; en el que el promotor inducible se selecciona de: promotor inducible por tetraciclina, promotor inducible por ecidisona, promotor inducible por cumato y promotor inducible por progesterona; y el promotor constitutivo se selecciona del grupo de secuencias que consiste en: SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6.
6. Vector de expresión, preferentemente un plásmido, que comprende la secuencia de ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, o como se representa en SEQ ID NO: 7.
7. Célula eucariota aislada que comprende la secuencia de ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, o el vector de expresión de la reivindicación 6, en la que dicha célula es preferentemente una célula hematopoyética.
8. Uso de la célula de la reivindicación 7 para exploración de la actividad o influencia de compuestos candidatos en el GPCR eucariota.
9. GPCR que comprende un GPCR eucariota y la secuencia de aminoácidos como se representa en SEQ ID NO: 9, o la secuencia de aminoácidos LAAMAPGAAVGA o la secuencia de aminoácidos LAAMAPGATVGT.
10. Fracción de membrana celular que comprende un GPCR quimérico de acuerdo con la reivindicación 9.
11. Uso del GPCR quimérico de acuerdo con la reivindicación 9 o de la fracción de membrana celular de acuerdo con la reivindicación 10, para exploración de la influencia de compuestos candidatos en un receptor eucariota GPCR.
12. Kit para ensayar la interacción de un compuesto candidato con un GPCR eucariota que comprende una célula de acuerdo con la reivindicación 7, o una fracción de membrana celular de acuerdo con la reivindicación 10, o un GPCR de acuerdo con la reivindicación 9 y un sustrato para la determinación de la actividad del GPCR eucariota.
13. Kit, de acuerdo con la reivindicación 12, en el que el sustrato es un sustrato fluorescente para medir el aumento de calcio intracelular, un sustrato de aequorina o un sustrato para medir la exocitosis regulada de células.
14. Método *in vitro* para ensayar la interacción de un compuesto candidato con un GPCR eucariota que comprende la adición del compuesto candidato a un medio de cultivo junto con una célula de acuerdo con la reivindicación 7, o con una fracción de membrana de acuerdo con la reivindicación 10, o con un GPCR de acuerdo con la reivindicación 9 y la determinación de la actividad de GPCR eucariota.
15. Método, de acuerdo con la reivindicación 14, en el que la determinación de la actividad de GPCR eucariota se lleva a cabo por medio de un sustrato, en el que el sustrato se selecciona de: un sustrato fluorescente para medir el aumento de calcio intracelular, un sustrato de aequorina o un sustrato para medir la exocitosis regulada de células.

FIGURA 1



- (1) Péptido señal de inmunoglobulina kappa
- (2) Etiqueta peptídica c-myc
- (3) Secuencia de GPCR viral derivada del gen BILF1 de EBV



- (1) Péptido señal de inmunoglobulina kappa
- (2) Etiqueta peptídica c-myc
- (3) Secuencia de GPCR viral derivada del gen BILF1 de EBV

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

5 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.

Literatura no patente citada en la descripción

- **WILKIE TM ; SCHERLE PA ; STRATHMAN MP ; SLEPAK VZ ; SIMON MI.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991, vol. 88, 10049-10053 [0005] [0008]
- **AMATRUDA TT. ; STEELE DA. ; SLEPAK VZ. ; SIMON MI.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991, vol. 88, 5587-5591 [0005] [0008]
- **KOZARSKY, KF et al.** *Mol. Cell. Biol.*, 1988, vol. 8 (8), 3357 [0014]

10