

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 617 515**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/705** (2006.01)

**C12N 15/62** (2006.01)

**G01N 33/68** (2006.01)

**G01N 33/74** (2006.01)

**G01N 33/542** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.01.2013 PCT/EP2013/050265**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.07.2013 WO2013104648**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.01.2013 E 13700636 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.12.2016 EP 2802600**

54 Título: **Método para identificar ligandos para receptores  $\sigma_1$**

30 Prioridad:

**10.01.2012 EP 12382003**

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

**19.06.2017**

73 Titular/es:

**LABORATORIOS DEL DR. ESTEVE, S.A. (100.0%)  
Avda Mare de Déu de Montserrat 221  
08041 Barcelona, ES**

72 Inventor/es:

**BURGUEÑO-HURTADO, JAVIER;  
CIRUELA ALFÉREZ, FRANCISCO y  
VELA HERNÁNDEZ, JOSÉ MIGUEL**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

ES 2 617 515 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

Método para identificar ligandos para receptores  $\sigma_1$

**Campo técnico de la invención**

5 La presente invención se refiere a una proteína de fusión que comprende el receptor sigma-1 ( $\sigma_1$ ) y dos fluoróforos y a su uso en un método para detectar un ligando del receptor  $\sigma_1$  usando transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET).

**Antecedentes de la invención**

10 La búsqueda de nuevos agentes terapéuticos se ha visto enormemente favorecida en los últimos años por un mejor entendimiento de la estructura de proteínas y otras biomoléculas asociadas con enfermedades objetivo. Una clase importante de estas proteínas es el receptor sigma ( $\sigma$ ), un receptor de superficie celular del sistema nervioso central (SNC) que puede estar relacionado con los efectos disfóricos, alucinógenos y estimulantes cardiacos de los opioides. A partir de estudios de la biología y la función de los receptores  $\sigma$ , se han presentado evidencias de que los ligandos de receptor  $\sigma$  pueden ser útiles en el tratamiento de psicosis y trastornos de movimiento tales como distonía y discinesia tardía y alteraciones motoras asociadas con la corea de Huntington o el síndrome de Tourette y

15 en la enfermedad de Parkinson (Walker, J. M. *et al.* 1990, *Pharmacol. Rev.* **42**, 355). Se ha notificado que el ligando de receptor sigma conocido rimcazol clínicamente muestra efectos en el tratamiento de la psicosis (Snyder, S. H. y Largent B. L., 1989, *J. Neuropsychiatry* **1**, 7). Los sitios de unión  $\sigma$  tienen afinidad preferencial por los isómeros dextrógiros de determinados benzomorfanos opiáceos, tales como (+)SKF 10.047, (+)ciclazocina y (+)pentazocina y también por algunos narcolépticos tales como haloperidol.

20 El receptor sigma tiene al menos dos subtipos, que pueden diferenciarse en isómeros estereoselectivos de estos fármacos farmacoactivos. SKF 10.047 tiene afinidad nanomolar por el sitio  $\sigma_1$  y tiene afinidad micromolar por el sitio sigma-2 ( $\sigma_2$ ). Haloperidol tiene afinidades similares por ambos subtipos. No se conocen ligandos  $\sigma$  endógenos, aunque se ha sugerido que la progesterona es uno de ellos. Posibles efectos farmacológicos mediados por el sitio  $\sigma$  incluyen la modulación de la función del receptor de glutamato, respuesta neurotransmisora, neuroprotección, comportamiento y cognición (Quirion, R, *et al.* 1992, *Trends Pharmacol. Sci.* **13**, 85-86). La mayoría de estudios han dado a entender que los sitios de unión  $\sigma$  (receptores) son elementos del plasmalema de la cascada de transducción de señales. Se han evaluado como antipsicóticos fármacos que se notifica que son ligandos  $\sigma$  selectivos (Hanner, M. *et al.* 1996, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 8072-8077). La existencia de receptores  $\sigma$  en el SNC, los sistemas inmunitario y endocrino ha sugerido una probabilidad que pudieran servir como conexión entre los tres sistemas.

30 Hasta la fecha, la demostración *in vitro* clara de propiedades funcionales mediante ligandos de  $\sigma$  sigue sin ser concluyente. No obstante, en la bibliografía publicada hasta el momento, ligandos tales como (+)-3-PPP, dextrometorfano, (+)-SKF-10,047, PRE-084 y (+)-pentazocina se considera que son agonistas para el receptor  $\sigma_1$  mientras que ligandos tales como haloperidol, BD-1063, BD-1047, NE-100, ditolil-guanidina (DTG) y progesterona se considera que son antagonistas (Cobos *et al.* 2005, *Synapse* **55**, 192-195).

35 El receptor  $\sigma_1$  se ha expresado y purificado a partir de *Escherichia coli* en forma de una fusión a proteína de unión a maltosa de *E. coli* (Ramachandran *et al.*, 2007, *Protein Expression and Purification* **51**, 283-292).

40 El receptor  $\sigma_1$  se expresa en áreas importantes para el control del dolor tales como la médula espinal, la materia gris periacueductal y la médula rostroventral. En la médula espinal se expresa principalmente en las dos láminas superficiales del asta dorsal, en procesos dendríticos y en los pericariones neuronales, en los que se ubica tanto en el plasma como en el retículo endoplasmático (Alonso G. *et al.* 2000, *Neuroscience* **97**, 155-170). De manera interesante, la expresión del receptor  $\sigma_1$  en la médula espinal se regula por incremento durante la fase de inducción del dolor neuropático (Roh D.H. *et al.* 2008, *Anesthesiology* **109**, 879-889). La capacidad sin precedente de que los receptores  $\sigma_1$  interaccionen con una enorme variedad de clases estructurales de fármacos y su amplia distribución en el organismo ha contribuido a que estén implicados como posible diana terapéutica para una amplia serie de trastornos, incluyendo cáncer, depresión, psicosis, farmacodependencia, enfermedad de Alzheimer, accidente cerebrovascular y otras lesiones cerebrales traumáticas.

En vista de las aplicaciones terapéuticas potenciales de agonistas o antagonistas del receptor  $\sigma_1$ , se ha realizado un gran esfuerzo para encontrar ligandos selectivos. Métodos para este fin ya se conocen en la técnica:

50 Por ejemplo, el documento US2009017038 da a conocer métodos de examen e identificación de ligandos novedosos específicos para el receptor  $\sigma_2$ , en los que se ponen en contacto los compuestos candidatos con una o más histonas humanas implicadas en la función del receptor  $\sigma_2$ .

El documento JP2009102306 da a conocer técnicas para examinar un compuesto que puede unirse específicamente a un receptor  $\sigma_1$  que comprende una proteína de fusión que tiene una actividad de chaperona molecular o su subunidad que tiene actividad de unión al ligando y receptor  $\sigma_1$ .

El documento WO2010059711 describe un método para identificar ligandos del receptor  $\sigma_1$  selectivos mediante desplazamiento competitivo de pentazocina radioactiva. Para la determinación de la unión al receptor  $\sigma_2$ , se utilizó DTG radioactiva en presencia de pentazocina no radioactiva, que enmascaró la unión de la población del receptor  $\sigma_1$  a DTG. Se determinó la unión no específica añadiendo haloperidol como una condición control.

5 Los ligandos del receptor  $\sigma_1$  pueden clasificarse como agonistas o antagonistas con un ensayo *in vivo*. Específicamente, en la hipersensibilidad mecánica inducida por capsaicina, los antagonistas del receptor  $\sigma_1$  pueden reducir el dolor inducido por capsaicina mientras que los agonistas potencian el dolor mediante una dosis de capsaicina inferior al umbral (Brenchat A. *et al.* 2011, Eur. J. Pain, **en prensa**; Entrena J.M. *et al.* 2009, Pain **143**, 252-261). Y lo que es más, en este modelo de dolor los efectos producidos por el antagonista pueden invertirse por el agonista y viceversa. Aunque son muy útiles para caracterizar la funcionalidad de los ligandos del receptor  $\sigma_1$ , estos ensayos *in vivo* llevan mucho tiempo y carecen del rendimiento superior de los ensayos *in vitro* haciéndolos inapropiados para examinar un alto número de compuestos.

15 Generalmente, sería deseable investigar la interacción ligando-receptor *in vivo* mediante técnicas no invasivas que pueden ayudar a validar la importancia fisiológica de la interacción y para identificar la unión receptor-ligando. Además, sería deseable tener métodos de examen que permitan el examen rápido y fiable y la selección de compuestos que sean ligandos del receptor  $\sigma$  y especialmente de los que interaccionan con el receptor en el contexto de una célula viva. También sería de alto interés si los métodos pueden discriminar entre los diferentes ligandos del receptor  $\sigma$ : agonistas y antagonistas.

20 Se han descrito ensayos basados en FRET que implican el uso de proteínas de fusión que comprenden un aceptor, un donador y un receptor distinto del receptor sigma-1 para identificación de los ligandos correspondientes (Awais *et al.* 2007, *Biosensor and Bioelectronics*, **22**, 2564-2566; Laursen *et al.* 2005, *Biological Pharmacology* **69**, 1723-1732; Eidne *et al.* 2002, *Trends Endocrinology Metabolism* **13**, 41-421; documentos WO 2011/018586; WO 2007/059297; y WO 2006/044612 A2).

25 Por tanto, existe una necesidad en la técnica de métodos o ensayos alternativos para identificar ligandos del receptor  $\sigma_1$  novedosos útiles en el tratamiento de enfermedades o estados mediados por el receptor  $\sigma_1$ . Como consecuencia, es un objeto de la presente invención proporcionar un método mejorado de seleccionar ligandos del receptor  $\sigma_1$ .

### Sumario de la invención

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a una proteína de fusión que comprende

- 30 i) un receptor  $\sigma_1$  o una variante funcionalmente equivalente del mismo tal y como se define en la reivindicación 1,  
 ii) un resto de proteína fluorescente donador y  
 iii) un resto de proteína fluorescente aceptor,

35 en la que dichos restos de proteína fluorescente donador y aceptor pueden producir transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) y en la que el receptor  $\sigma_1$  está flanqueado por el resto de proteína fluorescente donador y el resto de proteína fluorescente aceptor.

En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a polinucleótidos que comprenden una secuencia codificante que codifica para una proteína de fusión según el primer aspecto.

40 En un tercer aspecto, la presente invención se refiere a una célula que comprende una membrana que comprende la proteína de fusión del primer aspecto, la proteína de fusión del primer aspecto y/o un polinucleótido del segundo aspecto, así como al uso de dicha célula.

En un cuarto aspecto, la presente invención se refiere a un sistema libre de células o basado en células usando la proteína de fusión del primer aspecto para identificar ligandos del receptor  $\sigma_1$ . Más específicamente, se refiere a un método para identificar un ligando para un receptor  $\sigma_1$  que comprende:

- 45 (i) exponer una proteína de fusión según el primer aspecto, una proteína de fusión comprendida en una membrana según el primer aspecto, o una proteína de fusión comprendida en una célula según el segundo aspecto a luz de una longitud de onda que excita el resto de proteína fluorescente donador, con lo que el resto de proteína fluorescente donador fluoresce a una primera longitud de onda de emisión, en lo que la luz de la primera longitud de emisión es capaz de excitar el resto de proteína fluorescente aceptor;
- (ii) detectar luz de una segunda longitud de onda de emisión emitida por el resto de proteína aceptor;
- 50 (iii) poner en contacto la proteína de fusión, la membrana y/o la célula de la etapa (i) con un compuesto de prueba; y  
 (iv) detectar luz de una segunda longitud de onda de emisión emitida por el resto de proteína aceptor de la proteína

de fusión de la etapa (iii) y opcionalmente, un control;

en el que, si se conoce la intensidad de luz de una segunda longitud de onda de emisión emitida durante la etapa (i) o si se incluye un control, puede omitirse la etapa (ii) y cuando se omite, puede llevarse a cabo la etapa (iii) antes de la etapa (i) y en el que el compuesto de prueba se identifica como un ligando para un receptor  $\sigma_1$  si hay una

- 5 diferencia en la intensidad de luz de la segunda longitud de onda de emisión detectada en la etapa (iv) y
- la intensidad de luz de la segunda longitud de onda de emisión detectada en la etapa (ii),
  - la intensidad de luz de la segunda longitud de onda de emisión que se sabe que se emite durante la etapa (i), o
  - la intensidad de luz de la segunda longitud de onda de emisión del control.

### Breve descripción de las figuras

10 **Figura 1. Caracterización bioquímica de las construcciones de  $\sigma_1$  transfectadas de manera transitoria en células HEK-293.** A. Topología transmembrana global de las construcciones de sensor de FRET del receptor  $\sigma_1$  (es decir  $\sigma_1^{\text{CFP/YFP}}$  y  $\sigma_1^{\text{spCFP/YFP}}$ ). B. Detección de fluorescencia de las construcciones de  $\sigma_1$ . C. Detección en la superficie de la célula de los contratos de  $\sigma_1$  por medio de experimentos de biotilación. El panel derecho muestra la cuantificación de cuatro experimentos de biotilación independientes. El asterisco indica las diferencias de

15 significación estadística (\* $P < 0,05$ ; prueba de la t de Student).

**Figura 2. Eficiencia de FRET y cambios de resolución temporal en la señal de FRET de  $\sigma_1^{\text{spCFP/YFP}}$ .** A. Efecto del fotoblanqueamiento en el perfil de fluorescencia de la construcción  $\sigma_1^{\text{spCFP/YFP}}$ . B. Detección de fluorescencia de la construcción  $\sigma_1^{\text{spCFP/YFP}}$  antes (pre) y después (post) del fotoblanqueamiento. C. Cuantificación de la eficiencia de FRET de diferentes pares de FRET: CFP más  $\sigma_1^{\text{YFP}}$  (n=5), YFP más  $\sigma_1^{\text{CFP}}$  (n=7),  $\sigma_1^{\text{spCFP/YFP}}$  (n=15) y  $\sigma_1^{\text{CFP}}$  más  $\sigma_1^{\text{YFP}}$  (n=7). Los datos indican media  $\pm$  EEM y los asteriscos indican las diferencias de significación estadística frente al grupo CFP+ $\sigma_1^{\text{YFP}}$  (\* $P < 0,05$  y \*\* $P < 0,01$ ; prueba de la t de Student). D-E. Cambios mediados por el agonista (PRE-48 100  $\mu\text{M}$ ; panel D) y el antagonista (haloperidol 100  $\mu\text{M}$ ; panel E) del receptor  $\sigma_1$  en la proporción de  $F_{535}^*/F_{480}^*$  de la construcción  $\sigma_1^{\text{spCFP/YFP}}$  expresada en HEK-293.

20

**Figura 3. Perfil farmacológico de la construcción  $\sigma_1^{\text{spCFP/YFP}}$ .** La construcción  $\sigma_1^{\text{spCFP/YFP}}$  expresada en células HEK-293 se incubaba con 100  $\mu\text{M}$  de agonistas (dextrometorfano, (+)-3-PPP, (+)-pentazocina, (+)-SKF-10.047, DTG y PRE-048) y antagonistas (haloperidol, E92 y NE-100) del receptor  $\sigma_1$  y cambios en la proporción de  $F_{535}^*/F_{480}^*$  determinados por FRET intramolecular en tiempo real de célula individual.

25

### Descripción detallada de la invención

La presente invención se basa en estudios de los inventores con respecto a la funcionalidad del receptor  $\sigma_1$ . Los inventores tenían como objetivo emplear la tecnología de FRET para identificar ligandos del receptor  $\sigma_1$  novedosos. FRET (transferencia de energía por resonancia de fluorescencia, o, en caso de que solo se usen moléculas fluorescentes, transferencia de energía por resonancia fluorescente) es un mecanismo de transferencia de energía entre dos fluoróforos. Un fluoróforo donador, en su estado excitado electrónico, puede transferir energía a un fluoróforo aceptor en las proximidades a través de un acoplamiento dipolo-dipolo no radiactivo. FRET es una herramienta útil para cuantificar dinámicas moleculares, tales como interacciones proteína-proteína, interacciones proteína-ADN y cambios conformacionales de proteínas.

30

35

Por ejemplo, puede detectarse AMP cíclico mediante FRET entre proteínas marcadas por separado que se asocian entre sí pero no se unen covalentemente entre sí (véase, la patente estadounidense n.º 5.439.797). Asimismo, pueden detectarse niveles de calcio usando un indicador fluorescente que incluye un resto de proteína de unión, un resto de proteína fluorescente donador y un resto de proteína fluorescente aceptor. El resto de proteína de unión tiene una región de unión a analito que se une a un analito y hace que el indicador cambie la conformación tras la exposición al analito. El resto de proteína fluorescente donador se acopla covalentemente al resto de proteína de unión. El resto de proteína fluorescente aceptor también se acopla covalentemente al resto de proteína de unión. En el indicador fluorescente, el resto donador y el resto aceptor cambian la posición relativa entre sí cuando el analito se une a la región de unión a analito, alterando FRET entre el resto donador y el resto aceptor cuando el resto donador se excita (véase la patente estadounidense n.º 6.197.928).

40

45

Como es evidente, la tecnología de FRET no es necesariamente útil para detectar los cambios conformacionales en cualquier proteína. Para que FRET sea funcional, los fluoróforos donador y aceptor unidos a la proteína que va a estudiarse deben estar suficientemente distantes en el estado no excitado y entonces, el cambio conformacional debe llevar a ambos fluoróforos en proximidad suficientemente cercana de forma que el fluoróforo donador pueda excitar el fluoróforo aceptor. Además, en caso de, por ejemplo, un receptor que va a estudiarse, los receptores no pueden agregarse de modo que el fluoróforo donador de un receptor y los fluoróforos aceptores de otro receptor se lleven en proximidad cercana. Además, la fusión de los dos fluoróforos a la proteína que va a estudiarse puede alterar su conformación o su cambio conformacional, haciendo que no sea funcional, por ejemplo con respecto a la unión al ligando.

50

55

Superando estas dificultades, los inventores han logrado desarrollar un ensayo para identificar ligandos del receptor  $\sigma_1$  basado en una proteína de fusión que comprende el receptor  $\sigma_1$  flanqueado por dos fluoróforos, de manera que dichos fluoróforos pueden producir FRET constitutiva cuando no se une ningún ligando al receptor  $\sigma_1$ . Sorprendentemente, este fenómeno puede alterarse de una manera específica del tipo de ligando: si un agonista se une al receptor  $\sigma_1$ , la intensidad de la luz emitida por el fluoróforo aceptor (es decir FRET) disminuye y si un antagonista se une al receptor, la intensidad de la luz emitida por el fluoróforo aceptor (es decir FRET) aumenta. Por tanto, la proteína de fusión de la invención no solo permite la identificación de ligandos del receptor  $\sigma_1$ , sino también la determinación simultánea de si el ligando recién determinado es un agonista o un antagonista. Dicha proteína de fusión se ha expresado en una célula, dando lugar a un nuevo modelo celular extremadamente útil para identificar ligandos del receptor  $\sigma_1$  y adicionalmente para discriminar entre agonistas y antagonistas.

Basándose en esto, los inventores han desarrollado una serie de aspectos inventivos que se describen en detalle a continuación.

### Proteína de fusión de la invención

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a una proteína de fusión que comprende

- i) un receptor  $\sigma_1$  o una variante funcionalmente equivalente del mismo tal y como se define en la reivindicación 1,
- ii) un resto de proteína fluorescente donador y
- iii) un resto de proteína fluorescente aceptor,

en la que dichos restos de proteína fluorescente donador y aceptor pueden producir transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) y en la que el receptor  $\sigma_1$  está flanqueado por el resto de proteína fluorescente donador y el resto de proteína fluorescente aceptor.

La expresión “receptor sigma-1”, “sigma 1” o “receptor  $\sigma_1$ ” tal como se usa en el presente documento se refiere a una chaperona molecular regulada por ligando, que modula las cascadas de señalización intracelular que se producen cuando se activa la proteína diana con la que interacciona. Como tal chaperona regulada por ligando, la actividad moduladora en la proteína diana puede potenciarse o inhibirse por agonistas o antagonistas que actúan en los receptores  $\sigma_1$ . Notablemente, en condiciones fisiológicas normales, la mayoría de las proteínas diana no se ve afectada por los ligandos del receptor  $\sigma_1$ . Solo cuando se alteran o se someten a condiciones extremas los canales iónicos o receptores seleccionados como diana específicos pueden ser asistidos por chaperonas del receptor  $\sigma_1$ , permitiendo que los ligandos del receptor  $\sigma_1$  ejerzan efectos moduladores. El receptor  $\sigma_1$  que va a usarse según la presente invención no se limita a ninguna especie y puede derivarse, por ejemplo, de rata, ratón, rana, pez cebra, chimpancé, mono Rhesus, cobaya, vaca, caballo o ser humano. Preferiblemente, el receptor  $\sigma_1$  que va a usarse es el receptor  $\sigma_1$  humano (número de referencia de NCBI NM\_005866).

La proteína de fusión del primer aspecto también puede comprender variantes funcionalmente equivalentes del receptor  $\sigma_1$ . La expresión “variante funcionalmente equivalente” tal como se usa en el presente documento ha de entenderse que incluye todas las secuencias de aminoácidos derivadas de la secuencia de aminoácidos del receptor  $\sigma_1$  por medio de modificaciones o mutaciones, incluyendo sustituciones, preferiblemente sustituciones conservativas, inserciones y/o deleciones, que afectan a uno o más aminoácidos, siempre que se mantenga sustancialmente la función del receptor  $\sigma_1$ . Dicha función puede ser la modulación de cascadas de señalización intracelular que se producen cuando se activa una proteína diana con la que interacciona el receptor  $\sigma_1$ . Alternativamente, también puede ser la capacidad de unión de ligandos conocidos, por ejemplo los descritos por Lee y colaboradores (Lee *et al.* 2008, Eur. J. Pharmacol. **578**, 2-3), por ejemplo haloperidol. Ensayos adecuados para determinar si se mantiene sustancialmente una función del receptor  $\sigma_1$  se conocen ampliamente y se describen en la técnica anterior, por ejemplo ensayos de competencia usando el radioligando [<sup>3</sup>H]-(+)-pentazocina (véase, por ejemplo, Lee *et al.* 2008, Eur. J. Pharmacol. **578**, 2-3). La expresión “sustancialmente mantenida” se refiere a la capacidad de unir ligandos antagonistas conocidos haloperidol, con una afinidad de al menos el 10 %, al menos el 20 %, al menos el 30 %, al menos el 40 %, al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 % o al menos el 90 % del receptor  $\sigma_1$  humano de tipo natural. La variante funcionalmente equivalente del receptor  $\sigma_1$  tiene una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos el 70 %, al menos el 80 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % con respecto al receptor  $\sigma_1$  humano. Ello puede diferir de su homólogo de tipo natural, preferiblemente el receptor  $\sigma_1$  humano, en hasta 30, hasta 20, hasta 15, hasta 10, hasta 5 o hasta 3 sustituciones de aminoácidos, preferiblemente sustituciones de aminoácidos conservativas, o deleciones. Además, pueden tener hasta 50, hasta 40, hasta 30, hasta 20, hasta 15, hasta 10, hasta 5, o hasta 3 inserciones de aminoácidos.

Además, las variantes del receptor  $\sigma_1$  pueden ser aquellas que contienen uno o más residuos de aminoácidos modificados, por ejemplo, residuos que se modifican por la unión de grupos sustituyentes; aquellas en las que la proteína es un receptor  $\sigma_1$  de la variante de corte y empalme, por ejemplo según los números de referencia de NCBI NP\_005857.1 o NP\_671513.1 para el receptor  $\sigma_1$  humano; y/o fragmentos de las proteínas. Los fragmentos tienen preferiblemente una longitud de al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 %, al menos el 90 %, al menos

el 95 % o preferiblemente al menos el 98 % del homólogo de tipo natural, preferiblemente el receptor  $\sigma_1$  humano. Los fragmentos incluyen proteínas generadas a través de escisión proteolítica que se produce de manera natural (incluyendo proteólisis de múltiples sitios) de una secuencia original, particularmente en el sentido de modificaciones postraduccionales.

5 Además, las variantes pueden modificarse de manera postraduccional. Por ejemplo, las modificaciones postraduccionales que se encuentran dentro del alcance de la presente invención incluyen escisión del péptido señal, glucosilación, acetilación, isoprenilación, proteólisis, miristoilación, plegado de proteínas y procesamientos proteolíticos, etc. Adicionalmente, las proteínas pueden incluir aminoácidos no naturales formados por modificación postraduccional o introduciendo aminoácidos no naturales durante la traducción.

10 En el contexto de la presente invención, el término "FRET" significa "transferencia de energía de resonancia de Förster" o, si se emplea fluorescencia para ambos cromóforos, "transferencia de energía por resonancia de fluorescencia" y se refiere a la transmisión sin radiación de un cuanto de energía desde su sitio de absorción (el donador) hasta el sitio de su utilización (el aceptor) en una molécula, o sistema de moléculas, mediante interacción por resonancia entre especies donadoras y aceptoras, a lo largo de distancias considerablemente superiores a las interatómicas, sin conversión substancial en energía térmica y sin que el donador y el aceptor entren en colisión cinética. Incluye métodos equivalentes tales como BRET (transferencia de energía por resonancia de bioluminescencia). También están dentro del alcance de la invención variantes de FRET en las que la luz donada por el donador no se debe necesariamente a fluorescencia, sino a otro tipo de emisión de luz, tal como luminiscencia, por ejemplo bioluminescencia, quimioluminescencia, electroquimioluminescencia, electroluminiscencia, catodoluminiscencia, triboluminiscencia, fotoluminiscencia, fosforescencia, radioluminiscencia o termoluminiscencia. Además, el aceptor de luz puede ser cualquier cromóforo.

La expresión "resto de proteína fluorescente donador" tal como se usa en el presente documento se refiere a una molécula química o biológica que absorbe inicialmente energía (por ejemplo, energía óptica o energía eléctrica) y cuya energía emitida se absorbe por otra molécula denominada "aceptor". La expresión "resto de proteína fluorescente aceptor" tal como se usa en el presente documento se refiere a una molécula química o biológica que acepta energía a través de transferencia de energía por resonancia. Tal como se usa en el presente documento, un resto fluorescente donador y un resto fluorescente aceptor de este tipo se denominan "par de FRET".

En FRET, el "resto de proteína fluorescente donador" y el "resto de proteína fluorescente aceptor" (el "par de FRET") se seleccionan de manera que los restos donador y aceptor muestren FRET cuando el resto donador se excita y si están en proximidad cercana (<20 nm, <15 nm, <12 nm, <10 nm, <8 nm o <5 nm, preferiblemente, <10 nm). Un factor que va a considerarse en la elección del par de resto de proteína fluorescente donador/aceptor es la eficiencia de FRET entre los dos restos. Preferiblemente, la eficiencia de FRET entre los restos donador y aceptor es al menos el 10 %, preferiblemente al menos el 30 %, más preferiblemente al menos el 50 %, incluso más preferiblemente al menos el 70 % y lo más preferiblemente al menos el 90 %. La eficiencia de FRET puede someterse a prueba de manera empírica usando métodos conocidos en la técnica. También depende de la distancia entre el donador y el aceptor y por tanto pueden medirse las distancias entre proteínas o restos de proteína. Para más detalles, véase Langois y colaboradores (Langois *et al.* 1976, *J. Mol. Biol.* **106**, 297-313; Langois *et al.* 1977, *Biochemistry* **16**, 2349-2356). Por ejemplo, un par de FRET puede elegirse basándose en requisitos particulares para la proteína que se está estudiando tal como distancia entre componentes de proteína que se están sometiendo a prueba, ubicación subcelular de la proteína (ejemplo, la proteína está en el RE o en el aparato de Golgi, vesículas periféricas o núcleo) y el tipo de microscopía que se está usando para medir FRET (ejemplo, confocal frente a TIRF). Los criterios para un par óptimo son un gran radio de fluorescencia, rendimientos cuánticos superiores del fluoróforo aceptor y aumento de la fotoestabilidad de los fluoróforos donador y aceptor.

Con "proteína fluorescente" se quiere decir cualquier proteína que puede emitir luz cuando se excita con luz/radiación electromagnética apropiada (es decir, luz de una longitud de onda apropiada). La proteína fluorescente absorberá energía de una longitud de onda específica y volverá a emitir energía a una longitud de onda diferente (pero igualmente específica). Las proteínas fluorescentes que pueden usarse incluyen fluoróforos biológicos y químicos. Fluoróforos biológicos a modo de ejemplo comprenden T-zafiro, Cerulean, mCFPm, CyPet, EGFP, PA-EGFP, Emerald, EYFP, Venus, mCitrine, mKO, mOrange, DsRed, JRed, mStrawberry, mCherry, PA-mCherry, mRuby, Tomato, mPlum, mKate, mKatushka, Kaede, Halotag y flúor supereclíptico. Fluoróforos químicos a modo de ejemplo comprenden Alexafluor, rodamina, BODIPY, tetrametilrodamina, colorantes de cianina, fluoresceína, puntos cuánticos, colorantes de IR, colorantes de FM, colorante de ATTO. Los pares de FRET de fluoróforos conocidos pueden establecerse basándose en su perfil de emisión y excitación de luz. Ejemplos incluyen: BFP-GFP; CFP-dsRED; Cy3-Cy5; CFP-YFP; Alexa488-Alexa555; Alexa488-Cy3; FITC-TRITC; y DiSBAC4(3)-CC2-DMPE.

En una realización particular, el resto de proteína fluorescente donador y/o el resto de proteína fluorescente aceptor son proteína fluorescente relacionada con *Aequorea*. Una proteína fluorescente es una "proteína fluorescente relacionada con *Aequorea*" si cualquier secuencia contigua de 150 aminoácidos de la proteína fluorescente tiene al menos el 85 %, al menos el 90 % o al menos el 95 % de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos, bien contigua o bien no contigua, de la proteína fluorescente verde de *Aequorea* de tipo natural. Más preferiblemente, una proteína fluorescente es una proteína fluorescente relacionada con *Aequorea* si cualquier

secuencia contigua de 200 aminoácidos de la proteína fluorescente tiene al menos el 95 %, preferiblemente al menos el 98 % de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos, bien contigua o bien no contigua, de la proteína fluorescente verde de *Aequorea* de tipo natural. De manera similar, la proteína fluorescente puede estar relacionada con proteínas fluorescentes de tipo natural de *Renilla* o *Phialidium* usando los mismos patrones. Una diversidad de GFP relacionadas con *Aequorea* que tienen espectros de emisión y excitación útiles se han modificado por ingeniería genética modificando la secuencia de aminoácidos de una GFP que se produce de manera natural de *Aequorea victoria* (Prasher *et al.* 1992, *Gene* **111**, 229-233; Heim *et al.* 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 12501-12504; patente estadounidense con n.º de serie 5.625.048, presentada el 10 de noviembre de 1994; documento WO 1996/023810, presentado el 10 de noviembre de 1995; patente estadounidense con n.º de serie 6.124.128, presentado el 30 de agosto de 1996). El ADNc de GFP puede fusionarse con los que codifican para muchas otras proteínas; las fusiones resultantes a menudo son fluorescentes y conservan las características bioquímicas de las proteínas reactivas (Cubitt *et al.* 1995, *TIBS* **20**, 448-455). Los estudios de mutagénesis han producido mutantes de GFP con longitudes de onda de excitación o emisión cambiadas (Heim y Tsien 1996, *Current Biol.* **6**, 178-182). Los pares adecuados, por ejemplo un mutante P4-3 de GFP cambiado a azul (Y66H/Y 145F) y un mutante S65T verde mejorado pueden servir respectivamente como donador y aceptor para FRET (Tsien *et al.* 1993, *Trends Cell. Biol.* **3**, 242-245). Pueden usarse otras proteínas fluorescentes como el resto fluorescente, tales como, por ejemplo, proteína fluorescente amarilla de la cepa Y-1 de *Vibrio fischeri*, peridina-clorofila una proteína de unión del dinoflagelado *Symbiodinium sp.*, ficobiliproteínas de cianobacterias marinas tales como *Synechococcus*, por ejemplo, ficoeritrina y ficocianina, o fitocromos de avena de avena reconstituida con ficoeritrobilina. Estas proteínas fluorescentes se han descrito en su mayor parte (Baldwin *et al.* 1990, *Biochemistry* **29**, 5509-5515; Morris *et al.* 1994, *Plant Mol. Biol.* **24**, 673-677; Wilbanks *et al.* 1993, *J. Biol. Chem.* **268**, 1226-1235; Li *et al.* 1995, *Biochemistry* **34**, 7923-7930).

En una realización particular, el resto de proteína fluorescente donador es la proteína fluorescente cian (CFP) y/o el resto de proteína fluorescente aceptor es la proteína fluorescente amarilla (YFP). Tal como apreciarán los expertos en la técnica, los términos CFP e YFP también incluyen formas mutantes de dichas proteínas que tienen propiedades de excitación y emisión de fluorescencia similares, respectivamente, a las de CFP e YFP (incluyendo estas últimas la segunda generación y la tercera generación de mutantes de YFP que incluyen Citrine y Venus).

El par de FRET puede ser un par CFP (ECFP)-YFP (EYFP) potenciado. Ambos son variantes de color de GFP. Cada par de FRET tiene ventajas únicas que pueden hacerlo más adecuado que otros para proteínas de interés particulares. Por ejemplo, el par ECFP-EYFP muestra un gran solapamiento espectral entre la emisión del donador y la excitación del aceptor, permitiendo una FRET robusta. Además, EYFP tiene un alto rendimiento cuántico y es por tanto muy adecuada como un aceptor de FRET. El par EGFP-mCherry demuestra un gran radio de fluorescencia, permitiendo mediciones de FRET en proteínas con una gran distancia de separación de los fluoróforos. El solapamiento espectral entre la emisión de EGFP y mCherry es mínimo, invalidando así falsas mediciones de FRET debidas a la diafonía y la superposición del donador. EGFP es altamente fotoestable.

Según el primer aspecto de la invención, el receptor  $\sigma_1$  comprendido en la proteína de fusión está flanqueado por el resto de proteína fluorescente donador y el resto de proteína fluorescente aceptor. El resto de proteína fluorescente donador puede estar ubicado en el extremo N-terminal del receptor  $\sigma_1$  y el resto de proteína fluorescente aceptor puede estar ubicado en el extremo C-terminal del receptor  $\sigma_1$ . El resto de proteína fluorescente aceptor puede estar ubicado en el extremo N-terminal del receptor  $\sigma_1$  y el resto de proteína fluorescente donador puede estar ubicado en el extremo C-terminal del receptor  $\sigma_1$ .

El uso de técnicas de ADN recombinante para crear un gen de fusión, siendo el producto de traducción las proteínas de fusión de prueba deseadas, se conoce bien en la técnica. Esencialmente, se realiza la unión de diversos fragmentos de ADN que codifican para diferentes secuencias de polipéptidos según técnicas convencionales, empleando extremos terminales romos o escalonados para ligación, digestión con enzimas de restricción para proporcionar extremos terminales apropiados, relleno de extremos cohesivos según sea apropiado, tratamiento con fosfatasa alcalina para evitar la unión no deseada y unión enzimática. Alternativamente, el gen de fusión puede sintetizarse mediante técnicas convencionales incluyendo sintetizadores de ADN automatizados. En otro método, puede llevarse a cabo la amplificación por PCR de fragmentos génicos usando cebadores de anclaje que dan lugar a salientes complementarios entre dos fragmentos génicos consecutivos que posteriormente pueden aparearse para generar una secuencia génica química.

La proteína de fusión del primer aspecto puede comprender un ligador polipeptídico entre el resto de proteína fluorescente aceptor y el receptor  $\sigma_1$  y/o entre el resto de proteína fluorescente donador y el receptor  $\sigma_1$ . Un ligador de este tipo puede facilitar flexibilidad potenciada de la proteína de fusión y también puede reducir el impedimento estérico entre los dos fragmentos y permitir la interacción apropiada entre las dos partes polipeptídicas de prueba. El ligador también puede facilitar que se produzca el plegamiento apropiado de cada fragmento. El ligador puede ser de origen natural, tal como una secuencia determinada para existir en hélice aleatoria entre dos dominios de una proteína. Una secuencia de ligador a modo de ejemplo es el ligador encontrado entre los dominios C-terminal y N-terminal de la subunidad de ARN polimerasa [alfa]. Otros ejemplos de ligadores que se producen de manera natural incluyen ligadores encontrados en las proteínas [lambda]cl y LexA. Alternativamente, el ligador puede ser de origen sintético. Por ejemplo, puede usarse la secuencia (Gly4Ser)<sub>3</sub> como un ligador no estructurado sintético. Ligadores de este tipo se describen en Huston *et al.* 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 4879; y en la patente estadounidense

n.º 5.091.513. Otra realización a modo de ejemplo incluye una secuencia de polialanina, por ejemplo, (Ala)<sub>3</sub>.

La proteína de fusión del primer aspecto tiene de forma imprevista la propiedad de que la conformación del receptor  $\sigma_1$  cambia con la unión de un antagonista de manera que el resto de proteína fluorescente donador y el resto de proteína fluorescente aceptor se acercan entre sí. Por tanto, FRET y por consiguiente la emisión de luz de la proteína fluorescente aceptor aumenta con la unión de un antagonista. Por consiguiente, en una realización, la presente invención se refiere a la proteína de fusión según el primer aspecto, en la que aumenta la transferencia de energía desde el resto de proteína fluorescente donador en un estado excitado hasta el resto de proteína fluorescente aceptor si se une un antagonista del receptor  $\sigma_1$  al receptor  $\sigma_1$ . En otras palabras, la presente invención se refiere a la proteína de fusión según el primer aspecto, en la que aumenta la transferencia de energía desde el resto de proteína fluorescente donador en un estado excitado hasta el resto de proteína fluorescente aceptor si se une un antagonista del receptor  $\sigma_1$  al receptor  $\sigma_1$  en comparación con la transferencia de energía desde el resto de proteína fluorescente donador en un estado excitado hasta el resto de proteína fluorescente aceptor en la que no se une ningún ligando a dicha proteína de fusión.

Incluso más sorprendentemente, los presentes inventores han encontrado que la conformación del receptor  $\sigma_1$  cambia con la unión de un agonista de manera que el resto de proteína fluorescente donador y el resto de proteína fluorescente aceptor se alejan entre sí. Por tanto, FRET y por consiguiente la emisión de luz de la proteína fluorescente aceptor disminuyen con la unión de un agonista. Por consiguiente, en otra realización, la presente invención se refiere a la proteína de fusión según el primer aspecto, en la que disminuye la transferencia de energía desde el resto de proteína fluorescente donador en un estado excitado hasta el resto de proteína fluorescente aceptor si se une un agonista del receptor  $\sigma_1$  al receptor  $\sigma_1$ . En otras palabras, la presente invención se refiere a la proteína de fusión según el primer aspecto, en la que disminuye la transferencia de energía desde el resto de proteína fluorescente donador en un estado excitado hasta el resto de proteína fluorescente aceptor si se une un agonista del receptor  $\sigma_1$  al receptor  $\sigma_1$  en comparación con la transferencia de energía desde el resto de proteína fluorescente donador en un estado excitado hasta el resto de proteína fluorescente aceptor en la que no se une ningún ligando a dicha proteína de fusión.

Los presentes inventores han diseñado la proteína de fusión de la invención de manera que el resto de proteína fluorescente donador y la proteína fluorescente aceptor están en proximidad cercana (<10 nm) entre sí, es decir hay emisión de luz de la proteína fluorescente aceptor, si no se une ningún ligando al receptor  $\sigma_1$ . Por consiguiente, en otra realización, la presente invención se refiere a la proteína de fusión según el primer aspecto, en la que se produce la transferencia de energía desde el resto de proteína fluorescente donador en un estado excitado hasta el resto de proteína fluorescente aceptor si no se une ningún ligando al receptor  $\sigma_1$ .

Esto tiene la ventaja imprevisible de que la emisión de luz de la proteína fluorescente aceptor puede indicar y distinguir entre tres fases: “no unida a un ligando”, “unida a un ligando que es un antagonista” y “unida a un ligando que es un agonista”. Por tanto, preferiblemente la presente invención se refiere a la proteína de fusión según el primer aspecto, en la que se produce la transferencia de energía desde el resto de proteína fluorescente donador en un estado excitado hasta el resto de proteína fluorescente aceptor si no se une ningún ligando al receptor  $\sigma_1$ , en la que aumenta la transferencia de energía desde el resto de proteína fluorescente donador en un estado excitado hasta el resto de proteína fluorescente aceptor si se une un antagonista del receptor  $\sigma_1$  al receptor  $\sigma_1$  y en la que disminuye la transferencia de energía desde el resto de proteína fluorescente donador en un estado excitado hasta el resto de proteína fluorescente aceptor si se une un agonista del receptor  $\sigma_1$  al receptor  $\sigma_1$ .

En una realización adicional, la invención se refiere a la proteína de fusión según el primer aspecto, que comprende además un péptido señal de localización N-terminal o C-terminal.

La expresión “péptido señal de localización” se refiere a una cadena de péptido corta (longitud de 3-60 aminoácidos) que dirige el transporte de una proteína. También se conoce en la técnica como señal de direccionamiento, secuencia señal, péptido de tránsito, o señal de localización o expresiones equivalentes. Las secuencias de aminoácidos de los péptidos señal de localización dirigen proteínas (que se sintetizan en el citosol) a determinadas ubicaciones u orgánulos celulares tales como la membrana celular, el núcleo, matriz mitocondrial, retículo endoplasmático, cloroplasto, apoplasto o peroxisoma. Algunos péptidos señal se escinden de la proteína mediante una peptidasa señal una vez transportadas las proteínas.

Diferentes péptidos señal de localización permiten estudiar la función del receptor  $\sigma_1$  en diferentes ubicaciones celulares primarias. Esto es potencialmente beneficioso para identificar ligandos que se producen solo o principalmente en ubicaciones celulares particulares. Por ejemplo, en un ensayo de examen de ligando basado en células, en el que se añaden ligandos potenciales al medio celular, un péptido señal de localización que dirige la proteína de fusión de la invención a la membrana plasmática puede aumentar la sensibilidad en el ensayo, puesto que todas o al menos una proporción más alta de las proteínas de fusión expresadas por las células se ubicarán en la membrana plasmática, en la que están más expuestas a los ligandos, que cuando se ubican de manera intracelular.

Por consiguiente, dicho péptido señal de localización dirige preferiblemente la proteína de fusión del primer aspecto a la membrana plasmática. Además, otros péptidos señal pueden estar comprendidos en la proteína de fusión del



primer aspecto para redirigirla y/o retenerla a/en un determinado orgánulo (por ejemplo núcleo, mitocondria, retículo endoplasmático o peroxisoma). Ejemplos no limitativos para péptidos de localización (con secuencias de aminoácidos a modo de ejemplo correspondientes) son: señal de localización nuclear (por ejemplo PPKKKRKV, SEQ ID NO: 8); señal de transporte a la matriz mitocondrial (por ejemplo H<sub>2</sub>N-MLSLRQSIRFFKPATRTLCSRYLL-, SEQ ID NO: 9); señal transporte al retículo endoplasmático (por ejemplo H<sub>2</sub>N-MMSFVSLLLVILFWATEAEQLTKCEVFQ-, SEQ ID NO: 10); señal de retención en el retículo endoplasmático (por ejemplo -KDEL-COOH, SEQ ID NO: 11); señal de direccionamiento al peroxisoma (por ejemplo -SKL-COOH). El H<sub>2</sub>N es el extremo N-terminal de la proteína de fusión y COOH es el extremo C-terminal de la proteína de fusión incluyendo el péptido señal de localización.

10 Preferiblemente, dicho péptido señal de membrana plasmática se selecciona del grupo que consiste en péptido señal de PTH1R humano (H<sub>2</sub>N-MGTARIAPGLALLLCCPVLSAYAL-, SEQ ID NO: 5), péptido señal de mGluR<sub>5</sub> humano (H<sub>2</sub>N-MVLLLILSVLLLKEDVRGSA-, SEQ ID NO: 6) y péptido señal de GABA<sub>B2</sub>R humano (H<sub>2</sub>N-MASPRSSGQPGPPPPPPPPARLLLLLLLP LLLPLAPG-, SEQ ID NO: 7).

15 Aunque es evidente para el experto que pueden realizarse modificaciones y variaciones de la proteína de fusión, por ejemplo tal como se expuso anteriormente, dentro del alcance de la invención, en una realización más preferida, la invención se refiere a la proteína de fusión según el primer aspecto, teniendo dicha proteína de fusión la secuencia de aminoácidos según SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2.

20 En otra realización, la proteína de fusión del primer aspecto puede estar comprendida en una membrana. Dicha membrana preferiblemente es una bicapa fosfolipídica. Puede derivarse de una célula procariota o eucariota o puede formarse *in vitro*, por ejemplo como un liposoma.

Además, la presente invención se refiere al uso de la proteína de fusión y/o la membrana del tercer aspecto para identificar un ligando para un receptor  $\sigma_1$ . En una realización preferida, dicho ligando es un antagonista. En otra realización preferida, dicho ligando es un agonista.

#### **Polinucleótidos de la invención**

25 En un segundo aspecto, la invención se refiere a un polinucleótido que comprende una secuencia codificante que codifica para una proteína de fusión según el primer aspecto.

30 Preferiblemente dicho polinucleótido es una secuencia codificante que codifica dicha proteína de fusión, tal como un ARNm o un ADNc. Preferiblemente, dicha secuencia codificante tiene la secuencia según SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4 o una secuencia variante idéntica en al menos el 70 %, al menos el 80 %, al menos el 90 %, al menos 95 %, o al menos 99 % a la misma, en la que dicha secuencia variante codifica para una proteína variante que tiene las funciones de la proteína de fusión de la invención o sus componentes tal como se describe en el presente documento, por ejemplo del receptor  $\sigma_1$  tal como se describió anteriormente y de un resto de proteína fluorescente donador y aceptor.

35 En otra realización, el polinucleótido del segundo aspecto puede ser un casete de expresión que comprende dicha secuencia codificante. La expresión "casete de expresión" se refiere a una secuencia de ADN que comprende un regulador, preferiblemente promotor, secuencia, un marco de lectura abierto y una región en 3' sin traducir, que preferiblemente es, en eucariotas, un sitio de poliadenilación. El casete de expresión puede ser parte de un vector usado para la clonación y transformación. Diferentes casetes de expresión pueden transformarse en diferentes organismos incluyendo bacterias, levaduras, plantas y células de mamíferos siempre que secuencias reguladoras apropiadas, es decir promotores, se usen. Por tanto, dicho polinucleótido también puede ser un vector que comprende dicho polinucleótido codificante. Se conocen bien en la técnica vectores, tales como plásmidos (por ejemplo el vector pEYFP-N1 (Clontech, Mountain View, CA, EE.UU.)), virus, cósmidos etc., así como promotores, por ejemplo el promotor del citomegalovirus humano (CMVh), que pueden usarse en la presente invención.

45 Los polinucleótidos, casetes de expresión y vectores de la invención pueden obtenerse por medio del uso de técnicas bien conocidas en el estado de la técnica (tal como se describe, por ejemplo, en Sambrook *et al.*, (2001), "Molecular cloning, a Laboratory Manual", 3<sup>a</sup> ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y., Vol 1-3).

Además, la presente invención se refiere al uso del polinucleótido del segundo aspecto para identificar un ligando para un receptor  $\sigma_1$ . En una realización preferida, dicho ligando es un antagonista. En otra realización preferida, dicho ligando es un agonista.

#### **50 Célula de la invención**

En un tercer aspecto, la invención se refiere a una célula que comprende la proteína de fusión del primer aspecto, la membrana que comprende la proteína de fusión del primer aspecto y/o el polinucleótido del segundo aspecto.

55 Las células que van a usarse pueden ser cualquier tipo de célula, incluyendo células tanto eucariotas como procariotas. Preferiblemente, pueden modificarse por ingeniería genética para contener restos fluorescentes adecuados para el ensayo. Más preferiblemente, las células incluyen células procariotas, células de levadura o

células de mamífero. Ejemplos preferidos de células de mamífero son por ejemplo células HEK-293, células MOLT-3, células COS, células HeLa y también células de líneas celulares de cáncer humano establecidas, células derivadas/aisladas del sistema nervioso central (SNC), particularmente del SNC de pacientes que padecen psicosis y trastornos del movimiento tales como distonía o discinesia tardía, y/o alteraciones motoras asociadas con corea de Huntington, síndrome de Tourette o enfermedad de Parkinson, etc. En una realización particular, la célula huésped es una célula HEK (de riñón embrionario humano) o HEK-293. Además, las células deben poder expresar preferiblemente la proteína de fusión de la invención en un estado soluble y funcional.

Además, la presente invención se refiere al uso de la célula del tercer aspecto para identificar un ligando para un receptor  $\sigma_1$ . En una realización preferida, dicho ligando es un antagonista. En otra realización preferida, dicho ligando es un agonista.

### Método de la invención

Tal como se expuso anteriormente, el esfuerzo de los inventores se dirigió a proporcionar un ensayo para identificar ligandos del receptor  $\sigma_1$ . La herramienta esencial que se desarrolló para esto es la proteína de fusión del primer aspecto. Basándose en esta proteína de fusión, los inventores han concebido un método para identificar ligandos del receptor  $\sigma_1$ , que se aprovecha tanto de las posiciones de los fluoróforos cuando no se une ningún ligando al receptor como del cambio en su posición con la unión de un ligando.

Por consiguiente, en un cuarto aspecto, la presente invención se refiere a un método para identificar un ligando para un receptor  $\sigma_1$  que comprende:

(i) exponer una proteína de fusión según el primer aspecto, una proteína de fusión comprendida en una membrana según el primer aspecto o una proteína de fusión comprendida en una célula según el tercer aspecto a luz de una longitud de onda que excita el resto de proteína fluorescente donador, con lo que el resto de proteína fluorescente donador fluoresce a una primera longitud de onda de emisión, en lo que la luz de la primera longitud de emisión es capaz de excitar el resto de proteína fluorescente aceptor;

(ii) detectar luz de una segunda longitud de onda de emisión emitida por el resto de proteína aceptor;

(iii) poner en contacto la proteína de fusión, la membrana y/o la célula de la etapa (i) con un compuesto de prueba; y

(iv) detectar luz de una segunda longitud de onda de emisión emitida por el resto de proteína aceptor de la proteína de fusión de la etapa (iii) y opcionalmente, un control;

en el que, si se conoce la intensidad de luz de una segunda longitud de onda de emisión emitida durante la etapa (i) o si se incluye un control, puede omitirse la etapa (ii) y si se omite, puede llevarse a cabo la etapa (iii) antes de la etapa (i) y en el que el compuesto de prueba se identifica como un ligando para un receptor  $\sigma_1$  si hay una diferencia en la intensidad de luz de la segunda longitud de onda de emisión detectada en la etapa (iv) y

- la intensidad de luz de la segunda longitud de onda de emisión detectada en la etapa (ii),

- la intensidad de luz de la segunda longitud de onda de emisión que se sabe que se emite durante la etapa (i), o

- la intensidad de luz de la segunda longitud de onda de emisión del control.

En otras palabras, el método del cuarto aspecto puede formularse alternativamente como un método para identificar un ligando para un receptor  $\sigma_1$  que comprende:

(i) poner en contacto una proteína de fusión según el primer aspecto, una proteína de fusión comprendida en una membrana según el primer aspecto, o una proteína de fusión comprendida en una célula según el tercer aspecto con un compuesto de prueba; y

(ii) detectar luz de una segunda longitud de onda de emisión emitida por el resto de proteína aceptor de la proteína de fusión de la etapa (i) y opcionalmente, de un control, con lo que el resto de proteína fluorescente donador fluoresce a una primera longitud de onda de emisión, en lo que la luz de la primera longitud de emisión es capaz de excitar el resto de proteína fluorescente aceptor;

en el que dicha proteína de fusión se expone a luz de una longitud de onda que excita el resto de proteína fluorescente donador antes de la etapa (i) y/o entre la etapa (i) y la etapa (ii) y en el que el compuesto de prueba se identifica como un ligando para un receptor  $\sigma_1$  si existe una diferencia en la intensidad de luz de la segunda longitud de onda de emisión detectada en la etapa (ii) y

- la intensidad de luz de la segunda longitud de onda de emisión que se sabe que se emite antes de la etapa (i), o

- la intensidad de luz de la segunda longitud de onda de emisión del control.

Preferiblemente, en ese documento la intensidad de luz de la segunda longitud de onda de emisión que se sabe que

se emite antes de la etapa (i) se mide detectando la luz de dicha segunda longitud de onda de emisión emitida por el resto de proteína aceptor después de exponerse dicha proteína de fusión a luz de una longitud de onda que excita el resto de proteína fluorescente donador antes de la etapa (i) o es un valor predeterminado de la intensidad de luz de la segunda longitud de onda de emisión emitida por dicha proteína de fusión cuando no está unida a un ligando y cuando se expone a luz de una longitud de onda que excita el resto de proteína fluorescente donador.

Aún como otra alternativa, el método del cuarto aspecto también puede describirse como un método o colección de métodos que abarcan una o más de las cinco siguientes variaciones (A)-(E), logrando todas el mismo objetivo:

(A) Un método para identificar un ligando para un receptor  $\sigma_1$  que comprende:

(i) exponer una proteína de fusión según el primer aspecto, una proteína de fusión comprendida en una membrana según el primer aspecto, o una proteína de fusión comprendida en una célula según el tercer aspecto a luz de una longitud de onda que excita el resto de proteína fluorescente donador, con lo que el resto de proteína fluorescente donador fluoresce a una primera longitud de onda de emisión, en lo que la luz de la primera longitud de emisión es capaz de excitar el resto de proteína fluorescente aceptor;

(ii) detectar luz de una segunda longitud de onda de emisión emitida por el resto de proteína aceptor de dicha proteína de fusión;

(iii) poner en contacto dicha proteína de fusión con un compuesto de prueba; y

(iv) detectar luz de una segunda longitud de onda de emisión emitida por el resto de proteína aceptor de dicha proteína de fusión;

en el que el compuesto de prueba se identifica como un ligando para un receptor  $\sigma_1$  si hay una diferencia en la intensidad de luz de la segunda longitud de onda de emisión detectada en la etapa (iv) y la intensidad de luz de la segunda longitud de onda de emisión detectada en la etapa (ii).

En la variación (A), preferiblemente la exposición en la etapa (i) se mantiene a lo largo de todas las etapas (i) a (iv). En otra realización preferida, la luz no se detecta solo en las etapas (ii) y etapas (iv), sino continuamente, es decir durante las etapas (ii) a (iv).

(B) Un método para identificar un ligando para un receptor  $\sigma_1$  que comprende:

(i) poner en contacto una proteína de fusión según el primer aspecto, una proteína de fusión comprendida en una membrana según el primer aspecto, o una proteína de fusión comprendida en una célula según el tercer aspecto con un compuesto de prueba;

(ii) exponer dicha proteína de fusión y un control a luz de una longitud de onda que excita el resto de proteína fluorescente donador de dicha proteína de fusión y de dicho control, con lo que el resto de proteína fluorescente donador fluoresce a una primera longitud de onda de emisión, en lo que la luz de la primera longitud de emisión es capaz de excitar el resto de proteína fluorescente aceptor; y

(iii) detectar luz de una segunda longitud de onda de emisión emitida por el resto de proteína aceptor de dicha proteína de fusión y de dicho control;

en el que el compuesto de prueba se identifica como un ligando para un receptor  $\sigma_1$  si hay una diferencia en la intensidad de luz de la segunda longitud de onda de emisión emitida por el resto de proteína aceptor de dicha proteína de fusión y la intensidad de luz de la segunda longitud de onda de emisión emitida por el resto de proteína aceptor del control.

En la variación (B), preferiblemente la exposición en la etapa (ii) se mantiene a lo largo de todas las etapas (ii) a (iii).

(C) Un método para identificar un ligando para un receptor  $\sigma_1$  que comprende:

(i) exponer una proteína de fusión según el primer aspecto, una proteína de fusión comprendida en una membrana según el primer aspecto, o una proteína de fusión comprendida en una célula según el tercer aspecto y un control a luz de una longitud de onda que excita el resto de proteína fluorescente donador de dicha proteína de fusión y de dicho control, con lo que el resto de proteína fluorescente donador fluoresce a una primera longitud de onda de emisión, en lo que la luz de la primera longitud de emisión es capaz de excitar el resto de proteína fluorescente aceptor;

(ii) poner en contacto dicha proteína de fusión con un compuesto de prueba; y

(iii) detectar luz de una segunda longitud de onda de emisión emitida por el resto de proteína aceptor de dicha proteína de fusión y de dicho control;

en el que el compuesto de prueba se identifica como un ligando para un receptor  $\sigma_1$  si hay una diferencia en la

intensidad de luz de la segunda longitud de onda de emisión emitida por el resto de proteína aceptor de dicha proteína de fusión y la intensidad de luz de la segunda longitud de onda de emisión emitida por el resto de proteína aceptor del control.

En la variación (C), preferiblemente la exposición en la etapa (i) se mantiene a lo largo de todas las etapas (i) a (iii).

5 (D) Un método para identificar un ligando para un receptor  $\sigma_1$  que comprende:

(i) exponer una proteína de fusión según el primer aspecto, una proteína de fusión comprendida en una membrana según el primer aspecto, o una proteína de fusión comprendida en una célula según el tercer aspecto a luz de una longitud de onda que excita el resto de proteína fluorescente donador, con lo que el resto de proteína fluorescente donador fluoresce a una primera longitud de onda de emisión, en lo que la luz de la primera longitud de emisión es capaz de excitar el resto de proteína fluorescente aceptor;

10

(ii) poner en contacto dicha proteína de fusión con un compuesto de prueba; y

(iii) detectar luz de una segunda longitud de onda de emisión emitida por el resto de proteína aceptor de dicha proteína de fusión;

15

en el que el compuesto de prueba se identifica como un ligando para un receptor  $\sigma_1$  si hay una diferencia en la intensidad de luz de la segunda longitud de onda de emisión detectada en la etapa (iii) y la intensidad de luz de la segunda longitud de onda de emisión que se sabe que se emite durante la etapa (i).

En la variación (D), preferiblemente la exposición en la etapa (i) se mantiene a lo largo de todas las etapas (i) a (iii).

(E) Un método para identificar un ligando para un receptor  $\sigma_1$  que comprende:

20

(i) poner en contacto una proteína de fusión según uno cualquiera del primer aspecto, una proteína de fusión comprendida en una membrana según el primer aspecto, o una proteína de fusión comprendida en una célula según el tercer aspecto con un compuesto de prueba;

25

(ii) exponer dicha proteína de fusión a luz de una longitud de onda que excita el resto de proteína fluorescente donador de dicha proteína de fusión, con lo que el resto de proteína fluorescente donador fluoresce a una primera longitud de onda de emisión, pudiendo excitar la luz de la primera longitud de emisión el resto de proteína fluorescente aceptor; y

(iii) detectar luz de una segunda longitud de onda de emisión emitida por el resto de proteína aceptor de dicha proteína de fusión;

30

en el que el compuesto de prueba se identifica como un ligando para un receptor  $\sigma_1$  si hay una diferencia en la intensidad de luz de la segunda longitud de onda de emisión detectada en la etapa (iii) y la intensidad de luz de la segunda longitud de onda de emisión que se sabe que se emite por dicha proteína de fusión cuando no está unida a un ligando y cuando se expone a luz de una longitud de onda que excita el resto de proteína fluorescente donador.

En la variación (E), preferiblemente la exposición en la etapa (ii) se mantiene a lo largo de todas las etapas (ii) a (iii).

35

Cualesquiera características del método definidas, descritas y explicadas a continuación se refieren al método del cuarto aspecto tal como se describe en primer lugar. Sin embargo, se entiende que estas definiciones, descripciones o explicaciones se aplican de manera equivalente -siempre que puedan aplicarse- a la formulación alternativa del método del cuarto aspecto así como a las variaciones del método (A) a (E). Ni que decir tiene que, puesto que las designaciones de las etapas (i), (ii), (iii) y/o (iv) no siempre corresponden entre los métodos definidos de manera diferente, esta observación se aplica a las características y etapas de los métodos según se define por su contenido y no necesariamente por la designación de las etapas.

40

Preferiblemente, dicho método del cuarto aspecto es un método *in vitro* para identificar un ligando para un receptor  $\sigma_1$ .

45

En el presente documento, el término "control" se refiere, entre otras cosas, a un control negativo, es decir a una proteína de fusión según el primer aspecto, una membrana según el primer aspecto, o una célula según el tercer aspecto que no se pone en contacto con un compuesto de prueba pero que en cualquier caso se trata según el método anterior (por ejemplo, el control negativo también se expone a la luz y también se detecta la luz emitida). En particular, el control negativo puede usarse para identificar cualquier ligando, es decir tanto agonistas como antagonistas. El término "control" también incluye un control positivo, es decir una proteína de fusión según el primer aspecto, una membrana según el primer aspecto, o una célula según el tercer aspecto que se pone en contacto con un ligando conocido (agonista y/o antagonista). En particular, puede usarse un control positivo para identificar específicamente agonistas (si se usa un agonista como control positivo) o antagonistas (si se usa un antagonista como control positivo). También se prevé que el término "control" incluya tanto un control negativo como uno positivo (opcionalmente tanto agonista como antagonista), es decir pueden usarse varios controles en paralelo, por ejemplo

50

un control negativo y un control positivo (agonista), un control negativo y un control positivo (antagonista), o un control negativo y dos controles positivos (agonista y antagonista). Cuando se hace referencia en el presente documento a la luz emitida por el control, significa la emisión de luz del resto de proteína fluorescente respectivo (es decir aceptor o donador).

5 Tal como entenderá el experto en la técnica, la etapa (i) de dicho método no implica necesariamente que la exposición con luz se termine tras la etapa (i) ni que no se produzca durante las siguientes etapas. Como tal, la etapa (i) también puede ser: “(i) iniciar la exposición de una proteína de fusión según el primer aspecto, una membrana que comprende una proteína de fusión según el primer aspecto, o una célula según el tercer aspecto con luz de una longitud de onda que excita el resto de proteína fluorescente donador, con lo que, preferiblemente, el resto de proteína fluorescente donador fluoresce a una primera longitud de onda de emisión que excita el resto de proteína fluorescente aceptor.” En caso de que la exposición con luz se termine tras la etapa (i), el método anterior comprende opcionalmente una etapa adicional durante la etapa (iii) o entre las etapas (iii) y (iv) de la exposición de la proteína de fusión, la membrana o la célula de la etapa (i) a luz de una longitud de onda que excita el resto de proteína fluorescente donador, con lo que, preferiblemente, el resto de proteína fluorescente donador fluoresce a una primera longitud de onda de emisión que excita el resto de proteína fluorescente aceptor.

La intensidad de luz de la primera longitud de onda de emisión emitida por el resto de proteína fluorescente donador también puede detectarse cuando se detecta la de la segunda longitud de onda de emisión emitida por el resto de proteína fluorescente aceptor y puede calcularse una proporción de estos valores, preferiblemente la proporción “intensidad de luz de la segunda longitud de onda de emisión emitida por el resto de proteína fluorescente aceptor” dividida por la “intensidad de luz de la primera longitud de onda de emisión emitida por el resto de proteína fluorescente donador”.

Tal como se expuso anteriormente, la proteína de fusión del primer aspecto de forma imprevista tiene la propiedad de que la conformación del receptor  $\sigma_1$  cambia con la unión de un antagonista de manera que la emisión de luz de la proteína fluorescente aceptor aumenta con la unión de un antagonista. Por consiguiente, el compuesto de prueba se puede identificar como un antagonista para un receptor  $\sigma_1$  si está aumentada la intensidad de luz de la segunda longitud de onda de emisión detectada en la etapa (iv) en comparación con la luz de la segunda longitud de onda de emisión detectada en la etapa (ii), que se sabe que se emite durante la etapa (i), o la del control.

Además, los presentes inventores han diseñado la proteína de fusión de la invención de manera que hay emisión de luz de la proteína fluorescente aceptor si no se une ningún ligando al receptor  $\sigma_1$ . Por consiguiente, se puede determinar que el compuesto de prueba no es un ligando de un receptor  $\sigma_1$  si la intensidad de luz de la segunda longitud de onda de emisión detectada en la etapa (iv) no cambia en comparación con la luz de la segunda longitud de onda de emisión detectada en la etapa (ii), que se sabe que se emite durante la etapa (i), o la del control.

Además, se ha encontrado que la conformación del receptor  $\sigma_1$  cambia con la unión de un agonista de manera que la emisión de luz de la proteína fluorescente aceptor disminuye con la unión de un agonista. Por consiguiente el compuesto de prueba se puede identificar como un agonista para un receptor  $\sigma_1$  si la intensidad de luz de la segunda longitud de onda de emisión detectada en la etapa (iv) está disminuida en comparación con la luz de la segunda longitud de onda de emisión detectada en la etapa (ii), que se sabe que se emite durante la etapa (i), o la del control.

Esto tiene la ventaja de que el método de la invención puede distinguir entre tres tipos de compuestos de prueba: “sin ligando”, “antagonista” y “agonista”. Por tanto, el compuesto de prueba se puede identificar como un antagonista para un receptor  $\sigma_1$  si la intensidad de luz de la segunda longitud de onda de emisión detectada en la etapa (iv) está aumentada en comparación con la luz de la segunda longitud de onda de emisión detectada en la etapa (ii), que se sabe que se emite durante la etapa (i), o la del control, en el que el compuesto de prueba se puede identificar como un agonista para un receptor  $\sigma_1$  si la intensidad de luz de la segunda longitud de onda de emisión detectada en la etapa (iv) disminuye en comparación con la luz de la segunda longitud de onda de emisión detectada en la etapa (ii), que se sabe que se emite durante la etapa (i), o la del control y en el que se puede determinar que el compuesto de prueba no es un ligando de un receptor  $\sigma_1$  si la intensidad de luz de la segunda longitud de onda de emisión detectada en la etapa (iv) no cambia en comparación con la luz de la segunda longitud de onda de emisión detectada en la etapa (ii), que se sabe que se emite durante la etapa (i), o la del control.

En la etapa (i) del método anterior, la proteína de fusión se expone a luz de una longitud de onda que excita el resto de proteína fluorescente donador para inducir potencialmente FRET con respecto al resto de proteína fluorescente aceptor. Esta puede ser FRET de un fotón, dos fotones o múltiples fotones, dependiendo del fin, por ejemplo reducir la auto-fluorescencia de fondo de las células.

El microscopio o fuente de luz de excitación debe ser compatible para realizar el método de la invención por ejemplo para ensayos en células vivas. Por ejemplo, debe ser capaz de superar las tremendas cantidades de dispersión de luz y por tanto los artefactos, generados por las células vivas. Preferiblemente, es un instrumento que acopla un microscopio confocal con un espectrofluorímetro. La célula de la etapa (i) puede ser una célula individual.

Debe entenderse, sin embargo, que preferiblemente se usa una fuente de láser confocal para la excitación de

células individuales, pero que también pueden aplicarse muchas otras fuentes de láser en determinadas condiciones, tales como cuando se usan poblaciones de células en lugar de células individuales en condiciones de bajo fondo. También debe entenderse que las longitudes de onda mencionadas en esta solicitud son para fin ilustrativo únicamente y en modo alguno limitativas. Con el descubrimiento de moléculas/proteínas fluorescentes futuras con longitudes de onda de excitación y emisión únicas, también pueden usarse de manera apropiada estas longitudes de onda para poner en práctica la presente invención.

En las etapas (ii) y (iv), el método de la invención comprende detectar la emisión de la segunda longitud de onda de emisión y opcionalmente, luz de la primera longitud de onda de emisión emitida por el resto de proteína fluorescente donador (por ejemplo para calcular proporciones).

El método de la invención comprende detectar la interacción entre donador y aceptor registrando intensidades de emisión y cuantificando, por ejemplo la eficiencia de FRET. La eficiencia E de FRET se define por la ecuación de fluorescencia descrita en Lakowicz, 2006 (Energy Transfers. Principles of Fluorescence Spectroscopy. J.R. Lakowicz, editor. Springer Science, Nueva York, 443-476). Los métodos de la presente divulgación usan dos clases de técnicas que proporcionan valores de E aproximados basados en FRET de fotoblanqueamiento de aceptor por imágenes de microscopía y FRET sensibilizada (Wallrabe y Periasamy 2005, *Curr. Opin. Biotechnol.* **16**, 19-27; Jares-Erijman y Jovin 2006, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **10**, 409-416).

La interacción entre donador y aceptor también puede notificarse mediante la cuantificación de la amplitud de FRET tal como se describe en la técnica. La amplitud de FRET medida a partir de la emisión sensibilizada del aceptor durante la excitación por el donador y no es una medición directa de la eficiencia E de FRET.

La expresión amplitud de FRET también puede aplicarse para describir la magnitud de cualquier señal de FRET calculada mediante cualquier método conocido para cuantificar FRET a partir de imágenes de emisión sensibilizada que no es una medida directa de la eficiencia E de FRET. La amplitud de FRET adquirida es una medida indirecta de E (Elangovan *et al.* 2003, *Methods* **29**, 58-73) y responde de manera no lineal a variaciones en el grado de interacción entre fluoróforo-moléculas marcadas (Gordon *et al.* 1998, *Biophys. J.* **74**, 2702-2713).

La adquisición de imágenes por FRET también puede realizarse mediante fotoblanqueamiento de aceptor. En una muestra que expresa tanto moléculas marcadas con donador como con aceptor, la existencia de FRET produce una disminución en la intensidad del donador, proporcional al número de moléculas marcadas con donador que interaccionan con moléculas marcadas con aceptor. Por tanto, FRET “de fotoblanqueamiento de aceptor” mide directamente la eficiencia E de FRET cuantificando el aumento en la intensidad del donador tras el fotoblanqueamiento del aceptor (aunque artefactos que incluyen la fotoconversión del aceptor y el fotoblanqueamiento del donador pueden distorsionar esta medición (Rizzo *et al.* 2006, *Microsc. Microanal.* **12**, 238-254).

La adquisición de imágenes por FRET también puede realizarse mediante FRET de emisión sensibilizada. El aceptor presenta emisión sensibilizada durante la excitación del donador. Las mediciones de tal “FRET sensibilizada” o “FRET de emisión sensibilizada” conservan los fluoróforos en la muestra. En lugar de adquirir una serie temporal de imágenes, requiere la adquisición de bien una única imagen mediante un dispositivo que puede detectar todo el espectro de emisión tanto de la fluorescencia del donador como de la del aceptor que después se resuelve espectralmente a través de separación lineal de la imagen de espectro total en imágenes de donador, aceptor y FRET o bien alternativamente usando un microscopio de obtención de imágenes por fluorescencia confocal o de campo ancho estándar, el uso de tres cubas de filtro de fluorescencia diferentes apropiadas para adquirir imágenes de: 1), el canal de donador (IDD, excitación y emisión del donador), 2), el canal de FRET (IDA, excitación del donador, emisión del aceptor) y 3), el canal del aceptor (IAA, excitación y emisión del aceptor).

En una realización preferida, se detecta y se cuantifica la luz, en otras palabras, se monitoriza FRET, como la proporción de emisión entre la intensidad de emisión del aceptor ( $F_{\text{longitud de onda de emisión de aceptor}}$ ) y la intensidad de emisión del donador ( $F_{\text{longitud de onda de emisión de donador}}$ ) tras la excitación del donador con la longitud de onda correspondiente. La proporción de intensidad de emisión ( $F_{\text{longitud de onda de emisión de aceptor}}/F_{\text{longitud de onda de emisión de donador}}$ ) se corrige mediante el desbordamiento respectivo, concretamente la emisión del donador en el canal de longitud de onda de emisión del aceptor y el desbordamiento de la emisión del aceptor en el canal de longitud de onda de emisión del donador, dando así la proporción de FRET corregida ( $F_{\text{longitud de onda de emisión de aceptor}}^{\text{desbordado}}/F_{\text{longitud de onda de emisión de donador}}^{\text{desbordado}}$ ) (véase Vilardaga *et al.* 2003, *Nature Biotechnology* **21**, 807-812).

La expresión “poner en contacto” se refiere a llevar en contacto dos sustancias entre sí y comprende añadir la segunda sustancia a un entorno experimental que ya comprende la primera sustancia o añadir la primera sustancia a un entorno experimental que ya comprende la segunda sustancia. Por consiguiente, el compuesto de prueba puede añadirse a la proteína de fusión ya en el entorno experimental o la proteína de fusión puede añadirse al compuesto de prueba ya en el entorno experimental. Preferiblemente, una célula o células de la invención se ponen en contacto o se perfunden con el compuesto de prueba.

En una realización preferida, dicho compuesto de prueba es un compuesto inorgánico, un compuesto orgánico y/o un compuesto biológico. Ejemplos para compuestos inorgánicos son metales, non metales, óxidos, bases, sales y

ácidos. Los compuestos orgánicos pueden ser, por ejemplo, polímeros o compuestos orgánicos pequeños. Los compuestos biológicos son compuestos sintetizados por organismos vivos, preferiblemente los que contienen átomos de carbono así como átomos de nitrógeno, azufre, fósforo y/u oxígeno. Incluyen, por ejemplo, aminoácidos, péptidos, proteínas, ácidos nucleicos, polinucleótidos, hidratos de carbono y lípidos. En una realización preferida, los compuestos sometidos a prueba usando el método de la invención proceden de bibliotecas de compuestos, tales como bibliotecas de compuestos pequeños, bibliotecas de péptidos y similares, por ejemplo para examen de alto rendimiento. Tales bibliotecas se usan ampliamente y están disponibles comercialmente.

El método descrito en el presente documento puede realizarse con la ayuda de un medio legible por ordenador que contiene un conjunto de instrucciones que hace que un ordenador realice al menos uno de los métodos descritos en el presente documento. El software a modo de ejemplo se describe en Feige *et al*, 2005, *Microsc. Res. Tech.* **68**, 51-58. Software a modo de ejemplo adicional se proporciona en macros de ImageJ escritos que pueden usarse para permitir el montaje de series de imágenes listas para análisis y macros de Matlab que compilan todos los píxeles de cada conjunto de datos en una única distribución de FRET.

Un medio legible por ordenador también puede incluirse en un ordenador. El ordenador puede ser la misma máquina incluida en el sistema de obtención de imágenes confocal que adquirió los datos para permitir el procesamiento inmediato de los datos recién adquiridos.

### Kit de la invención

Adicionalmente, la presente invención se refiere a un kit útil para poner en práctica la invención dada a conocer en el presente documento.

Por tanto, en otro aspecto, la invención se refiere a un kit, en adelante kit de la invención, que comprende la proteína de fusión, la membrana, el polinucleótido, y/o la célula de la invención. El kit puede comprender adicionalmente reactivos para llevar a cabo el método de la invención.

En la presente invención un "kit" se entiende como un producto que contiene los diferentes agentes y material para identificar un ligando para un receptor  $\sigma_1$  según el método de la invención. Ejemplos ilustrativos de agentes útiles para identificar un ligando para un receptor  $\sigma_1$  son medio para mantener células, tampones, solución salina, cubreobjetos, etc. Por otra parte, el kit puede incluir una placa de pocillos que comprende las células de la invención.

Otro componente que puede estar presente en el kit es un envase que permite mantener los agentes almacenados de manera apropiada. Materiales adecuados para preparar tales envases incluyen vidrio, plástico (polietileno, polipropileno, policarbonato y similares), botellas, viales, papel, sobres y similares. El kit de la invención puede contener adicionalmente instrucciones para usar los agentes en el método de la invención. Dichas instrucciones pueden encontrarse en forma de material impreso o en forma de un soporte electrónico que puede almacenar instrucciones de manera que puedan leerse por un sujeto, tales como medios de almacenamiento electrónicos (discos magnéticos, cintas y similares), medios ópticos (CD-ROM, DVD) y similares. Los medios pueden contener adicional o alternativamente sitios web de Internet que proporcionen dichas instrucciones.

### Ejemplos

Los siguientes ejemplos han de considerarse ilustrativos y no limitativos del alcance de la invención.

### Materiales y métodos

#### Construcciones de plásmidos

Las construcciones presentadas aquí se realizaron usando técnicas de biología molecular convencionales empleando PCR y estrategia de sustitución de fragmentos. Por tanto, se obtuvieron dos construcciones de sensor de FRET del receptor  $\sigma_1$  usando ADNc que codifica para el gen del receptor  $\sigma_1$  humano. Para este fin, en primer lugar se amplificó el receptor  $\sigma_1$  usando el cebador de oligonucleótido sentido (FSEcoRI: 5'-CGGAATTCATGCAGTGGGCCG-3' [SEQ ID NO: 12]) y el cebador antisentido (RSBamHI: 5'-CAGGATCCCGAGGGTCTGGCCAAAGAG-3' [SEQ ID NO: 13]). Luego se subclonó el fragmento en marco en sitios EcoRI/BamHI del vector pEYFP-N1 (Clontech, Mountain View, CA, EE.UU.), dando como resultado por tanto el receptor  $\sigma_1$  que contenía la proteína fluorescente amarilla (YFP) en su cola C-terminal (construcción  $\sigma_1^{YFP}$ ). A continuación, para obtener el primer sensor de FRET del receptor  $\sigma_1$ , se amplificó la CFP a partir de la construcción PTHR<sup>CFP</sup> (facilitada amablemente por JP Vilardaga, Universidad de Pittsburgh, EE.UU.) usando el cebador sentido (FCFPHindIII: 5'-CGAAGTTCatggtgagcaagggcgaggagc-3' [SEQ ID NO: 14]) y el cebador antisentido (RCFPEcoRI: 5'-ccGGAATTCctgtacagctcgatccatcc-3' [SEQ ID NO: 15]). Luego se subclonó el fragmento que codifica para la proteína CFP aguas arriba en marco en los sitios HindIII/EcoRI del plásmido pEYFP-N1 que contiene  $\sigma_1^{YFP}$ , dando como resultado así la construcción  $\sigma_1^{CFP/YFP}$ . Finalmente, para obtener el segundo sensor de FRET del receptor  $\sigma_1$  que contiene el péptido señal de PTHR, se amplificó la CFP de la construcción PTHR<sup>CFP</sup> usando el cebador sentido (FspCFPHindIII: 5'-GTTTAAACTTAAGTTCGG-3' [SEQ ID NO: 16]) y el cebador antisentido RCFPEcoRI [SEQ ID NO: 8]. Luego se subclonó el fragmento que codifica el péptido señal de PTHR junto con la proteína CFP en marco

aguas arriba en marco en los sitios HindIII/EcoRI del plásmido pEYFP-N1 que contiene  $\sigma_1^{YFP}$ , dando como resultado así la construcción  $\sigma_1^{spCFP/YFP}$ . Todas las construcciones se verificaron mediante secuenciación de nucleótidos.

### Cultivo celular y transfección

5 Se hicieron crecer células de riñón embrionario humano (HEK)-293T a 37°C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5 % en medio Eagle modificado por Dulbecco (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) complementado con piruvato de sodio 1 mM, l-glutamina 2 mM, estreptomycin 100 U/ml, penicilina 100 mg/ml y suero bovino fetal al 5 % (v/v). Se sembraron las células en placas de seis pocillos que contenían cubreobjetos recubiertos con poli-D-lisina (18 mm de diámetro) con aproximadamente 300.000 células/pocillo. Se transfectaron las células de manera transitoria con las construcciones de ADNc correspondientes usando Transfectina (Bio-Rad, Hercules, CA, EE.UU.) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Se obtuvieron dos líneas de células HEK-293 transfectadas de manera estable que expresaban las construcciones  $\sigma_1^{CFP/YFP}$  y  $\sigma_1^{spCFP/YFP}$  tras la selección de resistencia a geneticina (G418) (200 µg/ml).

### FRET intramolecular (iFRET) en tiempo real de célula individual

15 En el enfoque de FRET intramolecular en tiempo real de célula individual tanto el donador (es decir CFP) como el aceptor (es decir YFP) están ubicados en la misma molécula, tal como se diseñó para las construcciones  $\sigma_1^{CFP/YFP}$  y  $\sigma_1^{spCFP/YFP}$  (figura 1A). En resumen, se sembraron células HEK que expresaban permanentemente el sensor de FRET del receptor  $\sigma_1$  correspondiente en cubreobjetos recubiertos por poli-D-Lisina y se dejaron crecer durante la noche. Después, se montaron los cubreobjetos con las células transfectadas en un soporte del dispositivo Attotfluor y se colocaron en un microscopio invertido Axio Observer (Zeiss, Jena, Alemania) equipado con un objetivo de inmersión en aceite 63X y un sistema de fotometría de emisión dual (Till Photonics, Gräfelfing, Alemania). El tampón extracelular fue solución salina equilibrada de Hank (HBSS), que contenía (en mM): NaCl 137, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,34, KCl 5, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,44, MgCl<sub>2</sub> 0,5, Mg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,4, CaCl<sub>2</sub> 1,26, HEPES 10, D-glucosa 2 y ácido ascórbico 1 (pH 7,4 con NaOH).

25 Se usó un dispositivo Polychrome V (Till Photonics) como fuente de luz. Se iluminó la muestra con luz de excitación a  $436 \pm 10$  nm (divisor de haz dicróico de paso largo; DCLP 460 nm). El tiempo de excitación fue de 10 ms a 10 Hz, con el fin de limitar el fotoblanqueamiento. Se determinaron las intensidades de la luz de emisión a  $535 \pm 15$  y  $480 \pm 20$  nm (DCLP 505 nm). No se realizaron correcciones para el desbordamiento entre canales o excitación de YFP directa. Se seleccionaron células individuales para su registro basándose en su expresión de  $\sigma_1$  tal como se consideró por su fluorescencia. En experimentos de control (en ausencia de aplicación de agonista) al fotoblanqueamiento de YFP y CFP le siguió un transcurso de tiempo que estaba bien descrito por una función monoexponencial. Se aplicaron los ligandos usando un sistema de perfusión controlado por ordenador, accionado por presión (Octaflow; ALA Scientific Instruments, Westbury, NY, EE.UU.) y se llevaron a cabo los experimentos a temperatura ambiente. Finalmente, se usó un convertidor analógico/digital Digidata 1440 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EE.UU.) para obtener la interfaz del sistema de fotometría y el sistema de perfusión con un ordenador personal, que se usó para controlar estos sistemas y registrar los datos. Finalmente, se usó el software pCLAMP (Molecular Devices) y GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EE.UU.) para la recogida y el análisis de los datos.

40 Finalmente, se determinó la eficiencia de FRET entre los fluoróforos donador (es decir CFP) y aceptor (es decir YFP) mediante la recuperación del donador tras el fotoblanqueamiento del aceptor, en la que si se produce FRET después el blanqueamiento del aceptor produce un aumento significativo en la fluorescencia del donador. En resumen, se montaron y se observaron las células que expresaban la construcción  $\sigma_1^{spCFP/YFP}$  y se determinaron las intensidades de la luz de emisión a 535 nm (YFP<sub>pre</sub>) y a 480 nm (CFP<sub>pre</sub>) tal como se describió anteriormente. No se realizaron correcciones para el desbordamiento entre canales o la excitación de YFP directa. Posteriormente, se realizó el fotoblanqueamiento del aceptor mediante iluminación directa de YFP a 500 nm durante 5 min. Finalmente, se registraron de nuevo las intensidades de emisión de YFP y CFP (YFP<sub>post</sub> y CFP<sub>post</sub>, respectivamente). Se calculó la eficiencia de FRET según la ecuación:  $FRET_{eficiencia} = 1 - (CFP_{pre}/CFP_{post})$ .

### 45 Resultados

Se generaron dos construcciones del receptor  $\sigma_1$  que portaban CFP e YFP en los extremos N y C terminales del receptor  $\sigma_1$ , respectivamente (es decir  $\sigma_1^{CFP/YFP}$  y  $\sigma_1^{spCFP/YFP}$ ) (figura 1A). Se caracterizaron bioquímicamente estas dos construcciones del receptor  $\sigma_1$  y se analizó su expresión en la superficie celular. Aparentemente, ambas construcciones se expresaban bien cuando se transfectaban de manera transitoria en células HEK-392T, por lo que la presencia o ausencia del péptido señal de PTHR no afectó a los niveles totales de expresión de la proteína de ambas construcciones. Sin embargo, cuando se analizó la distribución subcelular de estas dos construcciones por medio de microscopía confocal, estuvo claro que la construcción que portaba el péptido señal de PTHR ( $\sigma_1^{spCFP/YFP}$ ) mostraba una distribución en la membrana plasmática preferencial cuando se comparaba con  $\sigma_1^{CFP/YFP}$  que se acumulaba intracelularmente (figura 1B). Para confirmar adicionalmente estas diferencias en la expresión en la superficie celular, se realizaron experimentos de biotilación para determinar su expresión relativa en la membrana plasmática (figura 1C). De manera interesante, estos experimentos mostraron que  $\sigma_1^{spCFP/YFP}$  se expresaba aproximadamente cuatro veces más en la membrana plasmática cuando se comparaba con la construcción  $\sigma_1^{CFP/YFP}$  (P<0,05) (figura 1C). Se obtuvieron resultados similares con  $\sigma_1^{CFP/YFP}$  y  $\sigma_1^{spCFP/YFP}$  expresados de manera estable en



células HEK-293 (datos no mostrados).

Entonces se analizaron las señales registradas de células HEK-293 individuales que expresaban  $\sigma_1^{\text{spCFP/YFP}}$  a emisiones de 480 nm (CFP) y 535 nm (YFP) con excitación a 436 nm (excitación de CFP). Por tanto, en la figura 2A se registraron las intensidades de emisión de YFP (535 nm, amarillo) y CFP (480 nm, cian) simultáneamente a partir de células individuales que expresaban  $\sigma_1^{\text{spCFP/YFP}}$  usando microscopía de fluorescencia. La iluminación por microscopía permitió realizar experimentos de fotoblanqueamiento para verificar que la emisión a 535 nm se debía de hecho a FRET intramolecular. Por tanto, tras el blanqueamiento del fluoróforo aceptor (es decir YFP) en la construcción  $\sigma_1^{\text{spCFP/YFP}}$  mediante iluminación de luz intensa a 500 nm durante 5 min., aumentó la emisión a 480 nm y disminuyó la emisión a 535 nm, tal como se esperaba (**figura 2A**). Además, cuando se observaron las células en el microscopio antes (pre) y después (post) del fotoblanqueamiento, quedó claro que la fluorescencia global del donador (es decir CFP) aumentaba a lo largo de la célula tras aplicar el protocolo de fotoblanqueamiento (**figura 2B**). A continuación, como controles adicionales, a niveles de fluorescencia comparables, los inventores también determinaron la eficiencia de FRET mediante la coexpresión de CFP más  $\sigma_1^{\text{YFP}}$  e YFP más  $\sigma_1^{\text{CFP}}$ . Por tanto, en estas condiciones experimentales, aunque la eficiencia de FRET de los controles negativos correspondientes (es decir, los pares CFP/ $\sigma_1^{\text{YFP}}$  e YFP/ $\sigma_1^{\text{CFP}}$ ) era insignificante, la eficiencia de FRET de la construcción  $\sigma_1^{\text{spCFP/YFP}}$  era del  $6,8 \pm 1,1$  % ( $P < 0,01$ ) (**figura 2C**). La aplicación del protocolo de fotoblanqueamiento a las células que expresan solo  $\sigma_1^{\text{CFP}}$  no modificó la intensidad de emisión de CFP, tal como se esperaba (datos no mostrados). De manera interesante, en estas condiciones experimentales, cuando se determinó la eficiencia de FRET coexpresando  $\sigma_1^{\text{CFP}}$  más  $\sigma_1^{\text{YFP}}$ , los inventores encontraron una transferencia de energía por resonancia significativa entre estas dos construcciones de  $\sigma_1$  ( $3,5 \pm 0,7$  %;  $P < 0,05$ ) (**figura 2C**), lo que sugiere que  $\sigma_1$  puede formar homodímeros. En general, estos resultados demuestran que  $\sigma_1^{\text{spCFP/YFP}}$  presenta una FRET intramolecular significativa y también que  $\sigma_1$  forma homodímeros estables y específicos cuando se expresa en células vivas.

A continuación, los inventores investigaron si la exposición de  $\sigma_1$  producía cualesquiera reordenamientos de los dominios N y C-terminales (es decir cambio conformacional) del receptor  $\sigma_1$  mediante la monitorización de los cambios en tiempo real en la eficiencia de FRET. Para este fin, se registraron simultáneamente los cambios en las intensidades de emisión de YFP (535 nm, amarillo), CFP (480 nm, cian) y la proporción de  $F_{535}^*/F_{480}^*$  (negro) de células individuales tras la superfusión rápida con ligandos del receptor  $\sigma_1$ . Se investigaron los efectos del agonista PRE-048 y el antagonista haloperidol sobre la señal de FRET de  $\sigma_1^{\text{spCFP/YFP}}$  y se midieron como la proporción de intensidad de emisión corregida por superposición de  $F_{535}^*/F_{480}^*$ . De manera interesante, la adición de PRE-048 100  $\mu\text{M}$  produjo una rápida disminución en la proporción de  $F_{535}^*/F_{480}^*$  (**figura 2D**). Tras una corta demora (~5 s), siguió un transcurso de tiempo monoexponencial con una constante de tiempo  $\tau = 10,3 \pm 0,3$  s ( $n = 3$ ). El aumento simétrico en la emisión de CFP y la disminución en la emisión de YFP indican que el cambio se debió a una disminución en FRET. En las mismas condiciones experimentales, la adición de haloperidol 100  $\mu\text{M}$  produjo tras una corta demora (~2 s) un rápido aumento de la proporción de  $F_{535}^*/F_{480}^*$  (**figura 2E**). De manera similar, un transcurso de tiempo monoexponencial con una constante de tiempo  $\tau = 27,2 \pm 0,8$  s ( $n = 3$ ) siguió el aumento de FRET mediado por haloperidol. Finalmente, los experimentos control con coexpresión de  $\sigma_1^{\text{YFP}}$  y CFP no mostraron FRET en ausencia o presencia de bien PRE-048 o bien haloperidol (datos no mostrados). En general, estos resultados demuestran que la construcción  $\sigma_1^{\text{spCFP/YFP}}$  experimenta cambios conformacionales con la incubación del ligando y que estos cambios podrían ser opuestos dependiendo de la naturaleza del ligando (es decir agonista o antagonista).

Finalmente, se sometieron a prueba varios agonistas (es decir dextrometorfano, (+)-3-PPP, (+)-pentazocina, (+)-SKF-10.047, DTG y PRE-048) y antagonistas (es decir haloperidol, E92 y PRE-048) para confirmar que el agonismo y antagonismo canónico de  $\sigma_1$  producía una disminución o un aumento en la señal de FRET de  $\sigma_1^{\text{spCFP/YFP}}$ , respectivamente (**figura 3**). La figura 3 muestra trazas de emisión de YFP representativas registradas de una célula HEK-293 individual que expresa  $\sigma_1^{\text{spCFP/YFP}}$ , que se ha incubado con agonistas (dextrometorfano, (+)-3-PPP, (+)-pentazocina, (+)-SKF-10.047, DTG y PRE-048) y antagonistas (haloperidol, E92 y NE-100) del receptor  $\sigma_1$ . De manera interesante, mediante la monitorización de la señal de FRET intramolecular de  $\sigma_1^{\text{spCFP/YFP}}$  durante toda la exposición a  $\sigma_1$ , los autores de la invención observaron que el agonista y el antagonista inducían señales de FRET opuestas en la construcción  $\sigma_1^{\text{spCFP/YFP}}$  (**figura 3**). Por tanto, estos resultados confirman que los ligandos del receptor  $\sigma_1$  producen cambios conformacionales opuestos en el receptor  $\sigma_1$  dependiendo de la naturaleza del ligando (por ejemplo agonista frente a antagonista) y por tanto, la construcción  $\sigma_1^{\text{spCFP/YFP}}$  es una herramienta poderosa para clasificar ligandos del receptor  $\sigma_1$ .

#### Lista de secuencias

<110> Laboratorios del Dr. Esteve, S.A.

<120> Método para identificar ligandos para receptores sigma-1

55 <130> P7413PC00

<150> EP12382003.7

<151> 2012-01-10

ES 2 617 515 T3

<160> 16

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 710

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Proteína de fusión sin péptido señal

<400> 1

```

Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu
1          5          10          15

Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly
          20          25          30

Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile
          35          40          45

Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr
          50          55          60

Leu Thr Trp Gly Val Gln Cys Phe Ala Arg Tyr Pro Asp His Met Lys
65          70          75          80

Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu
          85          90          95

Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu
          100          105          110

Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly
          115          120          125

Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr
          130          135          140

Asn Ala Ile Ser Asp Asn Val Tyr Ile Thr Ala Asp Lys Gln Lys Asn
145          150          155          160

```

10

ES 2 617 515 T3

Gly Ile Lys Ala Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser  
165 170 175

Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly  
180 185 190

Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Lys Leu  
195 200 205

Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe  
210 215 220

Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys Glu  
225 230 235 240

Phe Met Gln Trp Ala Val Gly Arg Arg Trp Ala Trp Ala Ala Leu Leu  
245 250 255

Leu Ala Val Ala Ala Val Leu Thr Gln Val Val Trp Leu Trp Leu Gly  
260 265 270

Thr Gln Ser Phe Val Phe Gln Arg Glu Glu Ile Ala Gln Leu Ala Arg  
275 280 285

Gln Tyr Ala Gly Leu Asp His Glu Leu Ala Phe Ser Arg Leu Ile Val  
290 295 300

Glu Leu Arg Arg Leu His Pro Gly His Val Leu Pro Asp Glu Glu Leu  
305 310 315 320

Gln Trp Val Phe Val Asn Ala Gly Gly Trp Met Gly Ala Met Cys Leu  
325 330 335

Leu His Ala Ser Leu Ser Glu Tyr Val Leu Leu Phe Gly Thr Ala Leu  
340 345 350

Gly Ser Arg Gly His Ser Gly Arg Tyr Trp Ala Glu Ile Ser Asp Thr  
355 360 365

Ile Ile Ser Gly Thr Phe His Gln Trp Arg Glu Gly Thr Thr Lys Ser  
370 375 380

Glu Val Phe Tyr Pro Gly Glu Thr Val Val His Gly Pro Gly Glu Ala  
385 390 395 400

Thr Ala Val Glu Trp Gly Pro Asn Thr Trp Met Val Glu Tyr Gly Arg



ES 2 617 515 T3

Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr  
660 665 670

Leu Ser Tyr Gln Ser Ala Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp  
675 680 685

His Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly  
690 695 700

Met Asp Glu Leu Tyr Lys  
705 710

<210> 2

<211> 735

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Proteína de fusión con péptido señal

<400> 2

ES 2 617 515 T3

Met Gly Thr Ala Arg Ile Ala Pro Gly Leu Ala Leu Leu Leu Cys Cys  
 1 5 10 15

Pro Val Leu Ser Ser Ala Tyr Ala Leu Ala Val Ser Lys Gly Glu Glu  
 20 25 30

Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val Glu Leu Asp Gly Asp Val  
 35 40 45

Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr  
 50 55 60

Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro  
 65 70 75 80

Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Leu Thr Trp Gly Val Gln Cys  
 85 90 95

Phe Ala Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Gln His Asp Phe Phe Lys Ser  
 100 105 110

Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp  
 115 120 125

Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr  
 130 135 140

Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly



ES 2 617 515 T3

Gln Trp Arg Glu Gly Thr Thr Lys Ser Glu Val Phe Tyr Pro Gly Glu  
 405 410 415

Thr Val Val His Gly Pro Gly Glu Ala Thr Ala Val Glu Trp Gly Pro  
 420 425 430

Asn Thr Trp Met Val Glu Tyr Gly Arg Gly Val Ile Pro Ser Thr Leu  
 435 440 445

Ala Phe Ala Leu Ala Asp Thr Val Phe Ser Thr Gln Asp Phe Leu Thr  
 450 455 460

Leu Phe Tyr Thr Leu Arg Ser Tyr Ala Arg Gly Leu Arg Leu Glu Leu  
 465 470 475 480

Thr Thr Tyr Leu Phe Gly Gln Asp Pro Arg Asp Pro Pro Val Ala Thr  
 485 490 495

Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu  
 500 505 510

Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly  
 515 520 525

Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Leu Ile  
 530 535 540

Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr  
 545 550 555 560

Phe Gly Tyr Gly Leu Gln Cys Phe Ala Arg Tyr Pro Asp His Met Lys  
 565 570 575

Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu  
 580 585 590

Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu  
 595 600 605

Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly  
 610 615 620

Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr  
 625 630 635 640

Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn  
 645 650 655



ES 2 617 515 T3

Gly Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser  
660 665 670

Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly  
675 680 685

Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Tyr Gln Ser Ala Leu  
690 695 700

Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe  
705 710 715 720

Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys  
725 730 735

<210> 3

<211> 2133

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polinucleótido que codifica para una proteína de fusión sin péptido señal

<400> 3

ES 2 617 515 T3

atggtgagca agggcgagga gctgttcacc ggggtggtgc ccatcctggt cgagctggac	60
ggcgacgtaa acggccacaa gttcagcgtg tccggcgagg gcgagggcga tgccacctac	120
ggcaagctga ccctgaagtt catctgcacc accggcaagc tgcccgtgcc ctggcccacc	180
ctcgtgacca ccctgacctg gggcgtgcag tgcttcgccc gctaccccga ccacatgaag	240
cagcacgact tcttcaagtc cgccatgccc gaaggctacg tccaggagcg caccatcttc	300
ttcaaggacg acggcaacta caagaccgc gccgaggtga agttcgaggg cgacaccctg	360
gtgaaccgca tcgagctgaa gggcatcgac ttcaaggagg acggcaacat cctggggcac	420
aagctggagt acaacgccat cagcgacaac gtctatatca ccgccgacaa gcagaagaac	480
ggcatcaagg ccaacttcaa gatccgccac aacatcgagg acggcagcgt gcagctcgcc	540
gaccactacc agcagaacac ccccatcggc gacggccccg tgctgctgcc cgacaaccac	600
tacctgagca cccagtccaa gctgagcaaa gaccccaacg agaagcgcga tcacatggtc	660
ctgctggagt tcgtgaccgc cgccgggatc actctcggca tggacgagct gtacaaggaa	720
ttcatgcagt gggccgtggg ccggcggtgg gcgtgggccc cgctgctcct ggctgtcgca	780
gcggtgctga cccaggtcgt ctggctctgg ctgggtacgc agagcttcgt cttccagcgc	840
gaagagatag cgcagttggc gcggcagtac gctgggctgg accacgagct ggccttctct	900
cgtctgatcg tggagctgcg gcggctgcac ccaggccacg tgctgcccga cgaggagctg	960
cagtgggtgt tcgtgaatgc ggggtggctgg atgggcgcca tgtgccttct gcacgcctcg	1020

# ES 2 617 515 T3

```

ctgtccgagt atgtgctgct cttcggcacc gccttgggct cccgcggcca ctcggggcgc 1080
tactgggctg agatctcggg taccatcatt tctggcacct tccaccagtg gagagagggc 1140
accaccaaaa gtgaggtctt ctaccagggg gagacggtag tacacggggc tgggtgaggca 1200
acagctgtgg agtggggggc aaacacatgg atgggtggagt acggccgggg cgatcatcca 1260
tccaccctgg ccttcgcgct ggccgacact gtcttcagca cccaggactt cctcaccctc 1320
ttctatactc ttcgctccta tgctcggggc ctccggcttg agctcaccac ctacctcttt 1380
ggccaggacc ctcgggatcc accggtcgcc accatggtga gcaagggcga ggagctgttc 1440
accgggggtg tgcccatcct ggtcgagctg gacggcgacg taaacggcca caagttcagc 1500
gtgtccggcg agggcgaggg cgatgccacc tacggcaagc tgaccctgaa gcttatctgc 1560
accaccggca agctgcccgt gccctggccc accctcgtga ccaccttcgg ctacggcctg 1620
cagtgtctcg cccgctaccc cgaccacatg aagcagcacg acttcttcaa gtccgccatg 1680
cccgaaggct acgtccagga ggcgaccatc ttcttcaagg acgacggcaa ctacaagacc 1740
cgcgccgagg tgaagttcga gggcgacacc ctggtgaacc gcatcgagct gaagggcatc 1800
gacttcaagg aggacggcaa catcctgggg cacaagctgg agtacaacta caacagccac 1860
aacgtctata tcatggccga caagcagaag aacggcatca aggtgaactt caagatccgc 1920
cacaacatcg aggacggcag cgtgcagctc gccgaccact accagcagaa ccccccatc 1980
ggcgacggcc ccgtgctgct gcccgacaac cactacctga gctaccagtc cgccctgagc 2040
aaagaccca acgagaagcg cgatcacatg gtctgctgg agttcgtgac cgccgcccgg 2100
atcactctcg gcatggacga gctgtacaag taa 2133

```

<210> 4

<211> 2205

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polinucleótido que codifica para una PF con péptido señal

<400> 4

ES 2 617 515 T3

atggggaccg cccggatcgc acccggcctg gcgctcctgc tctgctgcc cgtgctcagc	60
tccgcgtacg cgctagccgt gagcaagggc gaggagctgt tcaccggggt ggtgcccatc	120
ctggtcgagc tggacggcga cgtaaacggc cacaagttca gcgtgtccgg cgagggcgag	180
ggcgatgcca cctacggcaa gctgaccctg aagttcatct gcaccaccgg caagctgccc	240
gtgccctggc ccaccctcgt gaccaccctg acctggggcg tgcagtgctt cgcccgtac	300
cccgaccaca tgaagcagca cgacttcttc aagtccgcca tgcccgaagg ctacgtccag	360
gagcgacca tcttcttcaa ggacgacggc aactacaaga cccgcgccga ggtgaagttc	420

ES 2 617 515 T3

gagggcgaca ccctggtgaa ccgcatcgag ctgaagggca tcgacttcaa ggaggacggc 480  
aacatcctgg ggcacaagct ggagtacaac gccatcagcg acaacgttat atcaccgccg 540  
acaagcagaa gaacggcatc aaggccaact tcaagatccg ccacaacatc gaggacggca 600  
gcgtgcagct cgccgaccac tacagcagaa cacccecatc ggcgacggcc ccgtgctgct 660  
gcccgacaac cactacctga gcaccagtc caagctgagc aaagaccca acgagaagcg 720  
cgatcacatg gtctgctgg agttcgtgac cgccgccggg atcactctcg gcatggacga 780  
gctgtacaag gaattcatgc agtgggccgt gggccggcgg tgggcgtggg ccgcgctgct 840  
cctggctgtc gcagcgggtc tgaccaggt cgtctggctc tggctgggta cgcagagctt 900  
cgtcttcag cgcaagaga tagcgcagtt ggcgcggcag tacgctgggc tggaccacga 960  
gctggccttc tctcgtctga tcgtggagct gcggcggctg cacccgcca cgtgctgccc 1020  
gacgaggagc tgcagtggtt gttcgtgaat gcgggtggct ggatgggcgc catgtgcctt 1080  
ctgcacgct cgctgtccga gtatgtgctg ctcttcggca ccgccttggg ctcccgcggc 1140  
cactcggggc gctactgggc tgagatctcg gataccatca tctctggcac ctccaccag 1200  
tggagagagg gcaccaccaa aagtgaggtc ttctaccag gggagacggg agtacacggg 1260  
cctggtgagg caacagctgt ggagtggggg ccaaacacat ggatggtgga gtacggccgg 1320  
ggcgtcatcc catccaccct ggccttcgcg ctggccgaca ctgtcttcag caccagggac 1380  
ttcctcacc tcttctatac tcttcgctcc tatgctcggg gcctccggct tgagctcacc 1440  
acctacctt ttggccagga ccctcgggat ccaccggtcg ccaccatggt gagcaagggc 1500  
gaggagctgt tcaccggggt ggtgcccatc ctggtcgagc tggacggcga cgtaaaccggc 1560  
cacaagttca gcgtgtccgg cgagggcgag ggcgatgcca cctacggcaa gctgaccctg 1620  
aagcttatct gcaccaccgg caagctgcc gtgccctggc ccaccctcgt gaccacctc 1680  
ggctacggcc tgcagtgctt cgcccgtac cccgaccaca tgaagcagca cgacttcttc 1740  
aagtccgcca tgcccgaagg ctacgtccag gagcgcacca tcttcttcaa ggacgacggc 1800  
aactacaaga cccgcgccga ggtgaagttc gagggcgaca ccctggtgaa ccgcatcgag 1860  
ctgaagggca tcgacttcaa ggaggacggc aacatcctgg ggcacaagct ggagtacaac 1920  
tacaacagcc acaacgtcta tatcatggcc gacaagcaga agaaccggcat caaggtgaac 1980  
ttcaagatcc gccacaacat cgaggacggc agcgtgcagc tcgccgacca ctaccagcag 2040  
aacaccccca tcggcgacgg ccccgtgctg ctgcccgaca accactacct gagctaccag 2100  
tccgccctga gcaaagacc caacgagaag cgcgatcaca tggctcctgct ggagttcgtg 2160  
accgccgccc ggatcactct cggcatggac gagctgtaca agtaa 2205

ES 2 617 515 T3

<211> 25

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 5

Met Gly Thr Ala Arg Ile Ala Pro Gly Leu Ala Leu Leu Leu Cys Cys  
1 5 10 15

5 Pro Val Leu Ser Ser Ala Tyr Ala Leu  
20 25

<210> 6

<211> 20

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

10 <400> 6

Met Val Leu Leu Leu Ile Leu Ser Val Leu Leu Leu Lys Glu Asp Val  
1 5 10 15

Arg Gly Ser Ala  
20

<210> 7

<211> 38

<212> PRT

15 <213> *Homo sapiens*

<400> 7

Met Ala Ser Pro Arg Ser Ser Gly Gln Pro Gly Pro Pro Pro Pro Pro  
1 5 10 15

Pro Pro Pro Pro Ala Arg Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Pro Leu Leu  
20 25 30

Leu Pro Leu Ala Pro Gly  
35

<210> 8

<211> 8

20 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 8

Pro Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val  
1 5

<210> 9

25 <211> 24

ES 2 617 515 T3

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 9

Met Leu Ser Leu Arg Gln Ser Ile Arg Phe Phe Lys Pro Ala Thr Arg  
1 5 10 15

Thr Leu Cys Ser Ser Arg Tyr Leu  
20

5 <210> 10

<211> 29

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 10

Met Met Ser Phe Val Ser Leu Leu Leu Val Gly Ile Leu Phe Trp Ala  
1 5 10 15

Thr Glu Ala Glu Gln Leu Thr Lys Cys Glu Val Phe Gln  
20 25

10

<210> 11

<211> 4

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

15 <400> 11

Lys Asp Glu Leu  
1

<210> 12

<211> 21

<212> ADN

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador FSEcoRI

<400> 12

cggaattcat gcagtgggcc g

21

25 <210> 13

<211> 28

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

30 <223> RSBamHI

ES 2 617 515 T3

<400> 13  
caggatcccg agggtcctgg ccaaagag 28

<210> 14  
<211> 30  
5 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Cebador FCFPHindIII  
<400> 14  
10 cgaagttcat ggtgagcaag ggcgaggagc 30

<210> 15  
<211> 30  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
15 <220>  
<223> Cebador RCFPEcoRI  
<400> 15  
ccggaattcc ttgtacagct cgtccatgcc 30

<210> 16  
20 <211> 18  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Cebador FspCFPHindIII  
25 <400> 16  
gtttaaactt aagttcgg 18



**REIVINDICACIONES**

1. Una proteína de fusión que comprende
  - (i) un receptor  $\sigma_1$  o una variante funcionalmente equivalente del mismo, en donde dicho equivalente funcional del receptor  $\sigma_1$  tiene una identidad secuencia de aminoácidos de al menos el 70 % con el receptor humano  $\sigma_1$  de tipo natural y en donde dicho equivalente funcional del receptor  $\sigma_1$  tiene la capacidad de unirse al haloperidol con una afinidad de al menos el 10 % del receptor  $\sigma_1$  humano de tipo natural,
  - (ii) un resto de proteína fluorescente donador, y
  - (iii) un resto de proteína fluorescente aceptor,

en donde dichos restos de proteína fluorescente donador y aceptor son capaces de producir transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) y en la que el receptor  $\sigma_1$  está flanqueado por el resto de proteína fluorescente donador y el resto de proteína fluorescente aceptor.
2. La proteína de fusión según la reivindicación 1, en la que la transferencia de energía desde el resto de proteína fluorescente donador en un estado excitado hasta el resto de proteína fluorescente aceptor aumenta si un antagonista del receptor  $\sigma_1$  se une al receptor  $\sigma_1$ .
3. La proteína de fusión según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en la que la transferencia de energía desde el resto de proteína fluorescente donador en un estado excitado hasta el resto de proteína fluorescente aceptor se produce si no se une ningún ligando al receptor  $\sigma_1$ .
4. La proteína de fusión según la reivindicación 3, en la que la transferencia de energía desde el resto de proteína fluorescente donador en un estado excitado hasta el resto de proteína fluorescente aceptor disminuye si un agonista del receptor  $\sigma_1$  se une al receptor  $\sigma_1$ .
5. La proteína de fusión según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que el resto de proteína fluorescente donador y/o el resto de proteína fluorescente aceptor son proteínas fluorescentes relacionadas con *Aequorea* y preferiblemente, en la que el resto de proteína fluorescente donador es la proteína fluorescente cian (CFP) y/o el resto de proteína fluorescente aceptor es la proteína fluorescente amarilla (YFP).
6. La proteína de fusión según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende además un péptido señal de localización N-terminal o C-terminal.
7. La proteína de fusión según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que dicha proteína de fusión tiene la secuencia de aminoácidos según SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2.
8. Una membrana que comprende la proteína de fusión según se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
9. Un polinucleótido que comprende una secuencia codificante que codifica para una proteína de fusión según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
10. Una célula que comprende la proteína de fusión según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, la membrana según la reivindicación 8, y/o el polinucleótido según la reivindicación 9.
11. Uso de una proteína de fusión según las reivindicaciones 1-7, una membrana según la reivindicación 8, un polinucleótido según la reivindicación 9 y/o una célula según la reivindicación 10 para identificar un ligando para un receptor  $\sigma_1$ .
12. El uso según la reivindicación 11, en el que dicho ligando es un antagonista o un agonista.
13. Un método para identificar un ligando para un receptor  $\sigma_1$  que comprende:
  - (i) exponer una proteína de fusión según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, una proteína de fusión comprendida en una membrana según la reivindicación 8, o una proteína de fusión comprendida en una célula según la reivindicación 10 a luz de una longitud de onda que excita el resto de proteína fluorescente donador, con lo que el resto de proteína fluorescente donador fluoresce a una primera longitud de onda de emisión, en donde la luz de la primera longitud de emisión es capaz de excitar el resto de proteína fluorescente aceptor;
  - (ii) detectar luz de una segunda longitud de onda de emisión emitida por el resto de proteína aceptor;
  - (iii) poner en contacto la proteína de fusión, la membrana y/o la célula de la etapa (i) con un compuesto de prueba; y
  - (iv) detectar luz de una segunda longitud de onda de emisión emitida por el resto de proteína aceptor de la proteína de fusión de la etapa (iii) y opcionalmente, un control;

en donde, si se conoce la intensidad de luz de una segunda longitud de onda de emisión emitida durante la etapa (i) o si se incluye un control, puede omitirse la etapa (ii) y, cuando se omite, puede llevarse a cabo la etapa (iii) antes de la etapa (i), y en donde el compuesto de prueba se identifica como un ligando para un receptor  $\sigma_1$  si hay una diferencia en la intensidad de luz de la segunda longitud de onda de emisión detectada en la etapa (iv) y

- 5 - la intensidad de luz de la segunda longitud de onda de emisión detectada en la etapa (ii),  
- la intensidad de luz de la segunda longitud de onda de emisión que se sabe que se emite durante etapa (i), o  
- la intensidad de luz de la segunda longitud de onda de emisión del control.

14. El método según la reivindicación 13, que comprende:

- 10 (i) exponer una proteína de fusión según una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, una proteína de fusión comprendida en una membrana según la reivindicación 8, o una proteína de fusión comprendida en una célula según la reivindicación 10 a luz de una longitud de onda que excita el resto de proteína fluorescente donador, con lo que el resto de proteína fluorescente donador fluoresce a una primera longitud de onda de emisión, en donde la luz de la primera longitud de emisión es capaz de excitar el resto de proteína fluorescente aceptor;
- 15 (ii) detectar luz de una segunda longitud de onda de emisión emitida por el resto de proteína aceptor de dicha proteína de fusión;
- (iii) poner en contacto dicha proteína de fusión con un compuesto de prueba; y
- (iv) detectar luz de una segunda longitud de onda de emisión emitida por el resto de proteína aceptor de dicha proteína de fusión;

20 en donde el compuesto de prueba se identifica como un ligando para un receptor  $\sigma_1$  si hay una diferencia en la intensidad de luz de la segunda longitud de onda de emisión detectada en la etapa (iv) y la intensidad de luz de la segunda longitud de onda de emisión detectada en la etapa (ii).

15. Un kit que comprende la proteína de fusión según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, la membrana de la reivindicación 8, el polinucleótido según la reivindicación 9, y/o la célula según la reivindicación 10.

25 16. El kit según la reivindicación 15 que comprende adicionalmente reactivos para llevar a cabo el método según las reivindicaciones 13-14.

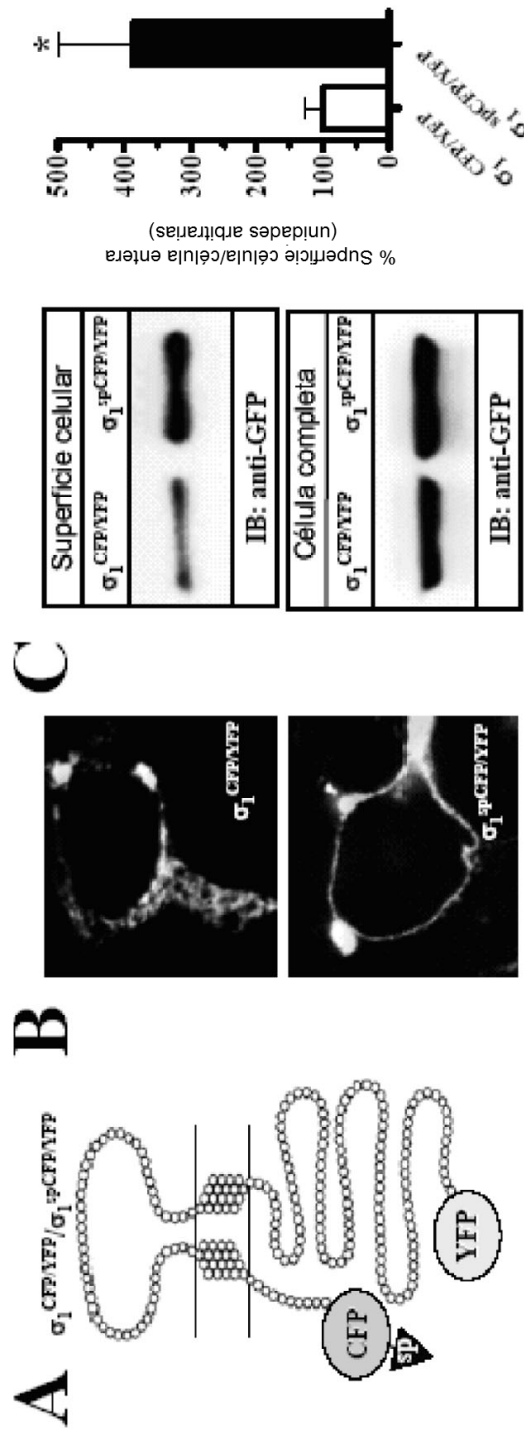


FIGURA 1

FIGURA 2

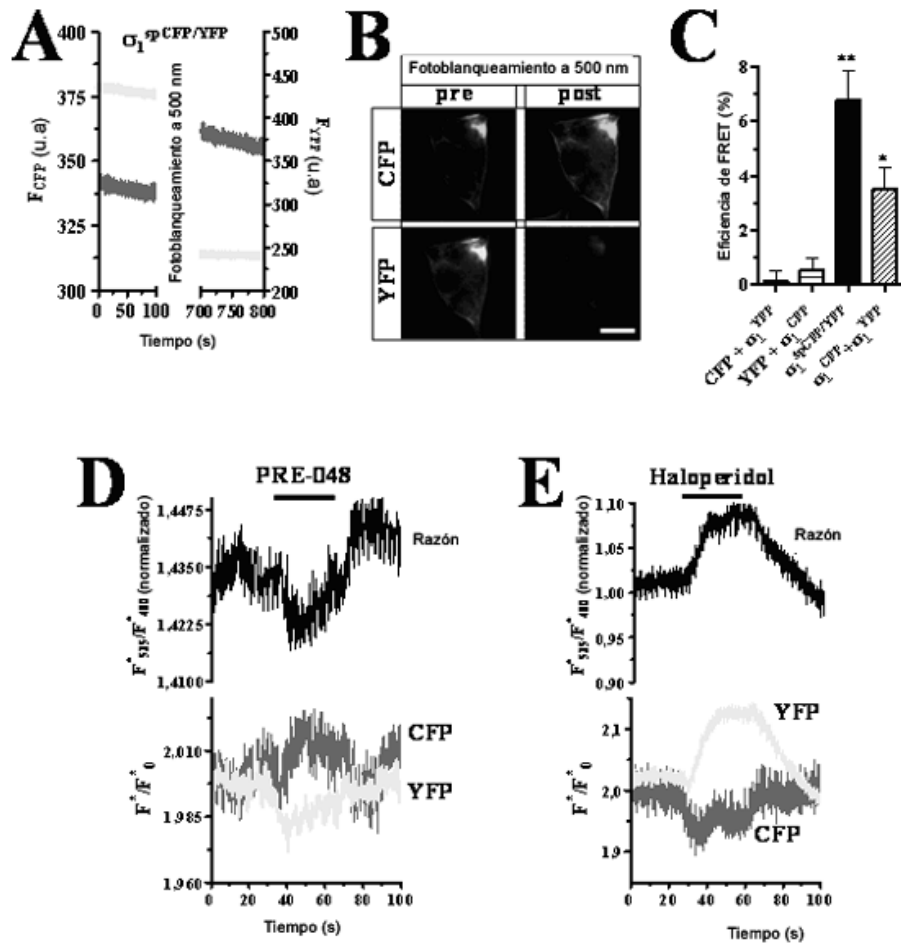


Figura 3

