

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 641 271**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/50** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.10.2007 PCT/US2007/082993**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.05.2008 WO08055153**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.10.2007 E 07871287 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.08.2017 EP 2198300**

54 Título: **Ensayo de gen indicador, kit y células con sensibilidad y/o especificidad mejoradas para determinar el nivel del TNF-alfa**

30 Prioridad:

**30.10.2006 US 863479 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**08.11.2017**

73 Titular/es:

**LE CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE (CNRS) (50.0%)  
3, RUE MICHEL ANGE  
75794 PARIS CEDEX 16, FR y  
BIOMONITOR LIMITED (50.0%)**

72 Inventor/es:

**LALLEMAND, CHRISTOPHE y  
TOVEY, MICHAEL**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**ES 2 641 271 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**

Ensayo de gen indicador, kit y células con sensibilidad y/o especificidad mejoradas para determinar el nivel del TNF-alfa

5 **Antecedentes de la invención**

**Campo de la invención**

10 La presente invención se refiere a un ensayo de gen indicador y a un kit para determinar la presencia y/o el nivel, en una muestra, de una señal extracelular que activa la actividad de transducción de la señal de una molécula o complejo de superficie celular. La presente invención se refiere adicionalmente a una línea celular que ese puede utilizar en dicho ensayo.

15 **Descripción de la técnica relacionada**

Las proteínas de la superficie celular permiten la transducción intracelular de señales extracelulares. Las proteínas de la superficie celular proporcionan a las células eucariotas, así como procariotas, un medio para detectar señales extracelulares y transducen dichas señales intracelularmente de manera que en último término dan como resultado una respuesta celular o una respuesta tisular u orgánica concertada. Las proteínas de la superficie celular, al transmitir intracelularmente la información con respecto al ambiente extracelular mediante rutas intracelulares específicas, inducen una respuesta apropiada a un estímulo particular. La respuesta puede ser inmediata y transitoria, lenta y sostenida, o cualquier mezcla de las mismas. Mediante una matriz de proteínas de superficie de membrana variadas, las células eucariotas son exquisitamente sensibles a su medio ambiente.

20 Manna (J Immunol 2000; 165:4927-4934) desvela células Jurkat humanas transfectadas transitoriamente con una construcción de un gen indicador que responde al TNF-alfa que comprende una fosfatasa alcalina secretora estable al calor (SEAP) unida a un ADN promotor de NF-κB.

30 Las moléculas de señal extracelulares, tales como citocinas, factores de crecimiento, hormonas, vasodilatadores, y neurotransmisores, ejercen sus efectos, al menos en parte, mediante la interacción con proteínas de la superficie celular. Por ejemplo, algunas moléculas de señal extracelular producen cambios en la transcripción de genes diana mediante cambios en los niveles de mensajeros secundarios, tales como el cAMP. Otras señales alternan la expresión genética indirectamente activando la expresión de genes, tales como los genes inmediato-tempranos que codifican proteína reguladoras, que a su vez activan la expresión de otros genes que codifican proteínas reguladoras de la transcripción. Otras moléculas de señal extracelular producen la activación de transductores de señal citoplasmática y proteínas activadoras de la transcripción (STAT) que aumentan la transcripción de grupos específicos de genes.

40 Los receptores de superficie celular y los canales de iones están entre las proteínas de superficie celular que responden a señales extracelulares e inician los eventos que dan lugar a esta expresión genética y respuestas variadas. Los canales de iones y los receptores localizados en la superficie celular son ubicuos y proteínas de la membrana de la superficie celular fisiológicamente importantes.

45 **Receptores de superficie celular**

Los receptores localizados en la superficie celular son proteínas que abarcan la membrana que se unen a moléculas de señalización extracelular o cambios en el medio ambiente extracelular y transmiten la señal mediante las rutas de transducción de la señal para efectuar una respuesta celular. Los receptores de la superficie celular se unen a moléculas de señal circulantes, tales como las citocinas, factores de crecimiento y hormonas, etc., como la etapa inicial en la inducción de numerosas rutas intracelulares. Los receptores se clasifican basándose en el Tipo particular de ruta que se induce. Entre estas clases de receptores hay clases de receptores de citocinas que incluyen las que se unen a factores de crecimiento y que tienen una actividad tirosina cinasa intrínseca, tales como los receptores del factor de crecimiento que se unen a la heparina (HBGF), la superfamilia de receptores de inmunoglobulinas, la superfamilia de receptores de citocinas/hematopoyetina, la superfamilia de receptores del factor de crecimiento de nervios, otros receptores de tirosina o serina cinasas, y los que se acoplan a proteína efectoras mediante proteínas reguladoras de la unión del nucleótido guanina, a los que se hacer referencia como receptores acoplados a proteína G y proteínas G, respectivamente.

60 Las citocinas son mensajeros intercelulares que coordinan la comunicación entre las células de un tejido particular, por ejemplo, interacciones entre anticuerpos y células T del sistema inmunitario, y sirven para modular o modificar la repuesta biológica. Son pleiotrópicas y tienen un amplio espectro de efectos biológicos sobre más de un Tipo de células o tejidos. Los receptores para las citocinas se agrupan ampliamente en dos clases, en que los receptores de citocinas de Clase I incluyen receptores que se unen a distintas interleucinas (IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-7, IL-9, IL-11, IL-12, IL-15), eritropoyetina (EPO), hormona de crecimiento (GH), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos macrófagos (GM-CSF), factor inhibidor de leucemia (LIF), y

factor neurotrófico ciliar (CNTF), y los receptores de citocina de Clase II incluye receptores que se unen al interferón (IFN)  $\alpha/\beta$ , IFN $\gamma$ , e IL-10.

### Receptores de interferón

5 Los interferones humanos (IFN) son una familia de citocinas helicoidales homólogas compuestas por tres clases distintas: Tipo I, Tipo II, y Tipo III que se basan en la homología de secuencias de nucleótidos y aminoácidos. Los IFN Tipo I humanos consisten en IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\epsilon$ , IFN- $\kappa$ , e IFN- $\omega$ . El IFN- $\alpha$  humano incluye un grupo de proteínas relacionadas estrechamente codificadas por al menos 12 genes de IFN- $\alpha$  funcionales. Los IFN- $\beta$ , IFN- $\epsilon$ ,  
10 IFN- $\kappa$  e IFN- $\omega$  se codifican por genes relacionados únicos relacionados más distantes. El IFN Tipo II, o IFN- $\gamma$ , esta codificado por un gen no relacionado y se une a distintos receptores de superficie celular (De Maeyer et al., 1988; Pestka et al., 1987 y Diaz et al., 1993). Recientemente, se ha descrito un nuevo grupo de interferones designados IFN-X o IFN de Tipo III. El grupo tiene tres miembros IFN-X1, IFN-X2, e IFN-X3 también llamado interleucina-29 (IL-29) (X1), e IL-28A/B (X2/3). (Sheppard et al., 2003; y Ank et al., 2006).

15 Los IFN Tipo I se unen a un receptor común, como se muestra por su capacidad para competir de manera cruzada por la unión al receptor (Pestka et al., 1987; Branca et al., 1981; y Merlin et al., 1985). El receptor de interferón Tipo I tiene el número más grande de ligandos naturales, algunos hasta 14 en total, de todos los receptores de citocinas conocidos. La unión de los interferones a su receptor de superficie celular representa la etapa inicial y  
20 probablemente más específica de la ruta de señalización de IFN.

El receptor del IFN Tipo I está compuesto por dos glucoproteínas transmembrana, INFAR1 y INFAR2 (Uze et al., 1990; Novick et al., 1994; Lutfalla et al., 1995; Domanski et al., 1995), que se fosforilan rápidamente después de la unión con el IFN (Platanias et al., 1994; Constantinescu et al., 1994; y Abramovich et al., 1994). Ambas subunidades pertenecen a la superfamilia de receptores de citocinas de clase II (Bazan et al., 1990 y Thoreau et al., 1990) y son necesarios para la unión de ligando de alta afinidad y el establecimiento de la actividad biológica (Langer et al., 1996 y Domanski et al., 1996). Los receptores de citocinas de Clase II se distinguen de los receptores de Clase I basándose en el patrón de las parejas conservadas de restos de cisteína que se cree que forman enlaces disulfuro.  
30

El receptor del IFN Tipo II (IFN $\gamma$ ) está compuesto por dos glucoproteínas transmembrana, IFNGR1 e IFNGR2 que se pre-ensamblan en la superficie celular. La unión del IFN $\gamma$  a su receptor activa las tirosina cinasas Jak1 y Jak2 dando como resultado la tirosina-fosforilación y la formación de un homodímero Stat1. El homodímero Stat1 activado se translocaliza entonces en el núcleo donde se une a la GAS (Secuencia activada gamma) dando como resultado la activación transcripcional de los genes activados de IFN $\gamma$ .  
35

Los interferones de Tipo III se une a un receptor único que comprende la IL-28R $\alpha$ , que es específica de una cadena de los IFN-X, y la cadena IL-10R $\beta$  que también es parte de los receptores para la IL-10, IL-22, e IL-26 (Ank et al, 2006).  
40

Al contrario que con otros receptores de citocinas, particularmente el receptor de IFN $\gamma$ , ni el IFNAR1 ni el IFNAR2 solos se unen a IFN $\alpha$  ni a IFN $\beta$  con una afinidad comparable al heterodímero. A pesar del hecho de que el IFNAR2 tiene un papel importante en la unión al ligando, el IFNAR1 contribuye a la unión con el IFN aumentando la afinidad del complejo de receptores (4-10 veces) respecto al del IFNAR2 solo. El IFNAR1 también modula la especificidad de la unión al ligando respecto a la observada en el IFNAR2 solo (Cohen et al., 1995; Russell-Harde et al., 1995; Cutrone et al., 1997; y Cook et al., 1996). El IFNAR1 tiene un dominio extracelular más grande que la mayoría de los demás receptores de citocinas de Clase II, compuesto por 4 subdominios Tipo inmunoglobulinas separados por motivos di o tri-prolinas que se pueden dividir en dos repeticiones en tándem (Novick et al., 1994; Lutfalla et al., 1992; y Uzé et al., 1995).  
50

El IFNAR1 humano, murino y bovino se han clonado y expresado en células humanas y murinas. Los estudios que se han llevado a cabo con células transfectadas muestran que el IFNAR1 tiene un papel central en la unión al ligando, las respuestas celulares a los IFN y en la inducción de actividades biológicas de los interferones Tipo I (Novick et al., 1994; Abramovich et al., 1994; Uzé et al., 1992; Mouchel-Vielh et al., 1992; Lim et al., 1993; Cleary et al., 1994; Constantinescu et al., 1995; Hwang et al., 1995; Vandebroek et al., 1995; y Colamonici et al., 1994). El receptor del IFN también determina el alto grado de especificidad de especie característico de los IFN. Por lo tanto, la transfección de células de ratón con IFNAR1 e IFNAR2 hace que las células de ratón sean sensibles a los IFN Tipo I humanos ya que tanto las células humanas como las de ratón comparten una ruta de señalización común y elementos de respuesta a IFN comunes en las regiones de los genes regulados por IFN. Además, se ha demostrado que el dominio intracelular del IFNAR1 tiene un papel clave en la transducción de la señal iniciada en la superficie celular uniendo los interferones de Tipo I al núcleo (Basu et al., 1998). La destrucción dirigida del gen de IFNAR1 da como resultado la pérdida de la respuesta antiviral de los IFN Tipo I demostrando que este receptor polipeptídico es un componente esencial del complejo de receptores y que se necesitan tanto la subunidad IFNAR1 como IFNAR2 para la señalización de IFN $\alpha$  e IFN $\beta$  (Vandebroek et al., 1995; Muller et al., 1994; Fiette et al., 1995; Steinhoff et al., 1995; y van den Broek et al., 1995).  
65

La unión del interferón Tipo I al complejo de receptores activa dos Janus cinasas, Tyk2 y JAK1, que median en la tirosina fosforilación y en la activación de dos factores de transcripción citoplasmáticos latentes STAT1 y STAT2 que forman un complejo (ISGF3) con una proteína de unión a ADN p48, proteína de respuesta al interferón 9 (IRF 9), que se translocaliza en el núcleo para promover la transcripción genética específica (Fu et al., 1992; Schindler et al., 1992; Darnell et al., 1994; Ihle et al., 1995; y Taniguchi, 1995). Tanto Tyk2 como STAT2 están asociadas constitutivamente con la región próximas de membrana de la cadena de IFNAR1, mientras que JAK1 y STAT1 están asociadas físicamente con IFNAR2 y los cuatro factores se activan rápidamente durante la estimulación con IFN $\alpha$  (Lutfalla et al., 1995; Bazan, 1990; Basu et al., 1998; Barbieri et al., 1994; Velazquez et al., 1995; Uddin et al., 1995; Yan et al., 1996(a) y 1996(b)).

La unión de los IFN Tipo III a su receptor de superficie celular también activa el complejo ISGF3 lo que sugiere que los IFN Tipo III también activan varios genes en común con los IFN Tipo I (Ank et al., 2006).

Las poblaciones clave de células incluyen las CD distribuidas a lo largo de los tejidos periféricos actúan como centinelas capaces de reconocer agentes infecciosos por medio de receptores de reconocimiento de patrones (PRR). Estos incluyen la familia de receptores Tipo Toll (TLR) de la superficie celular y los receptores de membrana endosómicos (Uematsu y Akira, 2007) y los receptores proteicos citosólicos Tipo gen I inducible por el ácido retinoico (RIG-I), RIG-i, MDA5 y LGP2 (Yoneyama y Fujita, 2007). Se han identificado trece miembros de la familia de TLR en mamíferos (Uematsu y Akira, 2007). Cada TLR media en una respuesta distinta en asociación con diferentes combinaciones de cuatro proteínas adaptadoras que contienen el dominio del receptor de IL-1/Toll (TIR) (MyD88, TRIF, TRAP/MAL, y TRAM). Todos los TLR excepto el TLR3 interactúan con MyD88. El TLR3 que reconoce el ARN vírico de cadena sencilla o cadena doble, se localiza en los endosomas de las CD mieloides y necesita la acidificación de vesículas para la activación. El TLR3 señala mediante TRIF y activa el TBK1/I KKe que fosforila el factor 3 regulador de interferón 3 (IRF3) y NF $\kappa$ B, que da como resultado la producción de IFN $\beta$  (Hemmi et al., 2004, Perry et al., 2004). Los receptores proteicos Tipo RIG-I son DExD/H box ARN helicasas, dos de las cuales, RIG-I y MDA5, albergan motivos Tipo activación de caspasa y del dominio de reclutamiento (CARD) en el extremo N (Yoneyama y Fujita, 2007). El dominio CARD interactúa con IPS-1 dando como resultado la activación de IRF3 y NF $\kappa$ B, y la producción de IFN $\beta$ . Por lo tanto, la activación de los PRR da lugar a la producción de citocinas pro-inflamatorias que incluyen los IFN Tipo I y la activación de la respuesta inmunitaria innata. Las células dendríticas señalizan principalmente mediante los TLR mientras que los receptores Tipo RIG-I predominan en otros Tipos celulares. Se pueden distinguir dos sub-grupos principales de CD en el ser humano, CD mieloides derivadas de monocitos, CD11c(+), presentes en la mayoría de los tejidos, y CD plasmacitoides (pCD), CD11c(-), presentes principalmente en los ganglios linfáticos. Las CD plasmacitoides son las productoras principales de IFN Tipo I en respuesta a virus (Steinmann y Hemmi, 2006). Las CD plasmacitoides expresan altos niveles de TLR 7/8 y TLR9 que reconocen ARN de cadena sencilla (ssARN) y ADN CpG, respectivamente (Diebold et al., 2004, Heli et al., 2004). Hemmi et al., 2000) La activación tanto de TLR 7/8 y TLR9 da lugar a la formación de un complejo con MyD88 y la fosforilación de IRF7 y la producción de altos niveles de IFN de Tipo I (Uematsu y Akira, 2007).

#### Receptores de TNF

El factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) en una citocina multifuncional que ejerce efectos pleiotrópicos en diferentes Tipos celulares. El TNF- $\alpha$  se sintetiza como pro-TNF, una proteína unida a la membrana de 26 kDa, que se libera al escindir su dominio pro por la enzima convertidora de TNF (TACE) para dar lugar a una proteína de 17 kDa que consiste en 157 aminoácidos que se encuentra como un homotrímero en solución. El TNF- $\alpha$  se une a dos receptores distintos el TNFR-1 (p55) y el TNFR-2 (p75). El TNFR-1 contiene un dominio de muerte (ausente en el TNFR2) que está implicado en la inducción de apoptosis. La unión del homotrímero de TNF- $\alpha$  al TNFR-1 da como resultado la trimerización del TNFR-1 y se libera el silenciador del dominio de muerte (SODD). El dominio de muerte asociado al TNFR (TRADD) se une al dominio de muerte del TNFR-1 y recluta proteínas adaptadoras, proteína que interactúa con el receptor (RIP), factor 2 asociado al TNFR (TRAF-2), y el dominio de muerte asociado a Fas (FADD). El TNFR-1 señala la apoptosis, uniéndose el FADD a la pro-caspasa-8, cuya activación da lugar a la inducción de una cascada de proteasas que da como resultado a la apoptosis. El TNFR-1 señala la supervivencia por reclutamiento de TRAF-2 que inhibe la apoptosis mediante la proteína citoplasmática inhibidora de apoptosis (CIAP). Una de las rutas de señalizaciones principales desencadenadas por el reclutamiento de TRAF-2 y RIP por el complejo del receptor TNFR-1 es la ruta NF- $\kappa$ B que transduce una señal en el núcleo culminando en la activación transcripcional de varios genes diana de TNF (Schwamborn et al., 2003). El NF- $\kappa$ B es un factor de transcripción ubicuo inducido por varias citocinas (que incluyen IFN $\gamma$ , IL2, IL5 e IFN $\alpha$ 2). El NF- $\kappa$ B está implicado en la regulación de numerosos genes implicados en procesos que incluyen, la respuesta inflamatoria, apoptosis, cáncer, supervivencia neuronal, e inmunidad innata. La activación del NF- $\kappa$ B se controla principalmente a nivel post-transcripcional por degradación de la subunidad inhibidora I $\kappa$ B del complejo p55/p65/I $\kappa$ B presente en el citoplasma. Los estímulos activadores tales como el TNF- $\alpha$  activan un complejo cinasa compuesto por dos cinasas específicas de  $\kappa$ B (IKK $\alpha$  e IKK $\beta$ ) y una subunidad moduladora (NEMO o IKK $\gamma$ ). Esto da lugar a la fosforilación de la subunidad inhibidora, que se ubiquitina entonces y se degrada mediante el proteosoma. Esto desencadena la translocalización del NF- $\kappa$ B en el núcleo, donde inicia la transcripción uniéndose a secuencias reguladoras (secuencias de unión/reconocimiento de NF- $\kappa$ B) presentes en la región promotora de los genes diana de NF- $\kappa$ B.

**Receptores acoplados a G**

Las rutas de señalización transmembrana de proteína G consisten en tres proteínas: los receptores, las proteínas G y los efectores. Las proteínas G, que son intermediarias en las rutas de señalización transmembrana, son heterodímeros y consisten en subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ . Entre los miembros de una familia de proteínas G las subunidades  $\alpha$  son diferentes. Las funciones de proteínas G se regulan por la asociación cíclica de GTP con la subunidad  $\alpha$  seguido por la hidrólisis de GTP a GDP y disociación del GDP.

Los receptores acoplados a proteína G son una clase de receptores diversa que median la transducción de señales uniéndose a las proteínas G. La transducción de señal se inicia mediante la unión al ligando con el receptor de la membrana celular, que estimula la unión del receptor a la proteína G. La interacción de receptor con proteína G libera GDP, que se une específicamente a la proteína G y permite la unión de GTP, que activa la proteína G. La proteína G activada se disocia del receptor y activa la proteína efectora, que regula los niveles intracelulares de mensajeros secundarios específicos. Ejemplos de dichas proteínas efectoras incluyen la adenil ciclasa, fosfolipasa C, y otras.

**Factores de crecimiento y receptores de factores de crecimiento**

Los factores de crecimiento polipeptídicos son moduladores de la proliferación y diferenciación celular cuyas funciones biológicas están mediadas por la interacción del factor de crecimiento con los receptores de la superficie celular y las posteriores alteraciones de la expresión genética. Los factores de crecimiento se unen a receptores específicos y parece que inducen la tirosina fosforilación y la síntesis de ARNm c-fos. Además, al menos algunos factores de crecimiento, tales como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (Yeh et al., 1987) y factor 2 de crecimiento de unión a heparina o factor de crecimiento de fibroblastos (Bouche et al., 1987), se translocalizan en el núcleo.

La activación de los receptores de factores de crecimiento por la interacción con los factores de crecimiento específicos o con agentes tales como el acetato forbol místico (PMA) activa la proteína cinasa C, que es una familia de proteína cinasas activadas por calcio y fosfolípidos. Esta activación da como resultado la transcripción de una matriz de genes que codifican factores de transcripción de proto-oncogenes, incluyendo c-fos, c-myc, y c-jun, proteasas, inhibidores de proteasas, incluyendo la colagenasa Tipo I y el inhibidor del activador de plasminógeno, y moléculas de adhesión, que incluyen la molécula de adhesión intercelular I. La activación de proteína cinasa C antagoniza con la actividad del factor de crecimiento por la rápida fosforilación de receptores de factores de crecimiento, que de esta manera disminuye la actividad de la tirosina cinasa. Se cree que los factores de crecimiento y otros mitógenos que inducen la proliferación celular y el crecimiento celular tienen un papel en el crecimiento tumoral que a menudo albergan receptores de superficie celular identificables para los factores de crecimiento y otras señales extracelulares.

La interacción del factor de crecimiento de nervios (NGF) con su receptor es típica de la matriz de respuestas que induce dicha señal extracelular. El NGF es una hormona polipeptídica de crecimiento que es necesaria para la diferenciación y crecimiento de la neurona sensitiva derivada de la cresta neural. El NGF se une a su receptor de la superficie celular específico y se transporta retrógradamente al cuerpo celular (Changelian et al., 1989). Esto inicia una cascada de eventos intracelulares, que culminan en un fenotipo diferenciado. Las células PC12, que son una línea celular de feocromocitoma de rata, se utilizan como modelo para el estudio de la diferenciación mediada por NGF. Cuando las células se PC12 se tratan con NGF, cambian de células Tipo cromafines adrenales replicantes a células Tipo neuronas simpáticas excitables eléctricamente no replicantes.

Junto con los cambios fenotípicos, existe la inducción y expresión de genes específicos. La unión del NGF a las células PC12 induce la expresión inmediata y rápida de ciertos genes, incluyendo los genes de c-fos, NGF1-A, y NGF1-B, a los que se hace referencia como genes tempranos. Se cree que dichos genes tempranos codifican reguladores de la transcripción. El producto del gen NGF1-A contiene dominios en "dedos de zinc" repetidos en tándem que son característicos de las proteínas de unión a ADN, y el NGF1-B proteico es homólogo a los miembros de la familia de receptores de glucocorticoides y, por lo tanto, pueden funcionar como modulador de la transcripción dependiente de ligando. El producto del gen c-fos, FOS parece funcionar como una moléculas reguladora de la transcripción.

**El gen c-fos y genes relacionados**

Como se ha expuesto anteriormente, la inducción de la expresión del gen c-fos es un evento que es común a varias rutas de respuesta que se inician por la actividad de varias proteínas de la superficie celular.

El producto del gen c-fos, FOS, se asocia con el activador de la transcripción JUN, que es el producto del gen c-jun, para formar un complejo que forma un complejo de activación de la transcripción, AP-1. La transcripción de ambos c-fos y c-jun se induce rápidamente y transitoriamente después de la estimulación. Los ARNm inducidos se acumulan durante 1-2 horas en el citoplasma en el que las proteínas FOS y JUN, que tienen una vida corta, se traducen y después se translocalizan en el núcleo para formar un complejo proteico heterodimérico que se une al

elemento regulador de ADN, el sitio de unión de AP-1.

Los genes c-fos y c-jun son miembros de familias genéticas que codifican proteínas que participan en la formación de complejos heterodiméricos que interactúan con los sitios de unión AP-1. El factor de transcripción AP-1 está compuesto de varios complejos proteicos cuyas concentraciones cambian con la estimulación celular. Estos complejos interactúan específicamente con un motivo de secuencias de nucleótidos con un núcleo de siete bases, del que se sabe que es un constituyente relativamente común de elementos reguladores de la transcripción tanto positivos como negativos y que son necesarios tanto para los niveles de la expresión genética basales como inducidos.

Los productos génicos, FOS y JUN cooperan en la regulación de genes diana que soportan muchas respuestas celulares y adaptativas al medio ambiente. Están implicados en varios procesos neurofisiológicos.

Por lo tanto, la inducción de c-fos implica rutas de mensajeros secundarios distintos que actúan mediante elementos reguladores separados y que modifican diferencialmente, el producto génico resultante, FOS, que a su vez interactúa con diferentes rutas con proteína JUN modificada diferencialmente. Por lo tanto, una multitud de eventos extracelulares induce la expresión de un pequeño número de proteínas inducibles que forman una matriz de complejos proteicos que pueden unirse diferencialmente a elementos reguladores de ADN que contienen sitios de unión AP-1. Por lo tanto, muchas proteínas de la superficie celular pueden actuar mediante rutas de transducción solapadas y transducen señales extracelulares que en último término inducen varias respuestas.

Hay muchos ensayos que se pueden basar en la actividad in vivo en una línea celular viva. Un ejemplo es una línea celular que tiene un Elemento de Respuesta Estimulante de Interferón (ISRE) conectado a un gen de luciferasa, u otro gen indicador, de manera que cuando la línea celular se somete a la presencia del interferón como señal extracelular, la actividad de transducción de la señal de los receptores de la superficie celular del interferón endógeno produce una señal que activa el ISRE, que produce entonces la transcripción del gen de luciferasa. Por lo tanto, la actividad de luciferasa de creación de luz se puede medir y se relaciona con la cantidad de interferón que está presente en la muestra, y que es proporcional a la cantidad de interferón a lo largo de un intervalo particular (Lallemant et al., 1996).

Leonart et al. (1990) describieron un ensayo de gen indicador para el interferón Tipo I basado en células Vero de mono transfectadas con el promotor Mx de ratón inducible por el interferón Tipo I unido al gen de la hormona de crecimiento humana (hGH) como gen indicador. Este ensayo de interferón Tipo I se desarrolló adicionalmente transfectando las células Vero de mono con un plásmido que alberga el gen indicador de luciferasa bajo el control del promotor Mx1 de ratón inducible por interferón Tipo I (Canosi et al., 1996).

Un Tipo adicional de ensayo de gen indicador de interferón se desarrolló por Hammerling et al. (1998) que utilizó una línea celular de glioblastoma humano transfectada con una construcción de gen indicador del promotor proteico ácido fibrilar (GFAP) y un gen indicador de  $\beta$ -galactosidasa (lacZ) de E. coli.. En este ensayo en particular, lo que se mide es la reducción/inhibición de la expresión de  $\beta$ -galactosidasa por el interferón humano Tipo I o Tipo II de una manera selectiva y dependiente de la dosis.

La cita de cualquier documento en el presente documento no se considera como una admisión de que dicho documento es una técnica anterior pertinente, o material considerado como patentable de cualquiera de las reivindicaciones de la presente solicitud. Cualquier declaración como del contenido o de una fecha de cualquier documento se basa en la información disponible para el solicitante en el momento de la presentación y no constituye una admisión de la corrección de dicha declaración.

### Sumario de la invención

Es un objetivo de la presente invención desarrollar un gen indicador contenido en una línea celular con una especificidad y/o sensibilidad por una señal extracelular particular de interés (es decir, un ligando) de manera que se pueda utilizar en un ensayo de gen indicador para determinar con precisión la presencia y/o el nivel de la señal extracelular de interés en presencia de otras señales extracelulares que son capaces de activar la misma ruta de transducción de la señal iniciada por una primera molécula o complejo de la superficie celular como la señal extracelular de interés o que son capaces de activar otra ruta de transducción de la señal capaz de modular la transcripción del gen indicador.

Por lo tanto, la presente divulgación proporciona una línea celular transformada con una construcción de gen indicador que incluye una secuencia de nucleótidos que codifica un producto génico indicador unido operativamente a un elemento de control de la transcripción que se activa como parte de la ruta de transducción de la señal iniciada por una primera molécula o complejo de la superficie celular en respuesta a una primera señal extracelular (la señal extracelular de interés). La ruta de transducción de la señal incluye un factor de transcripción que se une al elemento de control de la transcripción de manera que activa el elemento de control de la transcripción y de esta manera regula la transcripción del gen indicador. La sensibilidad y/o especificidad de la respuesta de esta línea celular por la señal extracelular de interés está mejorada debido a:

a) el elemento de control de la transcripción es una modificación de un elemento de control de la transcripción de origen natural o de un elemento de control de la transcripción sintético que contiene una o más secuencias de reconocimiento específicas del factor de transcripción, que se activa como parte de la ruta de transducción de la señal iniciada por la primera señal extracelular, y por tanto de la sensibilidad y/o especificidad del elemento de control de la transcripción aumentando el número de secuencias de reconocimiento específicas de los factores de transcripción de interés y/o excluyendo secuencias de reconocimiento para factores que son susceptibles de reducir la sensibilidad o especificidad por la señal extracelular de interés; y/o

b) las células de la línea celular carecen de una segunda molécula de superficie que responda a, o sea parte de un complejo que responda a, una segunda señal extracelular, cuya segunda señal extracelular, si la segunda molécula de superficie celular estuviera presente, produciría el inicio de una segunda ruta de transducción que modula la transcripción de dicho gen indicador que disminuya la sensibilidad o especificidad de la respuesta de la primera señal extracelular.

La presente divulgación también proporciona un kit de ensayo basado en células para la determinación con una sensibilidad y/o especificidad mejorada, la presencia y/o nivel de una señal extracelular de interés que activa la actividad de transducción de señal de una molécula o complejo de la superficie celular.

Se proporciona adicionalmente por la presente divulgación un ensayo de gen indicador para determinar la presencia y/o nivel de una señal extracelular de interés (es decir, un ligando) en una muestra.

### Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es una ilustración esquemática de una construcción de gen indicador inicial con los -500 a +1 nucleótidos de la región promotora del gen del factor de respuesta al interferón (IRF-1) clonada corriente arriba del gen indicador de luciferasa de luciérnaga para regular la transcripción de luciferasa de luciérnaga.

La Figura 2 es un gráfico que muestra las unidades de luciferasa relativas (RLU) de la construcción de gen indicador de la Figura 1 en respuesta a IFN $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , e IFN $\gamma$  + TNF- $\alpha$ .

La Figura 3 es un gráfico que muestra las x veces de inducción de la actividad de luciferasa de luciérnaga convertida a partir de los datos que se muestran en la Figura 2.

La Figura 4 es una ilustración esquemática de una construcción de gen indicador en la que una repetición de 5 tándems del NF- $\kappa$ B canónico (SEQ ID NO: 2) se posiciona corriente arriba del promotor mínimo SV40 para regular la transcripción de la luciferasa de luciérnaga.

La Figura 5 es un gráfico que muestra las unidades de luciferasa relativas en un ensayo de gen indicador utilizando la construcción de gen indicador de la Figura 4 en presencia de distintas cantidades de TNF- $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-2, IL-5 e IFN $\alpha$ 2.

### Descripción detallada de la invención

Los presentes inventores han desarrollado y establecido un ensayo de gen indicador que utiliza una línea celular transfectada con una construcción de gen indicador de manera que el ensamblaje es capaz de detectar y responder a bajos niveles de una señal extracelular (es decir, un ligando) de una manera altamente específica, permitiendo así la cuantificación de la señal extracelular. En una realización preferida, esto se obtuvo utilizando un promotor químico sintético, que contenía un número óptimo de elementos de respuesta para los factores de transcripción inducidos por la señal extracelular de interés y que carece de elementos de respuesta para factores de transcripción activados por señales extracelulares no relacionadas (es decir, ligandos), para dirigir un promotor mínimo y regular la expresión de un gen indicador. Se obtiene un nivel adicional transfectando células que albergan un receptor específico para la señal extracelular de interés pero que carecen de receptores para otras señales extracelulares capaces de activar la misma ruta de transducción de la señal que la señal extracelular de interés o que son capaces de activar otra ruta de transducción de señal, capaces de modular la transcripción del gen indicador mediante la interacción con elementos de respuesta específicos de la señal extracelular regulados por el promotor sintético. Dicho ensamblaje mejora también preferentemente el nivel de sensibilidad en la detección de la señal extracelular de interés.

El término "especificidad" como se utiliza en el presente documento es la capacidad de un ensayo de gen indicador para reconocer una señal extracelular particular de interés sin interferencia de otras señales extracelulares. El término "sensibilidad" como se utiliza en el presente documento es la capacidad de un ensayo de gen indicador para detectar cantidades bajas de una señal extracelular de interés que de otra manera sería indetectable en un ensayo que sea menos "sensible" a la señal extracelular.

Más preferentemente, la línea celular de acuerdo con la presente divulgación es en la que la línea celular está a) transformada con una construcción de gen indicador en la que se mejora la sensibilidad y/o especificidad de un elemento de control transcripcional unido operativamente al gen indicador por la modificación de un elemento de control transcripcional de origen natural o un promotor sintético que contiene un número óptimo de elementos de control específico para los factores de transcripción inducidos por la señal extracelular de interés, y b) carente de una segunda molécula o complejo de superficie celular funcional que responda a otras señales extracelulares que interferirían de otra manera con una primera señal de interés produciendo el inicio de una ruta de transducción de la

señal que module la transcripción del gen indicador con el fin de mejorar la sensibilidad y/o especificidad de la línea celular a la señal extracelular de interés. Se contempla que la línea celular pueda carecer de más de una molécula o complejo de superficie celular funcional dependiendo de la cantidad de otras moléculas o complejos de la superficie celular sea necesario que estén ausentes/inactivas en la línea celular para evitar la interferencia de otras señales extracelulares en un ensayo de gen indicador con la señal extracelular de interés. La falta de una o más moléculas o complejos de superficie celular funcionales (es decir, receptores y complejos de receptores) en la línea celular puede ser de origen natural o se puede obtener por técnicas tales como “desactivación” inactivando el gen que codifica la molécula de superficie celular o silenciando (“supresión”) el gen que codifica la molécula de la superficie celular utilizando un ARN de interferencia (ARNi).

La molécula de superficie celular de cuya actividad de transducción de la señal, en respuesta a una señal extracelular, regula la expresión de un producto génico indicador puede ser cualquier proteína de la superficie celular que sea conocida por los expertos en la técnica o que pueda ser identificada por los expertos en la técnica. Las proteínas de superficie celular a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, receptores de la superficie celular y canales iónicos. Ejemplos no limitantes de receptores de superficie celular incluyen receptores de citocinas (por ejemplo, receptores para el interferón Tipo I, interferón Tipo II, factor de necrosis tumoral (TNF), interleucinas, hormona de crecimiento, eritropoyetina (EPO), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos macrófagos (GM-CSF), factor inhibidor de leucemia (LIF), factor neurotrófico ciliar (CNTF), etc.), receptores de factores de crecimiento, receptores de hormonas, receptores de células T, receptores de antígenos, receptores de complemento, receptores de muerte, y neuroreceptores. El texto de referencia, J. M. Cruse y Robert E. Lewis, Atlas of Immunology, CRC Press, Washington, DC, 1999, que desvela muchos receptores implicados en la respuesta inmunitaria y las interacciones del sistema inmunitario se toma como referencia. Los receptores de superficie celular también incluyen, pero no se limitan a, receptores del TNF (por ejemplo, TNF- $\alpha$ ), receptores muscarínicos (por ejemplo, el M2 humano (acceso de GenBank nº M16404); M3 de rata (acceso de GenBank nº M16407), M4 humano (acceso de GenBank nº M16405); M5 humano (Bonner et al., 1988); y similares); receptores de acetilcolina nicotínicos neuronales (por ejemplo, los subtipos  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$  y  $\beta 2$ ); la subunidad  $\alpha 2$  de rata (Wada et al., 1988); la subunidad  $\alpha 3$  de rata (Boulter et al., 1986); la subunidad  $\alpha 4$  de rata (Goldman et al., 1987); la subunidad  $\alpha 5$  de rata (Boulter et al., 1986); la subunidad  $\beta 2$  de rata (Deneris et al., 1988); la subunidad  $\beta 3$  de rata (Deneris et al., 1988); la subunidad  $\beta 4$  de rata (Duvoisin et al., 1989); combinaciones de las subunidades  $\alpha$ , subunidades  $\beta$  y subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de rata; receptores GABA (por ejemplo, las subunidades  $\alpha 1$  y  $\beta 1$  bovinas (Schofield et al., 1987); las subunidades  $\alpha 2$  y  $\alpha 3$  bovinas (Levitan et al., 1988); la subunidad  $\gamma$  (Pritchett et al., 1989); las subunidades  $\beta 2$  y  $\beta 3$  (Ymer et al., 1989); la subunidad 5 (Shivers, B.D., 1989); y similares); receptores de glutamato (por ejemplo, el receptor aislado del cerebro de rata (Hollmann et al., 1989); y similares); receptores adrenérgicos (por ejemplo, el  $\beta 1$  humano (Frielle et al., 1987);  $\alpha 2$  humano (Kobilka et al., 1987);  $\beta 2$  de hámster (Dixon et al., 1986); y similares); receptores de dopamina (por ejemplo, D2 humano (Stormann et al., 1990); de rata (Bunzow et al., 1988); y similares); receptores NGF (por ejemplo, receptores NGF humano (Johnson et al., 1986); y similares); receptores de serotonina (por ejemplo el 5HT1a humano (Kobilka et al., 1987); 5HT2 de rata (Julius et al., 1990); 5HT1c de rata (Julius et al., 1988); y similares).

También se incluyen como receptores de superficie celular nominalmente los receptores Tipo Toll intracelulares y/o extracelulares y receptores intracelulares tales como RIG-1 y MDA5, debido a que dichos receptores detectan señales extracelulares, tales como partículas víricas o bacterianas o componentes que en el caso de los receptores Tipo Toll intracelulares, interactúan con estos receptores Tipo Toll tras la endocitosis desde la superficie celular. Dichos receptores de superficie celular Tipo Toll (TLR) o de membrana endosómicos (Uematsu y Akira, 2007), o los receptores proteicos RIG-I, MDA5 y LGP citosólicos Tipo gen 1 inducible por el ácido retinoico (GIG-I) (Yoneyama y Fujita, 2007) son ejemplos no limitantes de receptores de reconocimiento de un patrón.

Los canales de iones incluyen, pero no se limitan a, canales de ion calcio (por ejemplo, la subunidad  $\alpha 2$  neuronal humana (véase el documento WO89/09834); subunidad  $\alpha 1$  de músculo esquelético de conejo (Tanabe et al. 1987); subunidad  $\alpha 2$  de músculo esquelético de conejo (Ellis et al., 1988); subunidad  $\beta$  de músculo esquelético de conejo (Ruth et al., 1989); subunidad  $\gamma$  de músculo esquelético de conejo (Jay et al., 1990); y similares); canales de potasio (por ejemplo, de cerebro de rata (BK2) (McKinnon, D., 1989); cerebro de ratón (BK1) (Tempel et al., 1988); y similares); canales de ion de sodio (por ejemplo, cerebro de rata I y II (Noda et al., 1986); cerebro de rata III (Kayano et al., 1988); y otros).

Los expertos en la técnica apreciarán que la proteína de superficie celular expuesta anteriormente es preferentemente endógena a la línea celular de la presente divulgación. Sin embargo, también se apreciará que la proteína de superficie celular de la superficie de la célula, o la proteína de superficie celular se puede expresar de un ADN clonado pero será una proteína de superficie celular que es heteróloga a la célula huésped.

Para la transducción de la señal, la señal intracelular que se transduce se inicia por la interacción específica de una señal extracelular, es decir una molécula o un cambio en el medio ambiente extracelular (tal como la luz, la radiación UV, o la radiación  $\gamma$ ), con una molécula o complejo de superficie celular, receptor o canal iónico presentes en la superficie celular. Esta interacción pone en movimiento una cascada de eventos intracelulares, cuya última consecuencia es un cambio rápido y detectable en la expresión de un producto génico, que en la célula de la presente divulgación es un producto génico indicador. La señal extracelular o molécula efectora es cualquier

compuesto o sustancia que de alguna manera altera específicamente la actividad de una molécula de superficie celular o un complejo de moléculas de superficie celular (es decir, complejos de receptores). Ejemplos de dichas señales incluyen, pero no se limitan a, moléculas tales como citocinas (es decir, interferones), factores de crecimiento, hormonas, endorfinas, neurotransmisores, acetilcolina, y sustancias mitogénicas, tales como el acetato

5 místico forbol (PMA), que se unen a los receptores de superficie celular y canales iónicos y modulan la actividad de dichos receptores y canales. Por ejemplo, los antagonistas son señales extracelulares que bloquean o disminuyen la actividad de una proteína de superficie celular y los agonistas son ejemplos de señales extracelulares que potencian, inducen o aumentan de otra manera la actividad de las proteínas de superficie celular.

10 La construcción de gen indicador albergada en la línea celular de la presente divulgación es una molécula de ADN que incluye una secuencia de nucleótidos que codifica un producto génico indicador unida operativamente a elementos/secuencias de control de la transcripción. La transcripción del gen indicador se controla por estas secuencias. La actividad de al menos uno o más de estas secuencias de control está regulada directa o indirectamente por la molécula o complejo de superficie celular. Las secuencias de control de la transcripción

15 incluyen pero no se limitan a promotores y otras regiones reguladoras, tales como secuencias amplificadoras y sitios de unión represores y activadores, por ejemplo, para la unión con un factor de transcripción tal como NF- $\kappa$ B, que modula la actividad del promotor, o secuencias de control que modulan la actividad o eficacia de la ARN polimerasa que reconoce el promotor, o secuencias de control que son reconocidas por las moléculas efectoras, incluyendo las que son inducidas específicamente por la interacción de una señal extracelular con una proteína de superficie

20 celular. Por ejemplo, la modulación de la actividad del promotor se puede efectuar alterando la unión de la ARN polimerasa a la región del promotor, o, de manera alternativa, interfiriendo el inicio de la transcripción o la elongación del ARNm. Se hace referencia a dichas secuencias colectivamente en el presente documento como elementos de control de la transcripción. Además, la construcción puede incluir secuencias de nucleótidos que alteren la traducción del ARNm resultante, alterando de esta manera la cantidad del producto génico indicador expresado.

25 Un promotor que se regula o modula por la actividad de una molécula o complejo de superficie celular es un promotor cuya actividad cambia cuando una célula se expone a una señal extracelular particular mediante la presencia de moléculas o complejos de superficie celular cuyas actividades están afectadas por la señal extracelular. Por ejemplo, el promotor c-fos se activa específicamente con la interacción específica de ciertas

30 señales extracelulares, tal como las hormonas de crecimiento, con una molécula de superficie celular, tal como un receptor de la hormona de crecimiento. En particular, la regulación de dichos promotores por la molécula o complejo de superficie celular, aunque indirecta, se produce en unos minutos de la interacción de la molécula o complejo de superficie celular con la señal extracelular. Como se utiliza en el presente documento, unión operativa se refiere a la unión de un elemento de control de la transcripción, es decir, el promotor y/o el sitio de unión al factor de

35 transcripción, con un nucleótido que codifica una secuencia de manera que el elemento de control de la transcripción se posiciona apropiadamente para su actividad de unión a la ARN polimerasa y el inicio de la transcripción de la secuencia de nucleótidos codificante. Por lo tanto, una secuencia de nucleótidos codificante en unión operativa con un promotor, está corriente abajo con respecto a la dirección de la transcripción a partir del promotor, está en el marco de lectura correcto con respecto al sitio de inicio de transcripción y está insertado de manera que dicha

40 elongación de la transcripción progresa a lo largo de la secuencia de nucleótidos codificante.

Los elementos de control de la transcripción adecuados se pueden obtener o derivar de las regiones reguladoras de la transcripción de genes cuya expresión se induce rápidamente, generalmente en minutos, del contacto entre la proteína de superficie celular y la proteína efectora que modula la actividad de la proteína de superficie celular.

45 Ejemplos de dichos genes incluyen, pero no se limitan a, los genes inmediatos tempranos (Sheng et al., 1990), tales como c-fos. Los genes inmediatos tempranos son genes que se inducen rápidamente con la unión de un ligando a una proteína de superficie celular. Los elementos de control de la transcripción que se prefieren para su uso en las construcciones genéticas indicadoras incluyen elementos del control de la transcripción de genes inmediatos tempranos, elementos derivados de otros genes que presentan alguna o todas las características de genes

50 inmediatos tempranos, o elementos sintéticos que se construyen de manera que los genes unidos operativamente entre ellos presenten dichas características. Las características de los genes preferidos a partir de los cuales se derivan los elementos de control de la transcripción incluyen, pero no se limitan a, la expresión baja o indetectable en células quiescentes, inducción rápida a nivel transcripcional en minutos de la estimulación extracelular, inducción que es transitoria e independiente de la síntesis de nuevas proteínas, la posterior interrupción de la transcripción

55 necesita la síntesis de nuevas proteínas, y los ARNm de estos genes tienen una semivida corta. No es necesario que todas estas proteínas estén presentes.

Los promotores y elementos de control de la transcripción adecuados incluyen, pero no se limitan a, la secuencia de IFN gamma activada (GAS) del gen del factor regulador de interferón 1 (IRF-1), SV40 u otros promotores mínimos

60 en combinación con elementos de control de la transcripción tal como secuencias de unión al factor activador o de transcripción (tales como para NF- $\kappa$ B), el promotor del gen del péptido vasoactivo intestinal (que responde a cAMP; Fink et al., 1988); el promotor del gen de la somatostatina (que responde a cAMP; Montminy et al., 1986); el promotor proencefalina (que responde a cAMP, agonistas nicotínicos, y ésteres de forbol; Comb et al. 1986); el promotor del gen de fosfoenolpiruvato carboxi-cinasa (que responde a cAMP; Short et al., 1986); el promotor del gen de NGFI-A (que responde a NGF, cAMP, y suero; Changelian et al., 1989); los elementos de control de la

65 transcripción obtenidos o derivados del gen c-fos; y otros que pueden ser conocidos o preparados por los expertos

en la técnica.

El proto-oncogén c-fos es el homólogo celular del gen transformante del virus del osteosarcoma FBJ. Este codifica una proteína nuclear lo más probable es que esté implicada en el crecimiento y diferenciación celular. La transcripción de c-fos se activa transitoria y rápidamente por factores de crecimiento y por inductores de otras proteínas de superficie celular, incluyendo hormonas, agentes específicos de la diferenciación, estrés, mitógenos y otros inductores conocidos de proteínas de superficie celular. La activación es independiente de la síntesis de proteínas. Los elementos reguladores c-fos incluyen un TATA box que es necesaria para el inicio de la transcripción, dos elementos corriente arriba para la transcripción basal, y un amplificador, que incluye un elemento con simetría en díada y que es necesario para la inducción por TPA, suero, EGF, y PMA. El elemento amplificador de la transcripción de 20 pb localizado entre 317 y 298 pb corriente arriba del sitio de la protección c-fos de ARNm, es esencial para la inducción sérica en las células NIH 3T3 privadas de suero. Uno de los dos elementos corriente arriba se localiza de 63 a 57 y se parece a la secuencia de consenso para la regulación por cAMP.

Preferentemente, el elemento de control de la transcripción es un promotor quimérico sintético que contiene un promotor mínimo, que es más preferentemente el promotor mínimo SV40, y un número óptimo de elementos de respuesta específicos de los factores de transcripción inducidos por la señal extracelular de interés, pero que carece de elementos para los factores activados para señales extracelulares no relacionadas.

En una realización preferida de la presente divulgación, la línea celular contiene una construcción de gen indicador que tiene tanto especificidad como sensibilidad por el IFN $\gamma$  como la señal extracelular. Los bioensayos actuales para el IFN $\gamma$  se basan en su mayor parte en la capacidad del IFN $\gamma$  para inhibir la replicación vírica (Ank et al., 2006) o inhibir la proliferación celular (Sato et al., 2006). Dichos métodos carecen de especificidad ya que los INF Tipo I (IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\epsilon$ , IFN- $\kappa$ , e IFN- $\omega$ ) también inhiben la replicación vírica y la proliferación celular. La actividad del IFN $\gamma$  también se puede evaluar por su capacidad para inducir NO en células de exudado peritoneal recién aislado (Malu et al, 2003), kinurenina en células WISH (Boyanova et al, 2002), o antígenos del MHC clase II en células susceptibles (King, D.P., Jones, P.P., J. 1983). Dichos bioensayos también carecen de especificidad y se basan en sistemas de cultivo celular que son variables inherentemente y dan resultados que varían de un ensayo a otro (Meager, 2006). Aunque se ha desarrollado un ensayo de gen indicador para IFN $\gamma$  basado en la inducción de la actividad de cloranfenicol acetiltransferasa (CAT) el ensayo carece de especificidad ya que también es sensible a los IFN Tipo I (Lewis, 1995). Por lo tanto, es altamente deseable un ensayo de gen indicador que sea específico y sensible a bajos niveles de IFN $\gamma$  (interferón Tipo II) en presencia de interferones de Tipo I (IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$ ) en la técnica. Sin embargo, debido a la degeneración entre las secuencias de GAS e ISRE y debido a la inter-relación entre el heterodímero STAT1-STAT2 (de la ruta de transducción de la señal en el receptor de interferón Tipo I IFNAR1/IFNAR2) y el homodímero STAT1-STAT2 (de la ruta de transducción de la señal iniciada en el receptor de interferón Tipo II GAR1/GAR2), la presencia de interferones de Tipo I interfiere fuertemente los ensayos de gen indicador para determinar el nivel de IFN $\gamma$  en una muestra. Por lo tanto, una línea celular que contuviera una construcción de gen indicador con una especificidad y sensibilidad mejorada por el IFN $\gamma$  permitiría rápidamente los niveles de IFN $\gamma$  en una muestra. Esta capacidad de detectar la presencia y/o determinar el nivel de IFN $\gamma$ , incluso en presencia de un interferón de Tipo I, tendría aplicaciones clínicas inmediatas. Por ejemplo, la presencia de IFN $\gamma$  en el líquido cefalorraquídeo es indicativa de la progresión de la enfermedad en la recaída de esclerosis múltiple en remisión u otras enfermedades neurodegenerativas. Se piensa también que la reducción de la producción de IFN $\gamma$  está implicada en la fisiopatología de enfermedades fibróticas tales como la fibrosis pulmonar idiopática, esclerosis sistémica, o escleroderma. La cuantificación de la producción de IFN $\gamma$  humano se puede utilizar también como un marcador in vitro de la maduración/proliferación de células T, la respuesta de CTL CD8+, y la activación de células NK. La cuantificación de IFN $\gamma$  también proporciona la base de un ensayo para la infección por TB midiendo la proliferación de células T in vitro en respuesta a antígenos de TB. La presencia de IFN $\gamma$  en el derrame pleural es diagnóstico de tuberculosis extrapulmonar. Por lo tanto, con dicha línea celular en un ensayo de gen indicador para IFN $\gamma$ , se cubre la necesidad de un ensayo diagnóstico no invasivo.

El elemento de control de la transcripción, particularmente como se refiere a una realización preferida de la presente divulgación en la que el interferón Tipo II (IFN $\gamma$ ) es la señal extracelular, es la secuencia gamma activada (GAS). Con respecto a GAS, a la que se une el homodímero STAT1 en los genes que responden al interferón Tipo II, se identificó la secuencia de consenso, nnn~~s~~antccgGGAAntgnsn (SEQ ID NO: 3; con la secuencia central en mayúsculas; y la alta conservación subrayada), en muchas secuencias de unión seleccionadas.

En la realización de la presente divulgación en la que el interferón Tipo II es la señal extracelular de interés (la primera señal extracelular) y un interferón de Tipo I (IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$ ) es una señal extracelular de interferencia (la segunda señal extracelular), un elemento de control de la transcripción preferido en la construcción de gen indicador es un promotor quimérico que responde al interferón Tipo II en el que la GAS controla un promotor mínimo SV40 unido operativamente a una secuencia de nucleótidos que codifica un producto génico indicador. Además, en esta realización de una línea celular para su uso en un ensayo de gen indicador para IFN $\gamma$ , la línea celular se ha seleccionado de manera que carezca de un receptor de IFN de Tipo I, o células que se han modificado genéticamente para desactivar el receptor de interferón Tipo I (IFNAR1/IFNAR2), al que se hace referencia en general en la sección "Sumario de la invención" anterior como segunda molécula de superficie celular. En ausencia de un receptor de interferón Tipo I funcional, no hay inter-relación STAT1-STAT2 para que interfiera la activación de

la transcripción de GAS en respuesta al homodímero STAT1. Por lo tanto, la especificidad y sensibilidad de la respuesta a una señal extracelular con IFN $\gamma$  está considerablemente mejorada. Ahora se pueden detectar bajos niveles de IFN $\gamma$  utilizando la línea celular con IFNAR1/IFNAR2 “desactivado” que se ha descrito anteriormente.

5 El término “desactivado” como se utiliza en el presente documento se refiere a una línea celular en la que se han inactivado genes específicos, tal como por un método de direccionamiento génico. Este es el contrario a “activado” que como se utiliza en el presente documento se refiere a una línea celular de acuerdo con la presente divulgación en la que un gen de un receptor o complejo o una parte de los mismos (es decir, al menos la parte extracelular y los  
10 elementos necesarios para la activación de la ruta de transducción de la señal) de la superficie celular de una primera especie animal se ha introducido (“activado”) en la línea celular de una segunda especie animal. Dicho receptor o complejo de la superficie celular “activado” se puede utilizar en la línea celular en un ensayo de gen indicador cuando hay una especificidad estricta de especie entre el receptor o complejo de superficie celular y su ligando, es decir, el receptor o complejo de superficie celular que es endógeno de la línea celular y que es ortólogo con el receptor de superficie celular “activado” no inicia (o de manera insignificante) una señal junto con su ruta de transducción de señal en respuesta a un ligando del receptor de superficie celular “activado” de otra especie animal.  
15

El producto del gen indicador en la línea celular de la presente divulgación, cuyo nivel es una medida de la presencia y/o el nivel de una señal extracelular que activa al actividad de transducción de la señal de una molécula de la superficie celular, puede ser un ARN o una proteína, siempre que sea detectable fácilmente. Por ejemplo, la  
20 luciferasa de luciérnaga, luciferasa Renilla, la proteína verde fluorescente aumentada (EGFP) de luciferasa secretada por Metridios y aequorina de medusas son las realizaciones más preferidas de productos génicos indicadores que se utilizan de acuerdo con la presente divulgación. En el caso de la enzima luciferasa de luciérnaga (deWet et al., 1987) y aequorina de medusa (Rider et al., 2003), se detecta el resultado de su actividad enzimática, la luz, y se mide utilizando un luminómetro, mientras que en el caso de EGFP, se puede utilizar un clasificador  
25 celular o analizador de fluorescencia activada (FACS) a una longitud de onda apropiada para detectar y cuantificar la cantidad de EGFP expresada en una célula. La curva de distribución de la cantidad de luciferasa, aequorina o EGFP que se expresa en una muestra de células se determinará por la cantidad de ligando (en un intervalo determinado) a la que se expone la células. Ejemplos no limitantes de otros productos génicos indicadores adecuados incluyen dsRED, cloranfenicol acetiltransferasa (CAT) (Alton et al., 1979), otros sistemas de detección enzimáticos, tales como  $\beta$ -galactosidasa, luciferasa bacteriana (Engebrecht et al., 1984 y Baldwin et al. 1984), fosfatasa alcalina (Toh et al. 1989 y Hall et al. 1983), y  $\beta$ -lactamasa bacteriana o humanizada (Zlokarnik et al., 1998).  
30

El desarrollo de un ensayo de gen indicador específico para una citocina pleiotrópica se hace difícil cuando la transducción de la señal está mediada por un factor de transcripción ubicuo inducido por varias citocinas no  
35 relacionadas y/o cuando los genes diana activados por la citocina están sometidos a un patrón complejo de regulación. Estas dificultades se pueden obviar por el uso de una construcción de gen indicador de promotor quimérico sintético que carezca de los sitios de reconocimiento para factores de transcripción activados por las citocinas no relacionadas para transfectar una línea celular que contenga un receptor específico de ligando pero que carezca de receptores para otros ligandos que compartan una ruta de transducción de la señal común con el ligando de interés. Esta estrategia se ilustra en referencia a la citocina pleiotrópica TNF $\alpha$  que utiliza la ruta NF- $\kappa$ B para activar los genes diana. En una realización preferida de la presente invención la línea celular que contiene la construcción de gen indicador tiene sensibilidad y especificidad para TNF- $\alpha$ .  
40

El TNF- $\alpha$  es una citocina pro-inflamatoria multifuncional que tiene un papel clave en la regulación de la apoptosis y la supervivencia celular y está implicado en procesos biológicos importantes como la inflamación, transformación neoplásica y respuesta inmunitaria. Por lo tanto, puede detectarse TNF- $\alpha$  en el plasma de pacientes con enfermedad de Crohn (Balog et al., 2004), en el plasma y líquido sinovial de pacientes con artritis reumatoide (Marotte et al., 2005), y en el fluido de heridas de las heridas crónicas no cicatrizadas (Cowin et al., 2006). Es por lo tanto importante ser capaces de evaluar la relación entre la presencia de TNF- $\alpha$  en una muestra clínica particular y la  
50 progresión de la enfermedad, o determinar la capacidad de las terapias anti-TNF- $\alpha$  incluyendo los anticuerpos anti-TNF- $\alpha$  (Remicade, Adlimumab) o un receptor de TNF- $\alpha$  soluble (Enbrel) para bloquear la actividad de TNF- $\alpha$ . Los bioensayos convencionales para el TNF- $\alpha$  se basan en la capacidad del TNF- $\alpha$  para destruir líneas celulares susceptibles (células L929 de ratón, células WEHI 164, o células HeLa humanas habitualmente en presencia de un inhibidor de la transcripción tal como actinomicina D o un inhibidor de la traducción tal como cicloheximida. De manera alternativa, también se puede utilizar la capacidad del TNF- $\alpha$  para regular positivamente las moléculas de adhesión celular tal como la ICAM-1 (moléculas de adhesión celular -1) como base para un bioensayo del TNF- $\alpha$ . Una desventaja obvia de dichos métodos es su falta de especificidad. TNF-P, TRAIL, y TWEAK (ligando Apo-3) interfieren con el ensayo de citotoxicidad de TNF- $\alpha$  y TNF-P, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , e IFN $\gamma$  inducen la expresión de ICAM-1 (Meager, 2006). Además, dichos bioensayos se basan en sistemas de cultivo celular que son inherentemente variables y dan resultados que varían de un ensayo a otro (Meager, 2006). Aunque se ha desarrollado un ensayo de gen indicador para TNF- $\alpha$ , que se basa en la activación de una construcción de gen indicador de luciferasa regulada por NF- $\kappa$ B, el ensayo carece de especificidad ya que también es sensible a otros agentes que activan la NF- $\kappa$ B (McFarlane et al., 2002).  
55  
60

65 La unión del homotrímero TNF- $\alpha$  al TNFR-1 da como resultado la trimerización del TNFR-1, el reclutamiento de TRAF-2 y RIP en el complejo receptor TNFR-1, y la activación de la ruta del NF- $\kappa$ B culminando en la activación de la

transcripción de varios genes diana del TNF (Schwamborn et al., 2003). El NF- $\kappa$ B es un factor de transcripción ubicuo inducido por varias citocinas (incluyendo IFN $\gamma$ , IL2, IL5, e IFN $\alpha$ 2). El NF- $\kappa$ B está implicado en la regulación de numerosos genes implicados en procesos que incluyen, la respuesta inflamatoria, apoptosis, cáncer, supervivencia neuronal, e inmunidad innata. La activación del NF- $\kappa$ B se controla principalmente a nivel post-transcripcional por degradación de la subunidad inhibidora I $\kappa$ B del complejo p55/p65/I $\kappa$ B presente en el citoplasma. Los estímulos activadores tales como el TNF- $\alpha$  activan un complejo cinasa compuesto por dos cinasas específicas de  $\kappa$ B (IKK $\alpha$  e IKK $\beta$ ) y una subunidad moduladora (NEMO o IKK $\gamma$ ). Esto da lugar a la fosforilación de la subunidad inhibidora, que se ubiquitina entonces y se degrada mediante el proteosoma. Esto desencadena la translocación del NF- $\kappa$ B en el núcleo, donde inicia la transcripción uniéndose a secuencias reguladoras (secuencias de reconocimiento/unión a NF- $\kappa$ B) presentes en la región promotora de los genes diana de NF- $\kappa$ B.

Los genes diana del TNF- $\alpha$  se somete a un patrón complejo de regulación ya que NF- $\kappa$ B es un factor de transcripción ubicuo inducido por varias citocinas. Además, el TNF- $\alpha$  induce la expresión de varios genes dianas de NF- $\kappa$ B que en sí mismos son factores de transcripción incluyendo JunD y factor regulador del interferón-1 (IRF-1). Por lo tanto, el aumento de transcripción de IRF-1, por ejemplo, es responsable del acoplamiento cruzado de una respuesta de interferón con la respuesta mediada por el receptor del TNF. Con el fin de construir un ensayo de gen indicador específico para la detección de TNF- $\alpha$  de manera que otras citocinas distintas al TNF- $\alpha$  (por ejemplo, IFN $\gamma$ , IL-2, IL-5, IL-6) que activan el NF- $\kappa$ B no interfieran con el ensayo, se transfectó una línea celular que es negativa en receptores (es decir, de origen natural, "desactivada" o "inactivada") para los receptores de los activadores extracelulares principales de la ruta de señalización del NF- $\kappa$ B, distintos del TNF- $\alpha$ , con una construcción de gen indicador regulada por NF- $\kappa$ B sintética que carezca de sitios de reconocimiento para los factores de transcripción inducida por citocinas no relacionadas.

Por lo tanto, los presentes inventores han desarrollado un método altamente sensible y reproducible para cuantificar la actividad del TNF- $\alpha$  como otra realización preferida de la presente invención. Una realización preferida se basa en la línea de células T humanas, Jurkat, transfectada con un gen indicador de luciferasa controlada por un promotor quimérico que responde al TNF- $\alpha$ , que permite determinar la actividad del TNF- $\alpha$  con un alto grado de precisión en pocas horas. El promotor que responde al TNF- $\alpha$  que se utiliza para transfectar las células Jurkat es un promotor sintético basado en repeticiones en tándem de 5 secuencias canónicas de reconocimiento del NF- $\kappa$ B, el elemento de respuesta principal para el factor de transcripción principal inducido por el TNF- $\alpha$  (Imanishi et al., 2000). Como se descubrió sorprendentemente que las repeticiones en tándem de la secuencia canónica de reconocimiento/unión de NF- $\kappa$ B eran altamente eficaces ( $10^5$  veces más) para aumentar la transcripción a partir del promotor mínimo SV40, se diseñó una repetición en tándem de 6 secuencias canónicas de reconocimiento de NF- $\kappa$ B para conferir la máxima actividad transcripcional al promotor sintético en respuesta al tratamiento con TNF- $\alpha$  (Figura 4). Se seleccionó entonces un clon estable, JUT-4, de células Jurkat transfectadas basándose en el aumento máximo en unidades relativas de luciferasa (RLU) en respuesta al tratamiento con TNF- $\alpha$  con respecto a las células de control sin tratar. Se apreciará que aunque los presentes inventores han descubierto que las repeticiones en tándem de cinco secuencias canónicas de reconocimiento/unión a NF- $\kappa$ B se prefieren, también se contemplan repeticiones en tándem de más o menos de cinco canónicas de reconocimiento/unión a NF- $\kappa$ B.

La Figura 5 demuestra que esta realización de línea celular preferida, que es negativa a receptores de IFN $\gamma$  e IL2 y que alberga una construcción de gen indicador de repeticiones en tándem de cinco secuencias canónicas de reconocimiento de NF- $\kappa$ B que controla un promotor mínimo SV40 unido operativamente a una secuencia codificante de luciferasa, es altamente sensible y específico de TNF- $\alpha$ . La mejora de la sensibilidad y especificidad por el TNF- $\alpha$  se puede ver fácilmente con respecto a una línea celular U937 (que tiene receptores funcionales para IFN $\gamma$  e IL2) que alberga una construcción de gen indicador en la que la región promotora (-500 a +1) del gen IRF-1 está unida operativamente a la secuencia codificante de luciferasa (Figura 1). Esta región promotora contiene secuencias de reconocimiento de NF- $\kappa$ B y una secuencia GAS que responde a IFN $\gamma$ . La Figura 2 muestra que la línea celular U937 transfectada con la construcción de gen indicador responde tanto a IFN $\gamma$  como a TNF- $\alpha$ . Cuando está presentes el IFN $\gamma$  y TNF- $\alpha$ , la sensibilidad del gen indicador se reduce ya que la actividad de luciferasa en RLU es menor que la suma de las unidades relativas de luciferasa (RLU) para IFN $\gamma$  y TNF- $\alpha$  ensayados por separado.

Otros ejemplos no limitantes de líneas celulares de acuerdo con la presente divulgación incluye las líneas celulares que contienen, por ejemplo, la construcción de gen indicador de la Figura 4, pero que carece de receptores de superficie celular al menos para TNF- $\alpha$  e IFN $\gamma$  (cuando se desea un ensayo de gen indicador para IL2) y para al menos TNF- $\alpha$ , IFN $\gamma$  e IL2 (cuando se desea un ensayo de gen indicador para IL5).

Otro aspecto de la presente divulgación se refiere a un kit de ensayo para determinar la presencia y/o el nivel, en una muestra, de una molécula que activa la actividad de transducción de la señal de una molécula o complejo de superficie celular. Este kit de ensayo incluye una pluralidad de células de la línea celular de la presente divulgación (como reactivo) y un dispositivo de ensayo que tiene una pluralidad de pocillos. Preferentemente, el dispositivo de ensayo es una placa de titulación multipocillo, pero también puede ser cualquier Tipo de receptáculo, tal como placas o platos de Petri, con una pluralidad de pocillos en los que se pueda llevar a cabo el ensayo para determinar el nivel de una molécula en una muestra. Se prefiere que las células como componente o reactivo del kit de ensayo se dispongan en los pocillos del dispositivo de ensayo, aunque se apreciará que en vez de eso dichas células pueden dispensarse en los pocillos del dispositivo de ensayo por el usuario final justo antes de llevar a cabo el

ensayo. El kit puede incluir adicionalmente un grupo de instrucciones para utilizar el kit para llevar a cabo el ensayo que se pretende para la determinación de la presencia y/o nivel de una molécula que active la actividad de transducción de la señal en una muestra.

- 5 Cuando las células de la línea celular de acuerdo con la presente invención se utilizan como un reactivo en un kit, las células se tratan preferentemente con un agente anti-mitótico y pro-apoptótico y se almacenan congeladas para su uso futuro en un ensayo de gen indicador como parte de un kit. La preparación de células de esta manera se desvela en el documento US2004-0235157.
- 10 La presente invención proporciona además un método de ensayo para determinar la presencia y/o el nivel, en una muestra, en referencia a una referencia incluida en el ensayo, de una señal extracelular que activa la actividad de transducción de la señal de una molécula o complejo de superficie celular, preferentemente un receptor o complejo de superficie celular. Este método de ensayo utiliza células de la línea celular de la presente invención. Tras la incubación con una muestra en la que se desea determinar la presencia y/o nivel de una señal extracelular que activa la actividad de transducción de la señal de una molécula o complejo de superficie celular, se determina el nivel de expresión de un producto génico indicador, codificado en la construcción de gen indicador albergada en las células de la línea celular de la presente invención en la muestra. Este nivel de expresión según se determina por el método de acuerdo con la presente invención se utiliza para después determinar cualitativamente la presencia y/o determinar cuantitativamente el nivel, en una muestra, de la señal extracelular que activa la actividad de transducción de señal de una molécula o complejo de superficie celular.
- 20

Los expertos en la técnica apreciarán que el kit y el método de ensayo de acuerdo con la presente se pueden utilizar tanto para cuantificar un agonista o ensayar indirectamente el nivel de una molécula que se une a la molécula de señal extracelular como un antagonista o que se une el antagonista de la molécula de señal extracelular. Un ejemplo preferido de dicho ensayo indirecto es cuando la molécula de señal extracelular es TNF- $\alpha$  y la molécula que se ensaya indirectamente mediante la determinación del nivel de TNF- $\alpha$  es o un antagonista de TNF- $\alpha$  o un anticuerpo neutralizante contra el antagonista de TNF- $\alpha$ . Esta realización se describe adicionalmente al final de esta sección.

25

Los ensayos de gen indicador para el interferón Tipo II y para el TNF- $\alpha$  son las realizaciones más preferidas de la presente divulgación. El producto del gen indicador preferentemente es luciferasa de luciérnaga, aequorina de medusa, o proteína verde fluorescente aumentada (EGFP) y está preferentemente bajo el control de un promotor quimérico sensible al interferón Tipo II que contiene GAS de IRF-1 y un promotor mínimo SV40. Ejemplos de dichas construcciones genéticas indicadoras en los ensayos de gen indicador para IFN $\gamma$  y TNF- $\alpha$  se presentan, respectivamente, en SEQ ID NO: 4 y en la Figura 4 (SEQ ID NO: 5). El SEQ ID NO: 4 es la secuencia completa de una construcción de gen indicador de luciferasa, en la que la GAS del IRF-1 (nucleótidos 41-83 de SEQ ID NO: 4) se clona en el sitio XhoI/BglII del ADN plasmídico de promotor pGL2 (nº de catálogo E1631, Promega, Madison, WI) inmediatamente corriente arriba del promotor mínimo SV40 unido operativamente a la secuencia del gen indicador de luciferasa de luciérnaga. La Figura 4 es una representación esquemática de una construcción de gen indicador en la que una repetición en tándem de 5x del sitio de reconocimiento/unión del NF- $\kappa$ B (nucleótidos 41-111 de SEQ ID NO: 5) se posiciona inmediatamente corriente arriba del promotor mínimo SV40 unido operativamente a la secuencia del gen indicador codificante de la luciferasa de luciérnaga (es decir, en el sitio de clonación XhoI/BglII del ADN plasmídico del promotor pGL2). El SEQ ID NO: 5 es la secuencia completa del plásmido resultante.

30

35

40

Como la línea celular de la presente divulgación que se utiliza en el ensayo de gen indicador, la línea celular es preferentemente una línea celular de mamífero o aviar, más preferentemente una línea celular humana, y más preferentemente una célula pro-monocítica humana o célula T (es decir, Jurkat). Otras líneas celulares preferidas incluyen, pero no se limitan a, líneas celulares mieloides humanas (es decir, U266R) y adenocarcinoma de mama humano (es decir, MCF7) y líneas celulares de linfoma de ratón y leucemia eritroide de ratón.

45

Una aplicación adicional del ensayo de gen indicador de la presente invención es para utilizar el nivel de señal extracelular de interés para determinar indirectamente el nivel de un antagonista contra la señal extracelular de interés o el nivel de un anticuerpo (es decir, un anticuerpo neutralizante) contra el antagonista.

50

Los antagonistas del TNF- $\alpha$  se utilizan ampliamente para el tratamiento de varios trastornos inflamatorios que incluyen la enfermedad de Crohn y artritis reumatoide (AR) (Targan et al., 1997; y Lipsky et al., 2000). El tratamiento repetido con antagonistas del TNF- $\alpha$  da lugar a la producción de anticuerpos contra el antagonista (anticuerpo o proteína de fusión recombinante) en un número de pacientes (Baert et al., 2003). La aparición de anticuerpos contra los antagonistas del TNF- $\alpha$  se asocia con una farmacodinamia reducida y una respuesta clínica deficiente (Baert et al., 2003). Por lo tanto, en un estudio, el 45 % de los pacientes con enfermedad de Crohn tratados con Infliximab, un anticuerpo IgG1 monoclonal quimérico contra TNF- $\alpha$ , desarrollaba anticuerpos contra el infliximab tras la primera infusión y del 61 % tras la quinta infusión. La aparición de anticuerpo contra infliximab se asoció con un aumento del riesgo de reacciones en la infusión y con una duración más corta de la respuesta clínica (Baert et al., 2003). Actualmente el TNF- $\alpha$  o los anticuerpos contra el TNF- $\alpha$  se cuantifican utilizando ensayos basados en anticuerpos tales como ELISA (Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas). Dichos ensayos no pueden distinguir entre anticuerpos de unión (BAbs) y anticuerpos neutralizantes (NABs). Aunque ambos Tipos de anticuerpos pueden impactar negativamente la farmacodinamia del fármaco, solamente los NABs pueden neutralizar la actividad

55

60

65

biológica de los antagonistas del TNF- $\alpha$  dando como resultado una respuesta clínica reducida y la progresión de la enfermedad. El tratamiento de células JUT-4, una línea celular de acuerdo con la presente invención desarrollada para el uso en un ensayo de gen indicador para TNF- $\alpha$  con un fármaco anti-mitótico permite que las células se almacenen congeladas durante varios meses sin pérdida de sensibilidad al TNF- $\alpha$  o necesidad del cultivo celular (véase el documento US2004-0235157 para la preparación de células con un fármaco anti-mitótico para su almacenamiento como células congeladas). Este ensayo forma la base de un método para la cuantificación selectiva de los anticuerpos neutralizantes contra los antagonistas de TNF- $\alpha$  incluyendo el infliximab (IgG1 quimérico), Adlimumab (IgG1 humana), y Etanercept (proteína de fusión TFNRp75-Fc de IgG1 humana). En resumen, se pre-incuba una cantidad de antagonista de TNF- $\alpha$  suficiente para neutralizar 10 ng/ml de TNF- $\alpha$  con 10 ng/ml de TNF- $\alpha$  y entonces se incuban con diluciones en serie de suero humano que contiene los anticuerpos contra el antagonista de TNF- $\alpha$ . El título neutralizante del anti-suero anti-antagonista de TNF- $\alpha$  se estima entonces a partir de la dilución del suero recíproca que da como resultado la detección de 1,0 ng/ml de TNF- $\alpha$  utilizando el ensayo de gen indicador con JUT-4, después de la incubación del suero con 10 ng de unidades neutralizantes del antagonista de TNF- $\alpha$  y 10 ng/ml de TNF- $\alpha$ .

### Ejemplo 1

#### Ensayo de interferón gamma humano

Se co-transfectó la línea celular U266R pro-monocítica humana, que carece de un receptor funcional de IFN Tipo I (Abramovich et al., 1994) y se derivó de la línea celular linfoblastoide humana U266 (ATCC N° TIB-196), con el plásmido GAS-Luc (luciferasa) y la construcción del gen neo PSV2, y se seleccionaron los clones resistentes a G418 utilizando técnicas convencionales. El plásmido GAS-Luc que contenía la secuencia GAS (secuencia de IFN gamma activado) del gen del IRF-1 (Factor Regulador del Interferón 1) (número de acceso de GenBank L05078.1 GI: 186551; Harada et al., 1989) y un promotor mínimo SV40 que regula la transcripción del gen indicador de luciferasa de luciérnaga se construyó clonando el oligonucleótido de doble cadena sintética tctacaacagcctgattccccgaaatgacgg cacgcagccg (SEQ ID NO:1), que se corresponde con la secuencia GAS del gen IRF1, en el sitio XhoI/BglIII del vector de promotor pGL2 (Promega). Se seleccionó entonces un clon estable, el Clon 2, basándose en el máximo aumento de unidades relativas de luciferasa (RLU) en respuesta al tratamiento con IFN $\gamma$  humano con respecto a las células de control sin tratar. Este clon estable de células U266R transfectadas con GAS-Luc, denominado UIG2, se aisló y se cultivó en medio RPMI 1640 con un 10 % de suero fetal bovino (FBS) y gentamicina. Las células se sembraron a una densidad de  $2 \times 10^5$  células/ml en medio RPMI 1640 con un 10 % de FBS y se dividieron 1:4 cinco días más tarde cuando se alcanzaba una concentración de  $0,8 \times 10^6$  células/ml.

Los resultados de un ensayo con interferón gamma (IFN $\gamma$ ) humano en la línea celular U937 humana, que tiene receptores funcionales para IFN Tipo I y Tipo II y que se había co-transfectado con el plásmido GAS-Luc y la construcción genética neo PSV2, se muestran en la Tabla 1, a continuación.

Tabla 1

IFN $\gamma$ (UI/ml)	RLU (Unidades relativas de luciferasa): Veces de aumento
10,0	1,25
1000	1,50
IFN $\alpha$ (UI/ml)	
1,0	1,5
100,0	3,0

El aumento de RLU en respuesta al IFN $\gamma$  humano era mínimo con respecto a las células de control sin tratar, y se puede ver que la especificidad por IFN $\gamma$  era pobre ya que el tratamiento de células con IFN $\alpha$  humano presentaba un relativamente gran aumento en RLU.

Por el contrario, los resultados del ensayo con IFN $\gamma$  humano en la línea celular U266R humana Clon 2 estable, que carece de un receptor de IFN Tipo I funcional, y que se transfectó con la misma construcción de gen indicador que se utilizó para transfectar células U937, se muestra en la Tabla 2, a continuación.

**Tabla 2**

<b>IFN<math>\gamma</math> (UI/ml)</b>	<b>RLU (Unidades relativas de luciferasa): Veces de aumento</b>
1,0	1,5
1000	9
<b>IFN<math>\alpha</math> (UI/ml)</b>	
100,0	< 0,15

Estos resultados muestran que el incremento de RLU en respuesta al IFN $\gamma$  humano era grande con respecto a las células de control sin tratar, y se puede ver que la especificidad por el IFN $\gamma$  era bueno ya que el tratamiento de células con el IFN $\alpha$  humano no daba lugar a un aumento significativo en ULR.

**Ejemplo 2**

**Ensayo de TNF- $\alpha$  humano**

Se estableció aquí un ensayo de gen indicador para la cuantificación de TNF- $\alpha$  utilizando una línea celular transfectada con una construcción de gen indicador de manera que el ensamblaje sea capaz de detectar y responder a bajos niveles de TNF- $\alpha$  de una manera altamente específica.

En una serie inicial de experimentos, la región promotora (nucleótido -500 a +1) del gen IRF-1 (número de acceso de GenBank L05078.1 GI: 186551; Harada et al., 1989) se clonó corriente arriba de un promotor mínimo SV40 en el sitio XhoI/BglII del vector ADN promotor-pGL2 (Promega) con el fin de regular la transcripción del gen indicador con luciferasa de luciérnaga (Figura 1). Se co-transfectaron células U927 pro-monocíticas humanas con el plásmido IRF-Luc y una construcción genética neo PSV2 y se seleccionaron los clones resistentes a G418 utilizando técnicas convencionales. Se seleccionó entonces un clon estable, el Clon 2, basándose en el aumento máximo en unidades relativas de luciferasa (RLU) en respuesta al tratamiento con TNF- $\alpha$  humano con respecto a las células de control sin tratar.

La línea de células T humana Jurkat, que es refractaria a IL-2 y responde pobremente a IFN $\gamma$ , se co-transfectó con el plásmido 5xNF $\kappa$ B-Luc y una construcción genética neo PSV2, y se seleccionaron los clones resistentes a G418 utilizando técnicas convencionales. Se construyó el plásmido 5xNF $\kappa$ B-Luc que contenía una repetición en tándem de 5 veces de la secuencia canónica de reconocimiento del NF- $\kappa$ B y un promotor mínimo SV40 que regula la transcripción del gen indicador de luciferasa de luciérnaga clonando el oligonucleótido de doble cadena sintético (Figura 4), que se corresponde con la repetición en tándem 5 veces de la secuencia canónica de reconocimiento del NF- $\kappa$ B en el sitio XhoI/BglII del vector de promotor pGL2 (Promega). Se seleccionó entonces un clon estable, el Clon 4, basándose en el incremento máximo en unidades relativas de luciferasa (RLU) en respuesta al tratamiento con TNF- $\alpha$  humano con respecto a las células de control sin tratar.

Se aisló un clon estable, el Clon 4, de células Jurkat transfectadas con 5xNF $\kappa$ B-Luc, denominado JUT-4, y se cultivó en medio RPMI 1640 con un 10 % de suero fetal bovino (FBS) y gentamicina. Las células se sembraron a una densidad de  $1 \times 10^5$  células/ml en medio RPMI 1640 con un 10 % de FBS y entonces se dividieron 1:10 cinco días más tarde cuando la concentración celular alcanzaba  $1,0 \times 10^6$  células/ml.

**Tabla 3**

**Células MCF7 humanas transfectadas con el promotor IRF-1, Clon nº 1**

<b>TNF<math>\alpha</math> (ng/ml)</b>	<b>RLU (Unidades relativas de luciferasa): Veces de aumento</b>
0,1	0*
100,0	0*
<b>IL2 (ng/ml)</b>	
1,0	< 0,1
100,0	< 0,1

\* Ausencia completa de una respuesta en RLU debido a la inducción de apoptosis masiva en las células de ensayo

Las células MCF-7 transfectadas con el promotor IRF-1 son altamente sensibles al TNF- $\alpha$  pero son inadecuadas como base para un ensayo de gen indicador para TNF- $\alpha$  debido a la inducción de apoptosis masiva en las células de ensayo y la rápida muerte celular.

5 **Células U937, Clon 2**

El tratamiento de células IRF-Luc transfectadas con el plásmido IRF-Luc con TNF- $\alpha$  (10 ng daban como resultado un aumento modesto de 1,58 veces en RLU, mientras que el tratamiento de células IRF-Luc2 con IFN $\gamma$  o TNF- $\alpha$  + IFN $\gamma$  daba un aumento de 1,1 y 1,85 veces en RLU respectivamente (Figura 3).

10

**Células Jurkat, Clon nº 4**

**Tabla 4**

TNF- $\alpha$ (ng/ml)	RLU (Unidades relativas de luciferasa): Veces de aumento
0,1	2,0
100,0	10,0
<b>IFN<math>\gamma</math> (IU/ml)</b>	
100,0	< 0,10
<b>IL-2 (ng/ml)</b>	
1,0	< 0,10
100	< 0,15

15

Las células Jurkat, JUT-4, transfectadas con el promotor 5xNFkB eran altamente sensibles al TNF- $\alpha$  y no respondían completamente al IFN $\gamma$  o IL-2 y por lo tanto proporcionan una base ideal para un ensayo de gen indicador capaz de detectar y cuantificar bajos niveles de TNF- $\alpha$  de una manera altamente específica.

**Referencias**

20 Abramovich et al. (1994) Differential tyrosine phosphorylation of the IFNAR chain of the type I interferon receptor and of an associated surface protein in response to IFN-alpha and IFN-beta. *Embo J.* 13:5871.

Ank et al *JICR* 2006, 26:373-379

Alton et al. (1979) Nucleotide sequence analysis of the chloramphenicol resistance transposon Tn9. *Nature* 282:864-869

25 Baert et al., *N Engl J Med* 2003, 348:601-08

Baldwin et al. (1984) Cloning of the luciferase structural genes from *Vibrio harveyi* and expression of bioluminescence in *Escherichia coli*. *Biochemistry* 23:3663-3667

Balog et al., *Pathobiology* 2004; 71(5):274-280

30 Barbieri et al. (1994) Activation of the protein tyrosine kinase tyk2 by interferon alpha/beta. *Eur J Biochem.* 223:427.

Basu et al. (1998) The antiviral action of interferon is potentiated by removal of the conserved IRTAM domain of the IFNAR1 chain of the interferon alpha/beta receptor: effects on JAK-STAT activation and receptor down-regulation. *Virology.* 242:14.

35 Bazan, (1990). Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87:6934.

- Bouche et al. (1987) Basic fibroblast growth factor enters the nucleolus and stimulates the transcription of ribosomal genes in ABAE cells undergoing G0---G1 transition. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* 84:6770-6774
- Boulter et al. (1986) Isolation of a cDNA clone coding for a possible neural nicotinic acetylcholine receptor alpha-subunit. *Nature* 319:368-374
- 5 Boulter et al. (1990) Alpha 3, alpha 5, and beta 4: three members of the rat neuronal nicotinic acetylcholine receptor-related gene family form a gene cluster. *J. Biol. Chem.* 265:4472-4482
- Boyanova et al, *Analytical Biochemistry*, 2002; 308:178-181
- Branca et al. (1981) Evidence that types I and II interferons have different receptors. *Nature.* 294:768.
- Bunzow et al. (1988) Cloning and expression of a rat D2 dopamine receptor cDNA. *Nature* 336:783-787
- 10 Canosi et al. (1996) A highly precise reporter gene bioassay for type I interferon. *Journal of Immunological Methods* 199:69-76
- Changelian et al. (1989) Structure of the NGFI-A gene and detection of upstream sequences responsible for its transcriptional induction by nerve growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:377-381
- 15 Changelian et al. (1989) Structure of the NGFI-A gene and detection of upstream sequences responsible for its transcriptional induction by nerve growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86:377-381
- Cleary et al. (1994) Knockout and reconstitution of a functional human type I interferon receptor complex. *Journal of Biological Chemistry.* 269:18747.
- Cohen et al. (1995) Ligand-induced association of the type I interferon receptor components. *Mol Cell Biol.* 15:4208.
- 20 Colamonici et al. (1994) Direct binding to and tyrosine phosphorylation of the alpha subunit of the type I interferon receptor by p135tyk2 tyrosine kinase. *Mol. Cell. Biol.* 14:8133.
- Comb et al. (1986) *Nature* 323:353-356
- Constantinescu et al. (1994) Role of interferon alpha/beta receptor chain 1 in the structure and transmembrane signaling of the interferon alpha/beta receptor complex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91:9602.
- 25 Constantinescu et al. (1995) Expression and signaling specificity of the IFNAR chain of the type I interferon receptor complex. *Proc Natl Acad Sci USA.* 92:10487.
- Cook et al. (1996) Differential responsiveness of a splice variant of the human type I interferon receptor to interferons. *J Biol Chem.* 271:13448.
- Cowin et al., *Wound Repair Regen.* 2006; 14(4):421-426
- 30 Cutrone et al. (1997) Contributions of cloned type I interferon receptor subunits to differential ligand binding. *FEBS Lett.* 404:197.
- Darnell et al. (1994) Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science.* 264:1415.
- De Maeyer et al. (1988) *Interferons and other regulatory cytokines.* John Wiley, New york: 69.
- 35 Deneris et al. (1988) Primary structure and expression of beta 2: a novel subunit of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Neuron* 1:45-54
- Deneris et al. (1989) Beta 3: a new member of nicotinic acetylcholine receptor gene family is expressed in brain.*J. Biol. Chem.* 264: 6268-6272
- deWet et al. (1987) Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells. *Mol. Cell Biol.* 7:725-737

- Diaz et al. (1993) Nomenclature of the human interferon genes. *J Interferon Res.* 13:443.
- Diebold SS, Kaisho T, Hemmi H, Akira S, Reis, E., y Sousa C. (2003). Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science.* 303, 1529-1531.
- 5 Dixon et al. (1986) Cloning of the gene and cDNA for mammalian beta-adrenergic receptor and homology with rhodopsin. *Nature* 321:75-79
- Domanski et al. (1995) Cloning and expression of a long form of the beta subunit of the interferon alpha beta receptor that is required for signaling. *J Biol Chem.* 270:21606.
- Domanski et al. (1996) The type-I interferon receptor. The long and short of it. *Cytokine Growth Factor Rev.* 7:143.
- 10 Duvoisin et al. (1989) The functional diversity of the neuronal nicotinic acetylcholine receptors is increased by a novel subunit: beta 4. *Neuron* 3:487-496
- Ellis et al. (1988) Sequence and expression of mRNAs encoding the alpha 1 and alpha 2 subunits of a DHP-sensitive calcium channel. *Science* 241:1661-1664
- 15 Engebrecht et al. (1984) Identification of genes and gene products necessary for bacterial bioluminescence. *PNAS* 1:4154-4158
- Fiette et al. (1995) Theiler's virus infection of 129Sv mice that lack the interferon alpha/beta or interferon gamma receptors. *Journal of Experimental Medicine.* 181:2069.
- Fink et al. (1988), The CGTCA sequence motif is essential for biological activity of the vasoactive intestinal peptide gene cAMP-regulated enhancer. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85:6662-6666
- 20 Frielle et al. (1987) Cloning of the cDNA for the human beta 1-adrenergic receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84:7920-7924
- Fu, (1992) A transcription factor with SH2 and SH3 domains is directly activated by an interferon alpha-induced cytoplasmic protein tyrosine kinase(s). *Cell.* 70:323.
- 25 Goldman et al. (1987) Members of a nicotinic acetylcholine receptor gene family are expressed in different regions of the mammalian central nervous system. *Cell* 48:965-973
- Hall et al. (1983) *J. Mol. Appl. Gen.* 2:101
- Hammerling et al. (1998) The  $\beta$ -gal interferon assay: a new, precise, and sensitive method. *Journal of Interferon and Cytokine Research* 18:451-460
- Harada et al, *Cell*, 1989, 58:729-739
- 30 Heil F, Hemmi H, Hochrein H, Ampenberger F, Kirschning C, Akira S, Lipford G, Wagner H, y Bauer S. (2003). Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science*, 303, 1526-1529.
- Hemmi, H., Takeuchi, O., Sato, S., Yamamoto, M., Kaisho, T., Santon H., Kawai, T., Hoshino, K., Takeda, K, y Akira, S. (2004). The roles of two ikappaB kinases in lipopolysaccharide and double stranded RNA signaling and viral infection. *J. Exp. Med.* 199, 1641-1650.
- 35 Hemmi, H., Takeuchi, O., Kawai, T., Kaisho, T., Sato, S., Sanjo, H., Matsumoto, M., Hoshino, K., Wagner, H., Takeda, K., y Akira, S. (2000). A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature*, 408, 740-745.
- Hollmann et al. (1989) Cloning by functional expression of a member of the glutamate receptor family. *Nature* 342:643-648
- 40 Horvath et al. (1995) A STAT protein domain that determines DNA sequence recognition suggests a novel DNA-binding domain *Genes Dev.* 9:984-994

- Hwang et al. (1995) A null mutation in the gene encoding a type I interferon receptor component eliminates antiproliferative and antiviral responses to interferons alpha and beta and alters macrophage responses. *Proc Natl Acad Sci USA*. 92:11284.
- Ihle, (1995) Cytokine receptor signalling. *Nature*. 377:591.
- 5 Imanishi et al., *J. Immunol*, 2000, 165:3907-16
- Jay et al. (1990) Primary structure of the gamma subunit of the DHP-sensitive calcium channel from skeletal muscle. *Science* 248:490-492
- Johnson et al. (1986) *Cell* 47:545-554
- 10 Julius et al. (1988) Molecular characterization of a functional cDNA encoding the serotonin 1c receptor. *Science* 241:558-564
- Julius et al. (1990) The 5HT2 receptor defines a family of structurally distinct but functionally conserved serotonin receptors. *PNAS* 87:928-932
- Kayano et al, (1988) Primary structure of rat brain sodium channel III deduced from the cDNA sequence. *FEBS Lett*. 228:187-194
- 15 King, D.P., Jones, P.P., *J. Immunol. Methods*, 1983, 131:315-320
- Kobilka et al. (1987) An intronless gene encoding a potential member of the family of receptors coupled to guanine nucleotide regulatory proteins. *Nature* 329:75-79
- Kobilka et al. (1987) Cloning, sequencing, and expression of the gene coding for the human platelet alpha 2-adrenergic receptor. *Science* 238:650-656
- 20 Lallemand et al. (1996) Constitutive expression of specific interferon isotypes in peripheral blood leukocytes from normal individuals and in promonocytic U937 cells. *J Leukoc Biol*. 60:137-46
- Langer et al. (1996) Interferon receptors. *Biotherapy*. 8:163
- Levitan et al. (1988) Structural and functional basis for GABAA receptor heterogeneity. *Nature* 335:76-79
- 25 Levy et al. (1988) Interferon-induced nuclear factors that bind a shared promoter element correlate with positive and negative control *Genes Dev*. 2:383-393
- Lewis, (1995) A sensitive biological assay for interferons. *Journal of Immunological Methods* 185:9-17
- Lim et al. (1993) Cloning and characterization of a bovine alpha interferon receptor. *Biochim Biophys Acta*. 1173:314.
- Lipsky et al., *N Engl J Med* 2000, 343:1594-602
- 30 Lleonart et al., (1990) A novel, quantitative bioassay for type I interferon using a recombinant indicator cell line. *Biotechnology* 8:1263-1267
- Lutfalla et al. (1992) The structure of the human interferon alpha/beta receptor gene. *J Biol Chem*. 267:2802.
- Lutfalla et al. (1995) Mutant U5A cells are complemented by an interferon-alpha beta receptor subunit generated by alternative processing of a new member of a cytokine receptor gene cluster. *Embo J*. 14:5100.
- 35 Malu et al, *J. Immunol Methods*, 2003; 272:55-65
- Marotte et al, *Arthritis Res. Ther.* 2005; 7(1):R149-155
- McFarlane et al, *FEBS Letters*, 2002, 515:119-126

- McKinnon, D. (1989) Isolation of a cDNA clone coding for a putative second potassium channel indicates the existence of a gene family. *J. Biol. Chem.* 264:8230-8236
- Meager, A. *Methods*; 2006, 38:237-252
- 5 Merlin et al. (1985) 125I-labelled human interferons alpha, beta and gamma: comparative receptor-binding data. *J Gen Virol.* 66:1149.
- Montminy et al. (1986), Identification of a cyclic-AMP-responsive element within the rat somatostatin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83:6682-6686
- Mouchel-Vielh et al. (1992). Specific antiviral activities of the human alpha interferons are determined at the level of receptor (IFNAR) structure. *FEBS Lett.* 313:255.
- 10 Muller et al. (1994) Functional role of type I and type II interferons in antiviral defense. *Science.* 264:1918.
- Noda et al. (1986) *Nature* 320:188-192
- Novick et al. (1994) The human interferon alpha/beta receptor: characterization and molecular cloning. *Cell.* 77:391.
- Perry et al., (1999) Cloning of interferon-stimulated gene 17: The promoter and nuclear proteins that regulate transcription. *Molecular Endocrinology*, 13:1197-1206
- 15 Perry, A. K., Chow, E. K., Goodnough, J. B., Yeh, W. C., y Cheng, G. (2004). Differential requirement for TANK-binding kinase-1 in type I interferon responses
- Pestka et al. (1987) Interferons and their actions. *A. Rev. Biochem.* 56:727.
- Platanias et al. (1994) Tyrosine phosphorylation of the alpha and beta subunits of the type I interferon receptor. Interferon-beta selectively induces tyrosine phosphorylation of an alpha subunit-associated protein. *J. Biol. Chem.* 269:17761.
- 20 Pritchett et al. (1989) Importance of a novel GABAA receptor subunit for benzodiazepine pharmacology. *Nature* 338:582-585
- Rider et al. (2003) A B cell-based sensor for rapid identification of pathogens. *Science* 301:213-215
- 25 Russell-Harde et al. (1995) Reconstitution of a high affinity binding site for type I interferons. *J Biol Chem.* 270:26033.
- Ruth et al. (1989) Primary structure of the beta subunit of the DHP-sensitive calcium channel from skeletal muscle. *Science* 245:1115-1118
- Sato et al., (2006) *J Immunol* 176(12):7686-94
- 30 Schindler et al. (1992) Interferon-dependent tyrosine phosphorylation of a latent cytoplasmic transcription factor [véanse los comentarios]. *Science.* 257:809.
- Schofield et al. (1987) Sequence and functional expression of the GABA A receptor shows a ligand-gated receptor super-family. *Nature* 328:221-227
- Schumacher et al. (1994) The chicken Mx promoter contains an ISRE motif and confers interferon inducibility to a reporter gene in chick and monkey cells. *Virology* 15:203(1):144-8
- 35 Schwamborn et al., *BMC Genomics* 2003, 4:46-58
- Sheppard et al *Nat Immunol.* 2003; 4:63-68
- Sheng et al. (1990) The regulation and function of c-fos and other immediate early genes in the nervous system. *Neuron* 4:477-485

- Shivers, B.D. (1989) *Neuron* 3:327-337
- Short et al. (1986) *J. Biol. Chem.* 261:9721-9726
- Steinhoff et al. (1995) Antiviral protection by vesicular stomatitis virus-specific antibodies in alpha/beta interferon receptor-deficient mice. *Journal of Virology.* 69:2153.
- 5 Steinman, R.M., y Hemmi, H. (2006). Dendritic cells: translating innate to adaptive immunity. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 311, 17-58.
- Stormann et al. (1990) Molecular cloning and expression of a dopamine D2 receptor from human retina. *Molec. Pharm.* 37:1-6
- 10 Tanabe et al. (1987) Primary structure of the receptor for calcium channel blockers from skeletal muscle. *Nature* 328:313-E318
- Taniguchi, (1995) Cytokine signaling through nonreceptor protein tyrosine kinases. *Science.* 268:251.
- Targan et al., *N Engl J Med* 1997, 337:1029-35
- Tempel et al. (1988) Cloning of a probable potassium channel gene from mouse brain. *Nature* 332:837-839
- 15 Thoreau et al. (1991) Structural symmetry of the extracellular domain of the cytokine/growth hormone/prolactin receptor family and interferon receptors revealed by hydrophobic cluster analysis. *FEBS Lett.* 282:26.
- Toh et al. (1989) Isolation and characterization of a rat liver alkaline phosphatase gene. A single gene with two promoters. *Eur. J. Biochem.* 182:231-238
- Uddin et al. (1995) Interaction of the transcriptional activator Stat-2 with the type I interferon receptor. *J Biol Chem.* 270:24627.
- 20 Uematsu, S., y Akira, S. (2007). Toll-like receptors and type I interferons. *J. Biol. Chem.* 282, 15319-15323.
- Uze et al. (1990) Genetic transfer of a functional human interferon alpha receptor into mouse cells: cloning and expression of its cDNA. *Cell.* 60:225.
- Uze et al. (1992) Behavior of a cloned murine interferon alpha/beta receptor expressed in homospecific or heterospecific background. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89:4774.
- 25 Uzé et al. (1995) Alpha and beta interferons and their receptor and their friends and relations. *Journal of Interferon & Cytokine Research.* 15:3.
- van den Broek et al. (1995) Antiviral defense in mice lacking both alpha/beta and gamma interferon receptors. *Journal of Virology.* 69:4792.
- 30 Vandenbroek et al. (1995) Immune defence in mice lacking type I and/or type II interferon receptors. *Immunol Rev.* 148:5.
- Velazquez et al. (1995) Distinct domains of the protein tyrosine kinase tyk2 required for binding of interferon-alpha/beta and for signal transduction. *J Biol Chem.* 270:3327.
- Wada et al. (1988) Functional expression of a new pharmacological subtype of brain nicotinic acetylcholine receptor. *Science* 240:330-334
- 35 Yan et al. (1996) Molecular characterization of an alpha interferon receptor 1 subunit (IFNaR1) domain required for TYK2 binding and signal transduction. *Mol Cell Biol.* 16:2074.
- Yan et al. (1996) Phosphorylated interferon-alpha receptor 1 subunit (IFNaR1) acts as a docking site for the latent form of the 113 kDa STAT2 protein. *EMBO J.* 15:1064.
- Yeh et al. (1987) Ultrastructural localization of a platelet-derived growth factor/v-sis-related protein(s) in cytoplasm

and nucleus of simian sarcoma virus-transformed cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84:2317-2321

Ymer et al. (1989) GABAA receptor beta subunit heterogeneity: functional expression of cloned cDNAs. EMBO J. 8:1665-1670

5 Yoneyama, M., Fujita, T. (2007). Function of RIG-I-like receptors in antiviral innate immunity. J. Biol. Chem. 282, 15315-15318.

Zlokarnik et al. (1998) Quantitation of transcription and clonal selection of single living cells with  $\beta$ -lactamase as reporter. Science 279:84-88.

LISTADO DE SECUENCIAS

10 <110> TOVEY, Michael LALLEMAND, Christophe

<120> ENSAYO DE GEN INDICADOR, KIT Y CÉLULAS CON SENSIBILIDAD Y/O ESPECIFICIDAD MEJORADAS PARA DETERMINAR EL NIVEL DE UNA SEÑAL EXTRACELULAR

15 <130> TOVEYBA PCT

<150> US 60/863.479

<151> 30-10-2006

20 <160> 5

<170> PatentIn versión 3.4

25 <210> 1

<211> 42

<212> ADN

<213> Artificial

30 <220>

<223> sintético

<400> 1

tctacaacag cctgatttcc ccgaaatgac ggcacgcagc cg 42

35 <210> 2

<211> 70

<212> ADN

<213> Artificial

40 <220>

<223> sintético

<400> 2

tggggacttt ccgctgggga ctttccgctg gggactttcc gctggggact ttccgctggg 60

gactttccgc 70

45

50 <210> 3

<211> 21

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> sintético

55 <220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(3)

<223> n es a, c, g o t

5  
<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (6)..(6)  
<223> n es a, c, g o t

10  
<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (16)..(16)  
<223> n es a, c, g o t

15  
<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (19)..(19)  
<223> n es a, c, g o t

20  
<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (21)..(21)  
<223> n es a, c, g o t

<400> 3  
nnnsantcc gggaantgns n 21

25  
<210> 4  
<211> 5834  
<212> ADN  
<213> Artificial

30  
<220>  
<223> sintético

<400> 4

# ES 2 641 271 T3

cccgggaggt accgagctct tacgcgtgct agctcgagtc tacaacagcc tgatttcccc 60  
 gaaatgacgg cacgcagccg agatctgcat ctcaattagt cagcaaccat agtcccggcc 120  
 ctaactccgc ccateccgce cetaactcog cccagttcog cccattctcc gccccatggc 180  
 tgactaattt tttttattta tgcagaggcc gagggccgct cggcctctga gctattccag 240  
 aagtagtgag gaggcttttt tggaggccta ggcttttgca aaaagcttgg cattccggta 300  
 ctgttggtaa aatggaagac gccaaaaaca taaagaaagg cccggcgcca ttctatcctc 360  
 tagaggatgg aaccgctgga gagcaactgc ataaggctat gaagagatac gccctggttc 420  
 ctggaacaat tgcttttaca gatgcacata tcgaggtgaa catcacgtac gccgaatact 480  
 tcgaaatgtc cgttcggttg gcagaagcta tgaaacgata tgggctgaat acaaatcaca 540  
 gaatcgctcg atgcagtgaa aactctcttc aattctttat gccggtgttg ggcgcgttat 600  
 ttatcggagt tgcagttggc cccgcgaacg acatttataa tgaacgtgaa ttgctcaaca 660  
 gtatgaacat ttcgcagcct accgtagtgt ttgtttccaa aaaggggttg caaaaaattt 720  
 tgaacgtgca aaaaaatta ccaataatcc agaaaattat tatcatggat tctaaaacgg 780  
 attaccaggg atttcagtcg atgtacacgt tcgtcacate tcctctacct cccggtttta 840  
 atgaatacga ttttgtacca gagtcctttg atcgtgacaa aacaattgca ctgataatga 900  
 attcctctgg atctactggg ttacctaagg gtgtggccct tccgcataga actgcctgcg 960

## ES 2 641 271 T3

tcagattctc	gcatgccaga	gatcctat	ttggcaatca	aatcattccg	gatactgcga	1020
ttttaagtgt	tgttccattc	catcacgggt	ttggaatggt	tactacactc	ggatatttga	1080
tatgtggatt	tcgagtcgtc	ttaatgtata	gatttgaaga	agagctgttt	ttacgatccc	1140
ttcaggatta	caaaattcaa	agtgcgttgc	tagtaccaac	cctattttca	ttcttcgcca	1200
aaagcactct	gattgacaaa	tacgatttat	ctaatttaca	cgaatttgc	tctgggggcg	1260
cacctcttcc	gaaagaagtc	ggggaagcgg	ttgcaaaacg	cttccatctt	ccagggatac	1320
gacaaggala	lgggctcact	gagactacat	cagclalcl	gallacaccc	gagggggatg	1380
ataaacgggg	cgcggtcggg	aaagtgttc	cattttttga	agcgaagggt	gtggatctgg	1440
ataccgggaa	aacgctgggc	gttaatcaga	gaggcgaatt	atgtgtcaga	ggacctatga	1500
ttatgtccgg	ttatgtaaac	aatccggaag	cgaccaacgc	cttgattgac	aaggatggat	1560
ggctacattc	tgagacata	gcttactggg	acgaagacga	acacttcttc	atagttgacc	1620
gcttgaagtc	tttaattaaa	tacaaaggat	atcaggtggc	ccccgctgaa	ttggaatcga	1680
tattgttaca	acaccccaac	atcttcgacg	cgggcgtggc	aggtcttccc	gacgatgacg	1740
ccggtgaact	tcccgcgcgc	gttg:tgttt	tggagcacgg	aaagacgatg	acggaaaaag	1800
agatcgtgga	ttacgtcgcc	agtcaagtaa	caaccgcgaa	aaagttgcgc	ggaggagtgt	1860
tgtttgtgga	cgaagtaccg	aaaggtctta	ccggaaaact	cgacgcaaga	aaaatcagag	1920
agatcctcat	aaaggccaag	aagggcggaa	agtcctcaat	gtaaaatgta	actgtattca	1980
gcgatgacga	aattcttagc	tattgtaata	ctgcgatgag	tggcagggcg	gggcgtaatt	2040
tttttaaggc	agttattggg	gccc:taaac	gcctgggtgc	tacgcctgaa	taagtataaa	2100
taagcggatg	aatggcagaa	attcgcggga	tctttgtgaa	ggaaccttac	ttctgtgggt	2160
tgacataatt	ggacaaacta	cctacagaga	tttaaagctc	taaggtaaat	ataaaatttt	2220
taagtgtata	atgtgttaaa	ctactgattc	taattgtttg	tgtattttag	attccaacct	2280
atggaactga	tgaatgggag	cagtgggtgga	atgcctttta	tgaggaaaac	ctgttttgct	2340
cagaagaaat	gccatctagt	gatgatgagg	ctactgctga	ctctcaacat	tctactctc	2400
caaaaaagaa	gagaaaggta	gaagacccca	aggactttcc	ttcagaattg	ctaagttttt	2460
tgagtcatgc	tgtgttttagt	aatagaactc	ttgcttgctt	tgctatttac	accacaaagg	2520
aaaaagctgc	actgctatac	aagaaaatta	tggaaaaata	ttctgtaacc	tttataagta	2580
ggcataacag	ttataatcat	aacatactgt	tttttcttac	tccacacagg	catagagtgt	2640
ctgctattaa	taactatgct	caaaaattgt	gtacctttag	ctttttaatt	tgtaaagggg	2700
ttaataagga	atatttgatg	tatagtgcct	tgactagaga	tcataatcag	ccataaccaca	2760

ES 2 641 271 T3

ttgtagagg ttttacttgc tttaaaaaac ctcccacacc tccccctgaa cctgaaacat 2820  
 aaaatgaatg caattgttgt tgttaacttg tttattgcag cttataatgg ttacaaataa 2880  
 agcaatagca tcacaaattt cacaaataaa gcattttttt cactgcattc tagttgtcgt 2940  
 ttgtccaaac tcatcaatgt atcttatgat gtctggatcc gtcgaccgat gccttgaga 3000  
 gccttcaacc cagtcagctc cttccggtgg ggcgggggca tgaatatcgt cgcgcactt 3060  
 atgactgtct tctttatcat gcaactcgtc ggacaggtgc cggcagcgtt cttccgcttc 3120  
 ctgcctcact gactcgtctc gctcggctgc tcggctgcgg cgaagcggat cagctcactc 3180  
 aaaggcggta atacggttat ccacagaatc aggggataac gcaggaaaga acatgtgagc 3240  
 aaaaggccag caaaaggcca ggaaccgtaa aaaggccggg ttgctggcgt ttttccatag 3300  
 gctccgcccc cctgacgagc atcacaaaaa tcgacgctca agtcagaggt ggcgaaacct 3360  
 gacaggacta taaagatacc aggcgtttcc ccctggaagc tcctcgtgc gctctcctgt 3420  
 tccgaacctg ccgcttaccg gatacctgtc cgcctttctc ccttcgggaa gcgtggcgt 3480  
 ttctcatagc tcacgctgta ggtatctcag ttcgggtgtag gtcgttcgct ccaagctggg 3540  
 ctgtgtgcac gaaccccccg ttcagcccca ccgctgcgcc ttatccggta actatcgtct 3600  
 tgagtccaac ccggtaaagc acgacttacc gccactggca gcagccactg gtaacaggat 3660  
 tagcagagcg aggtatgtag gcggtgtcac agagttcttg aagtgggtgg ctaactaccg 3720  
 clacactaga agaacaglat ttgglatctg cgtctcgtc aagccaglla ccttcggaaa 3780  
 aagagttggc agctcttgat ccggcaaaaa aaccaccgct ggtagcggtg gtttttttgt 3840  
 ttgcaagcag cagattaccg gcagaaaaaa aggatctcaa gaagatcctt tgatcttttc 3900  
 tacggggctc gacgctcagt ggaacgaaaa ctcaagttaa gggattttgg tcatgagatt 3960  
 atcaaaaagg atcttcacct agatcctttt aaattaaaaa tgaagtttta aatcaatcta 4020  
 aagtatata: gagtaaactt ggtctgacag ttaccaatgc ttaatcagtg aggcacctat 4080  
 ctcagcgatc tgtctattto gttcatccat agttgcctga ctccccgtcg tgtagataac 4140  
 tacgatacgg gagggcttac catctggccc cagtgetgca atgataccgc gagaccacg 4200  
 ctcaccggct ccagatttat cagcaataaa ccagccagcc ggaagggccg agcgcagaag 4260  
 tggctcctgca actttatccg cctccatcca gtctattaat tgttgccggg aagctagagt 4320  
 aagtagtctg ccagttaata gtttgcgcaa cgttgttgc attgctacag gcacgttgtt 4380  
 gtcacgctcg tcgtttggtc tggcttcact cagctccggt tcccacgat caagggcagt 4440  
 tacatgatcc cccatgttgt gcaaaaaagc ggtagctcc ttcggctctc cgatcgttgt 4500  
 cagaagtaag ttggccgcag tgttateact catggttatg gcagcactgc ataattctct 4560  
 tactgtcatg ccacccgtaa gatgcttttc tgtgactggt gagtactcaa ccaagtcatt 4620

ES 2 641 271 T3

ctgagaatag tgtatgcggc gaccgagttg ctcttgcccc gogtcaatac gggataatac 4680  
 cgcgccacat agcagaactt taaaagtgct catcattgga aaacgttctt cggggcgaaa 4740  
 actctcaagg atcttaccgc tgttgagatc cagttcgatg taaccacctc gtgcacccaa 4800  
 ctgatcttca gcatctttta ctttcaccag cgtttctggg tgagcaaaaa caggaaggca 4860  
 aatgcccga aaaaagggaa taagggcgac acggaaatgt tgaatactca tactcttctt 4920  
 ttttcaatat tattgaagca tttatcaggg ttattgtctc atgagcggat acatatttga 4980  
 atgtatttag aaaaataaac aaataggggt tccgcgcaca tttccccgaa aagtgccacc 5040  
 tgacgcgccc tgtagcggcg cattaagcgc ggcgggtgtg gtggttaecg gcagcgtgac 5100  
 cgctacactt gccagcgcgc tagcgcgcgc tctttctgct ttcttccctt cctttctcgc 5160  
 cacgttcgcc ggctttcccc gtcaagctct aaatcggggg ctccctttag ggttccgatt 5220  
 tagtgcttta cggcacctcg accccaaaaa acttgattag ggtgatggtt cacgtagtgg 5280  
 gccatcgccc tgatagacgg ttttctgccc tttgacgttg gagtccacgt tctttaatag 5340  
 tggactcttg ttccaaactg gaacaacact caaccctatc tcggtctatt cttttgattt 5400  
 ataagggatt ttgccgattt cggcctattg gttaaaaaat gagctgattt aacaaaaatt 5460  
 taacgcgaat tttacaaaa tattaacgct tacaatttgc cattcgccat tcaggctcgc 5520  
 caactggttg gaagggcgat cggtgccggc ctcttcgcta ttacgccagc ccaagctacc 5580  
 atgataagta agtaatatta aggtacgtgg aggttttact tgctttaaaa aacctccac 5640  
 acctccccct gaacctgaaa cataaaatga atgcaattgt tgttgttaac ttgtttattg 5700  
 cagcttataa tggttacaaa taaagcaata gcatcacaaa tttcacaaat aaagcatttt 5760  
 tttcactgca ttctagttgt ggtttgtcca aactcatcaa tgtatcttat ggtactgtaa 5820  
 ctgagctaac ataa 5834

<210> 5  
 <211> 5864  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

5

<220>  
 <223> sintético

10

<400> 5

cccgggaggt accgagctct taocgctgct agctcgagtc tggggacttt ccgctgggga 60  
 ctttccgctg gggactttcc gctggggact ttcgctggg gactttccgc agatctgcat 120  
 ctcaattagt cagcaaccat agtccccccc ctaactccgc ccaccccc cctaactccg 180  
 cccagttccg ccattctcc gccccatggc tgactaattt tttttattta tgcagaggcc 240

## ES 2 641 271 T3

gaggccgcct cggcctctga gctattccag aagtagtgag gaggcctttt tggaggccta	300
ggcttttgca aaaagcttgg cattccggta ctggttgtaa aatggaagac gccaaaaaca	360
taaagaaaag cccggcgcga ttctatcctc tagaggatgg aaccgctgga gaccaactgc	420
ataaggctat gaagagatac gccctggttc ctggaacaat tgcttttaca gatgcacata	480
tcgaggtgaa catcacgtac gcggaatact tcgaaatgtc cgttcggttg gcagaagcta	540
tgaaacgata tgggctgaat acaaatcaca gaatcgtcgt atgcagtgaa aactctcttc	600
aattctttat gccggtggtg ggcgcggttat ttatcggagt tgcagttgcg cccgcgaacg	660
acatttataa tgaacgtgaa ttgctcaaca gtatgaacat ttgcagcct accgtagtgt	720
ttgtttccaa aaagggggtg caaaaaattt tgaacgtgca aaaaaatta ccaataatcc	780
agaaaattat tatcatggat tctaaaacgg attaccaggg atttcagtcg atgtacacgt	840
tcgtcacatc tcatctacct cccggtttta atgaatacga ttttgtacca gagtcccttg	900
atcgtgacaa aacaattgca ctgataatga attcctctgg atctactggg ttacctaaag	960
gtgtggccct tccgcataga actgcctgcg tcagattctc gcagccaga gatcctattt	1020
ttggcaatca aatcattccg gatactgcga ttttaagtgt tgttccatto catcacggtt	1080
ttggaalgl llaclacactc ggatalllga talglggall tggaglcgic llaalglala	1140
gatttgaaga agagctgttt ttacgatccc ttcaggatta caaaattcaa agtgcggtgc	1200
tagtaccaac cctattttca ttcttcgcca aaagcactct gattgacaaa tacgatttat	1260
ctaatttaca cgaaattgct tctgggggcg cacctctttc gaaagaagtc ggggaagcgg	1320
ttgcaaaaacg cttccatctt ccagggatac gacaaggata tgggctcact gagactacat	1380
cagctattct gattacaccc gagggggatg ataaaccggg cgcggtcggg aaagttgttc	1440
cattttttga agcgaaggtt gtggatctgg ataccgggaa aacgctgggc gttaatcaga	1500
gaggcgaatt atgtgtcaga ggacctatga ttatgtccgg ttatgtaaac aatccggaag	1560
cgaccaacgc cttgattgac aaggatggat ggctacattc tggagacata gcttactggg	1620
acgaagacga acacttcttc atagttgacc gottgaagtc ttttaattaaa tacaaggat	1680
atcaggtggc ccccgctgaa ttggaatcga tattgttaca acacccaac atcttcgacg	1740
cgggcgtgqc aggtcttccc gacgatgacg ccggtgaact tcccgcgcgc gttgttqttt	1800
tggagcacgg aaagacgatg acggaaaaag agatcgtgga ttacgtcgcc agtcaagtaa	1860
caaccgcgaa aaagttgcgc ggaggagttg tgtttgtgga cgaagtaccg aaaggtotta	1920
ccggaaaact cgacgcaaga aaaatcagag agatcctcat aaaggccaag aagggcggaa	1980
agtccaaatt gtaaaatgta actgtattca gcgatgacga aattcttagc tattgtaata	2040
ctgcgatgag tggcagggcg gggcgtaatt tttttaaggc agttattggt gcccttaaac	2100

## ES 2 641 271 T3

gcctggttgc tacgcctgaa taagtgataa taagcggatg aatggcagaa attcgccgga 2160  
tctttgtgaa ggaaccttac ttctgtggtg tgacataatt ggacaaaacta cctacagaga 2220  
tttaaagctc taaggtaaat ataaaatfff taagtgtata atgtgtttaa ctactgattc 2280  
taattgtttg tgtattttag attccaacct atggaactga tgaatgggag cagtgggtga 2340  
algcclllaa lgaggaaaac clglilllgl clagaagaaal gccalclagl galgalgagg 2400  
ctactgctga ctctcaacat tetactctc caaaaaagaa gagaaaggta gaagacccca 2460  
aggactttcc ttcagaattg ctaagttfff tgagtcatgc tgtgtttagt aatagaactc 2520  
ttgcttgctt tgctatttac accacaaagg aaaaagctgc actgctatac aagaaaatta 2580  
tgaaaaaata ttctgtaacc ttataaagta ggcataacag ttataatcat aacatactgt 2640  
tttttcttac tccacacagg catagagtgt ctgctattaa taactatgct caaaaattgt 2700  
gtacctttag ctttttaatt tgtaaagggg ttaataagga atatttgatg tatagtgcct 2760  
tgactagaga tcataatcag ccataccaca tttgtagagg ttttacttgc tttaaaaaac 2820  
ctcccacacc tccccctgaa cctgaaacat aaaatgaatg caattgttgt tgttaacttg 2880  
tttattgcag cttataatgg ttacaaataa agcaatagca tcacaaattt cacaaataaa 2940  
gcattttfff cactgcattc tagttgtggt ttgtccaaac tcatcaatgt atcttatgat 3000  
gtctggatcc gtcgaccgat gcccttgaga gccctcaacc cagtcagctc cttccggtgg 3060  
gcgcggggca tgactatcgt cgcgcactt atgactgtct tctttatcat gcaactcgtc 3120  
ggacaggtgc cggcagcgtc cttccgctc ctgcctcact gactcgtcgc gctcggctgt 3180  
tcggctgcgg cgagcgggat cagctcactc aaaggcggta atacggttat ccacagaatc 3240  
aggggataac gcaggaaaga acatgtgagc aaaaggccag caaaaggcca ggaaccgtaa 3300  
aaaggccgcy ttgctggyt tttccatag gctccgccc cctgacgagc atcacaaaaa 3360  
tcgacgctca agtcagaggt ggcgaaaccg gacaggacta taaagatacc aggcgtttcc 3420  
ccctggaage tcctcgtgc gctctctgt tccgacctg ccgcttaccg gatacctgtc 3480  
cgcctttctc ctttcgggaa gcgtggcgtt ttctcatage tcacgctgta ggtatctcag 3540  
ttcgggtgtag gtcgttcgct ccaagctggg ctgctgtcac gaacccccg ttcagcccga 3600  
ccgctgcgcc ttatccggtc actatcgtct tgagtccaac ccggtaaagc acgacttatc 3660  
gccactggca gcagccactg gtaacaggat tagcagagcg aggtatgtag gcggtgctac 3720  
agagttcttg aagtgggtgc ctaactacgg ctacactaga agaacagtat ttggtatctg 3780  
cgtctgctg aagccagtta ccttcggaaa aagagttggt agctcttgat ccggcaaaaa 3840  
aaccaccgct ggtagcgggt gttttttgt ttgcaagcag cagattacgc gcagaaaaaa 3900

ES 2 641 271 T3

aggatctcaa gaagatcctt tgatcttttc taagggtct gacgctcagt ggaacgaaaa 3960  
 ctcacgttaa gggatitttg tcatgagatt atcaaaaagg atcttcacct agatcctttt 4020  
 aaattaaaaa tgaagtttta aatcaatcta aagtatatat gagtaaactt ggtctgacag 4080  
 ttaccaatgc ttaatcagtg aggcacctat ctacgcatc tgtctatttc gttcatccat 4140  
 agttgctga ctccccgtcg tgtagataac taagatacgg gagggcttac catctggccc 4200  
 cagtgtgca atgataccgc gagaccacg ctacccggt ccagatttat cagcaataaa 4260  
 ccagccagcc ggaagggccg agcgcagaag tggctctgca actttatccg cctccatcca 4320  
 gtctattaat tgttgccggg aagctagagt aagtagttcg ccagttaata gtttgccgaa 4380  
 cgttqtgccc attgctacag gcatcgtggt gtcacgctcg tcgtttggtg tgcttcatt 4440  
 cagclccggl lcccaacgat caaggcgagl lacalgalcc cccalglgl gcaaaaaagc 4500  
 ggtagctcc ttcggctctc cgatcgttgt cagaagtaag ttggccgag tgttatoact 4560  
 catggttatg gcagcactgc ataattctct tactgtcatg ccatccgtaa gatgcttttc 4620  
 tgtgactggt gagtactcaa ccaagtcatt ctgagaatag tgtatgcggc gaccgagttg 4680  
 ctcttgcgag gcgtaatac gggataatac cgcgccacat agcagaactt taaaagtgct 4740  
 catcattgga aaacgttctt cggggcgaaa actctcaagg atcttaccgc tgttgagatc 4800  
 cagttcgatg taacccaactc gtgcacccaa ctgatcttca gcatctttta ctttcaccag 4860  
 cgtttctggg tgagcaaaaa caggaaggca aatgcccga aaaaagggaa taagggcgac 4920  
 acggaaatgt tgaatactca tactcttctt ttttcaatat tattgaagca tttatcaggg 4980  
 ttattgtctc atgagcggat acatatttga atgtatttag aaaaataaac aataggggt 5040  
 tccgcgcaca tttccccgaa aagtgccacc tgacgcgccc tgtagcggcg cattaagcgc 5100  
 ggcgggtgtg gtggttacgc gcagcgtgac cgtacactt gccagcgcgc tagcgcgcgc 5160  
 tcctttcget ttcttccctt cctttctcgc caagttcgc ggctttccc gtcaagctct 5220  
 aaatcggggg ctcccttag ggttccgatt tagtgcttta cggcacctcg accccaaaaa 5280  
 acttgattag ggtgatggtt cacgtagtgg gccatgcgcc tgatagacgg tttttgcgcc 5340  
 tttgacgttg gagtccactt tctttaatag tggactcttg tccaaaactg gaacaacact 5400  
 caacctatc tcggtctatt cttttgattt ataagggatt ttgcccattt cggcctattg 5460  
 gttaaaaaat gagctgattt acaaaaaatt taacgcgaat ttttaacaaa tattaacgct 5520  
 tacaatttgc cattcgccat tcaggctgog caactgttgg gaagggcgat cggtgccggc 5580  
 ctcttcgcta ttaocccagc ccaagctacc atgataagta agtaatatta aggtacgtgg 5640  
 aggttttact tgctttaaaa aacctccac acctccccct gaacctgaaa cataaaatga 5700  
 atgcaattgt tgttgtaaac ttgtttattg cagcttataa tggttacaaa taaagcaata 5760

## ES 2 641 271 T3

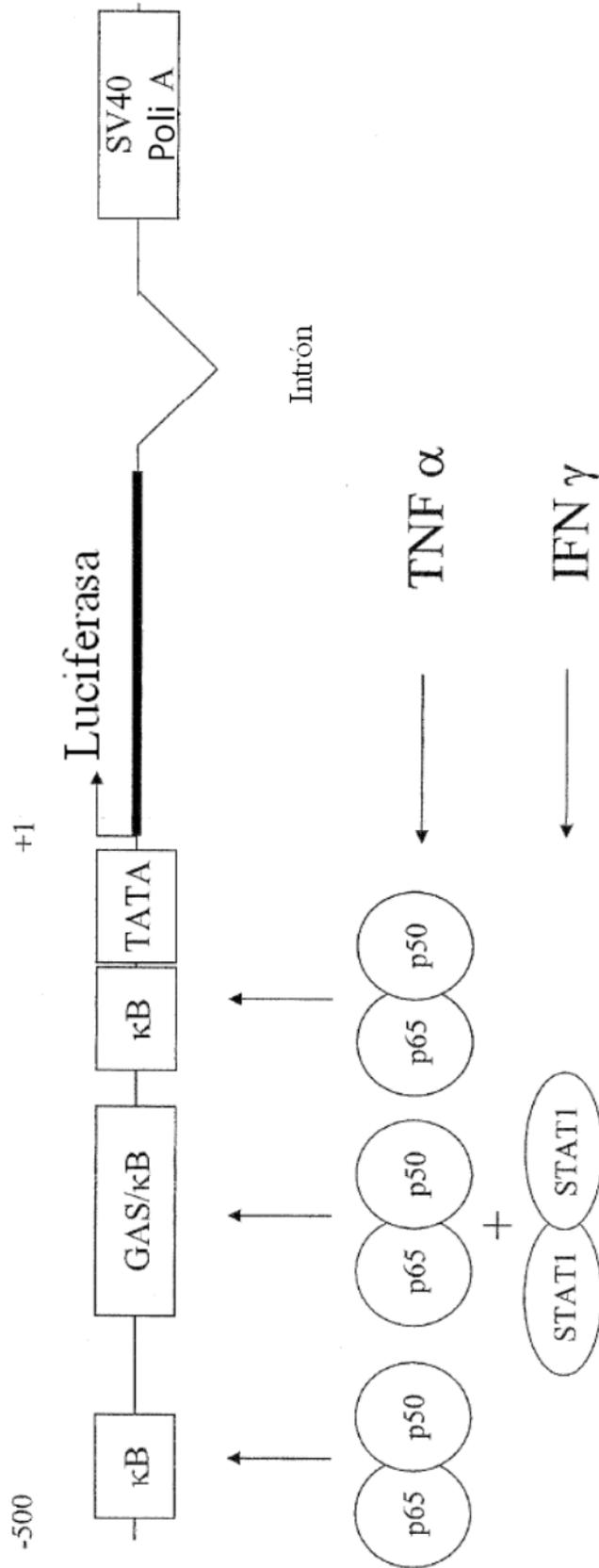
```
gcatcacaaa tttcacaaat aaagcatttt tttcactgca ttctagttgt ggtttgcca 5820  
aactcatcaa tgtatcctat ggtactgtaa ctgagctaac ataa 5864
```

**REIVINDICACIONES**

1. Una línea celular transformada establemente con una construcción de gen indicador que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un producto génico indicador unida operativamente a un elemento de control de la transcripción que se activa como parte de la ruta de transducción de la señal NF-κB iniciada por un receptor del TNF-α en respuesta al TNF-α como señal extracelular, en la que:
  - a) dicho elemento de control de la transcripción es un promotor sintético que comprende un promotor mínimo SV40 y SEQ ID NO: 2, que es específico para NF-κB, mientras que carece de sitios de unión para otros factores de transcripción; y
  - b) las células de dicha línea celular carecen de una o más moléculas de superficie celular, distintas del receptor de TNF-α, que se sabe que son activadoras principales de la ruta de transducción de la señal NF-κB que causarían de otra manera una interferencia con la señal extracelular del TNF-α cuando se utiliza la línea celular para determinar el nivel de TNF-α en un ensayo de gen indicador, en donde dicha una o más moléculas de superficie celular comprenden los receptores para IFNγ e IL2.
2. La línea celular de la reivindicación 1, en la que las células de dicha línea celular son tratadas con un agente anti-mitótico y pro-apoptótico y preferentemente están almacenadas congeladas para su uso futuro en un ensayo de gen indicador.
3. La línea celular de la reivindicación 1, en la que las señales principales que se sabe que activan la ruta de transducción de la señal NF-κB se seleccionan de entre el grupo que consiste en TNF-α, IFNγ, IL-2, IL-5 e IL-6.
4. La línea celular de la reivindicación 1, en la que las células de dicha línea celular existen de modo natural sin dicha segunda molécula de superficie celular.
5. La línea celular de la reivindicación 1, en la que las células de dicha línea celular han sido modificadas genéticamente para desactivar dicha segunda molécula de superficie celular.
6. La línea celular de la reivindicación 1, en la que al menos la parte extracelular de dicha primera molécula o complejo de superficie celular es de una primera especie animal y las células de dicha línea celular son células de una segunda especie animal que han sido modificadas genéticamente para introducir dicha primera molécula o complejo de superficie celular.
7. La línea celular de la reivindicación 1 en estado congelado, en donde dicha línea celular tiene la propiedad de que mantendrá la actividad de transducción de la señal de dicha ruta de transducción de la señal iniciada por dicha primera molécula o complejo de superficie celular durante al menos una hora después de haber sido descongelada pero que perderá dicha actividad de transducción de la señal y sufrirá la muerte celular en no más de aproximadamente 30 días a una temperatura superior a la de congelación tras ser descongelada.
8. Un kit para determinar la presencia y/o el nivel, en una muestra, de TNF-α como señal extracelular que activa la ruta de transducción de la señal de un receptor de TNF-α como molécula o complejo de superficie celular, que comprende:
  - un dispositivo de ensayo que tiene una pluralidad de pocillos; y
  - un reactivo que contiene una pluralidad de células de la línea celular de la reivindicación 1.
9. El kit de la reivindicación 8, en el que dicho dispositivo de ensayo es una placa de microtitulación.
10. El kit de la reivindicación 8, en el que dicho reactivo está dispuesto en los pocillos de dicho dispositivo de ensayo.
11. Un método para determinar el nivel, en una muestra, de TNF-α como señal extracelular que activa la ruta de transducción de la señal de un receptor de TNF-α como molécula o complejo de superficie celular, que comprende:
  - incubar las células de la línea celular de la reivindicación 1 con una muestra en la que se desea determinar el nivel de TNF-α que activa la actividad de transducción de la señal del receptor TNF-α; y
  - determinar el nivel de expresión del producto génico indicador en las células midiendo la actividad del producto génico indicador con respecto a una referencia entre la actividad del producto génico indicador y el TNF-α para determinar de esta manera el nivel, en la muestra, del TNF-α que activa la actividad de transducción de la señal del receptor de TNF-α.
12. El método de la reivindicación 11, en el que la determinación del nivel, en una muestra, de TNF-α indirectamente determina el nivel de un anticuerpo contra un antagonista del TNF-α estimando el título de neutralización del anticuerpo a partir del recíproco de la dilución de la muestra que da como resultado la detección de 1,0 ng/ml de TNF-α tras la incubación de la muestra con 10 ng/ml de TNF-α y una cantidad de antagonista de TNF-α suficiente

## ES 2 641 271 T3

para neutralizar 10 ng/ml de TNF- $\alpha$  (unidades neutralizantes de 10 ng).



**Fig. 1**

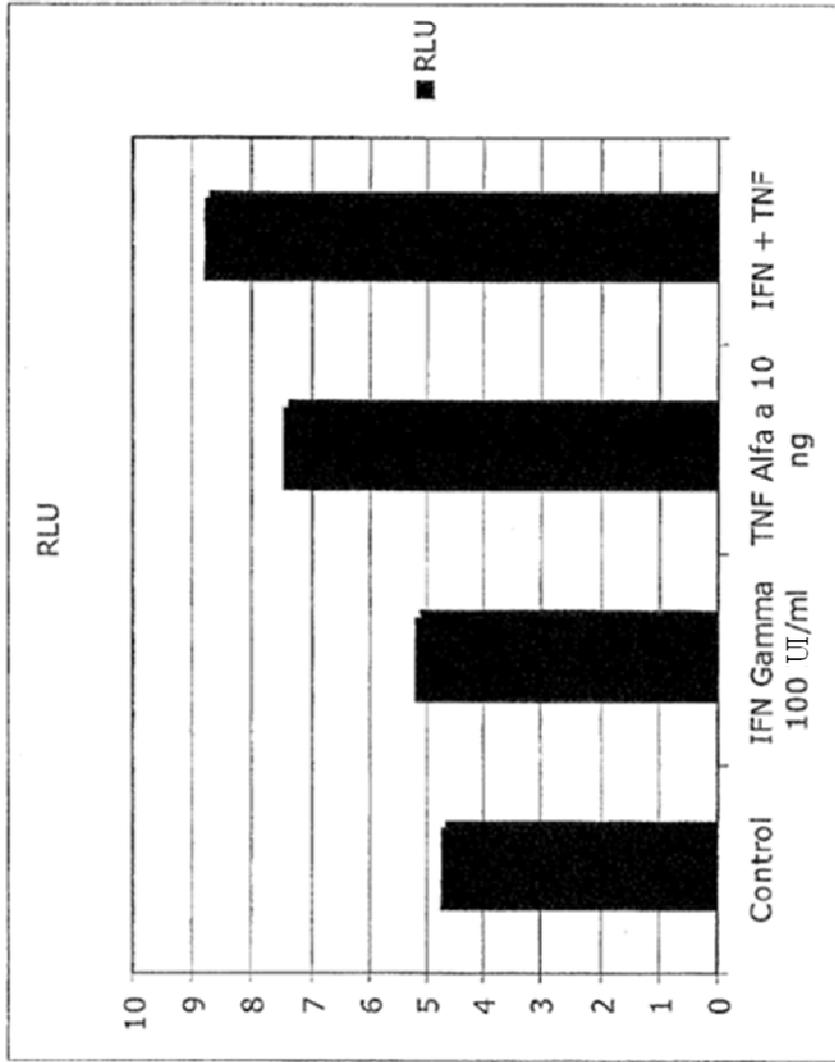


Fig. 2

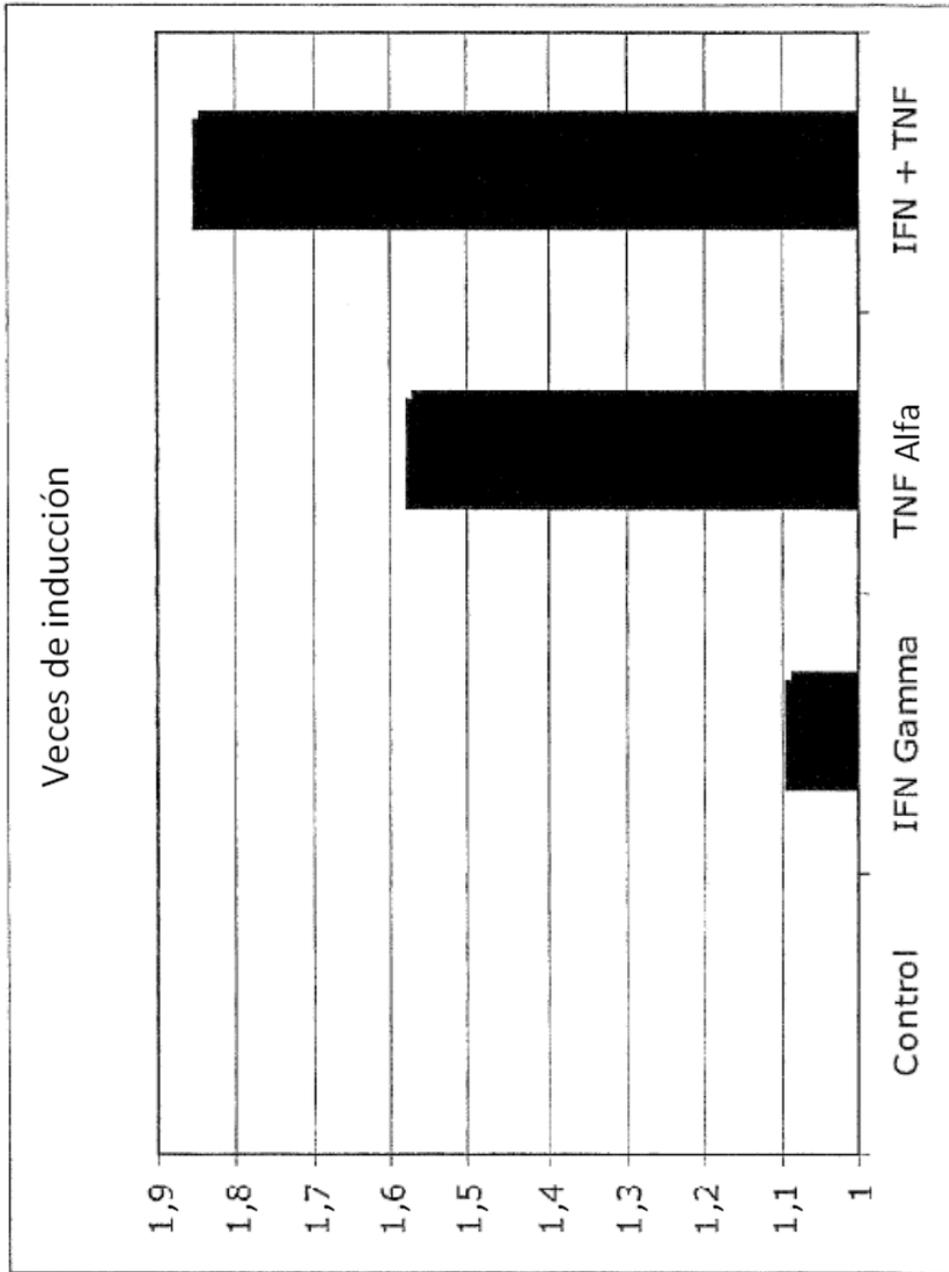


Fig. 3



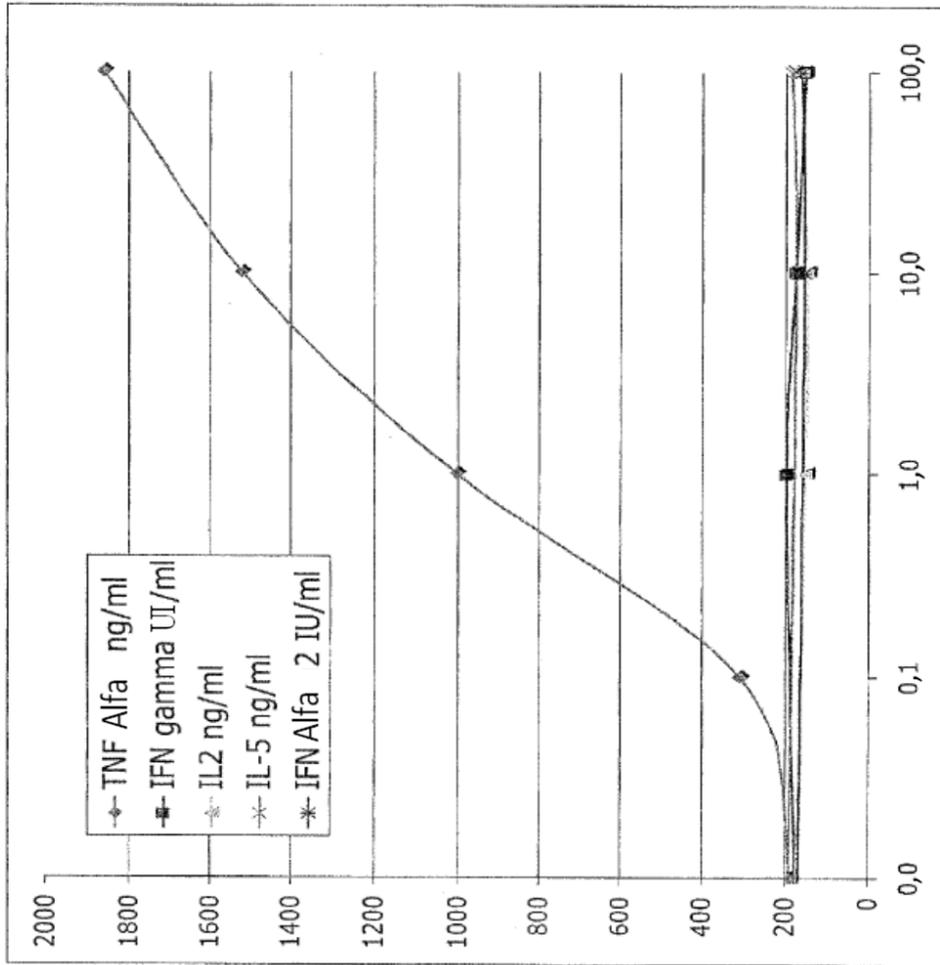


Fig. 5