

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 645 431**

51 Int. Cl.:

G01N 33/50 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.07.2013 PCT/EP2013/064400**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.01.2014 WO14006225**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.07.2013 E 13739169 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.06.2017 EP 2870475**

54 Título: **Polipéptido de fusión fluorescente, biosensor que comprende dicho polipéptido y usos de los mismos**

30 Prioridad:

06.07.2012 EP 12382272

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

05.12.2017

73 Titular/es:

**INNOVATIVE TECHNOLOGIES IN BIOLOGICAL SYSTEMS S.L. (100.0%)
Parque Tecnológico de Bizkaia, Edificio 502, 1º
48160 Derio, Bizkaia, ES**

72 Inventor/es:

**KORTAZAR ZABALA, DANIEL;
SALADO POGONZA, AIDA CLARISA;
GÁMIZ MATA, JORGE;
ROURA FERRER, MERITXELL;
MELLA LÓPEZ, ROSA y
VILLACÉ LOZANO, PATRICIA**

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 645 431 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

Polipéptido de fusión fluorescente, biosensor que comprende dicho polipéptido y usos de los mismos

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere al campo biotecnológico, particularmente a un polipéptido de fusión fluorescente, a un biosensor que comprende dicho polipéptido y usos de los mismos.

10 **Antecedentes de la invención**

La siguiente discusión de los antecedentes de la invención se proporciona meramente para ayudar al lector a comprender la invención, y no se admite que describa o constituya la técnica anterior de la presente invención.

15 El cribado de alto contenido (HCS) en sistemas basados en células usa células vivas como herramientas en la investigación biológica para dilucidar el funcionamiento de células normales y enfermas. También se usa HCS para descubrir y optimizar nuevos candidatos a fármaco.

20 El cribado de alto contenido es una combinación de biología celular moderna, con todas sus herramientas moleculares, con microscopía automatizada de alta resolución y manipulación robótica. Las células se exponen en primer lugar a reactivos químicos o de iARN. Entonces se detectan los cambios en la morfología celular usando análisis de imágenes. Los cambios en las cantidades de proteínas sintetizadas por células se miden usando una variedad de técnicas tales como las proteínas fluorescentes verdes fusionadas a proteínas endógenas, o mediante anticuerpos fluorescentes.

25 A nivel celular, la adquisición en paralelo de datos sobre diferentes propiedades celulares, por ejemplo la actividad de cascadas de transducción de señales y la integridad del citoesqueleto es la principal ventaja de este método en comparación con el cribado de alto rendimiento más rápido pero menos detallado. Aunque HCS es más lento, la riqueza de los datos adquiridos permite una comprensión más profunda de los efectos de los fármacos. En este sentido, uno de los objetivos de HCS en la adquisición de datos en relación con la actividad de cascadas de transducción de señales es determinar el efecto de diferentes fármacos en los procesos de señalización mediante la medición de los niveles intracelulares de segundos mensajeros.

35 Los segundos mensajeros son moléculas que transmiten señales desde receptores sobre la superficie celular hasta moléculas diana dentro de la célula, en el citoplasma o el núcleo. Transmiten las señales de hormonas como epinefrina (adrenalina), factores de crecimiento, y otros, y provocan algún tipo de cambio en la actividad de la célula. Amplifican en gran medida la fuerza de la señal. Los mensajeros secundarios son un componente de las cascadas de transducción de señales. Entre estos segundos mensajeros, el AMPc y el calcio proporcionan el paradigma para el concepto del segundo mensajero y se aprecian como moléculas intracelulares ubicuas y críticas que regulan muchos procesos clave en la célula.

40 Idealmente, dicha medición requiere herramientas de localización precisa, alto intervalo dinámico y tan poca perturbación de la fisiología celular como sea posible, que a su vez son capaces de monitorizar los niveles de segundos mensajeros *in vivo* usando un método de cribado de alto contenido.

45 Para esto, se han generado diversos biosensores fluorescentes basados en el cambio dinámico de las propiedades fluorescentes. En este sentido, estos tipos de biosensores se basan a menudo en un cambio en la transferencia de energía de resonancia fluorescente (FRET). FRET es el proceso por el cual la energía de un fluoróforo donador excitado se transfiere a un fluoróforo aceptor a través de acoplamiento dipolo-dipolo sin radiación. La eficiencia de esta transferencia de energía depende en gran medida de la distancia entremedias (por ejemplo <10 nm para CFP/YFP) y la orientación relativa del fluoróforo donador y aceptor. Sin embargo, los biosensores basados en FRET en el contexto de métodos de cribado de alto contenido requieren un equipo de detección de al menos cuatro filtros, dos para la excitación y dos para la emisión. Además, debido a la baja intensidad de la señal de detección, el alcance de la señal de detección y la sensibilidad de detección son bajos. Por último, el uso de más de una señal de emisión de fluorescencia requiere el uso de más algoritmos con el fin de analizar correctamente la señal final.

55 Por tanto, existe todavía la necesidad de desarrollar métodos o productos mejorados para la medición en tiempo real de la concentración segundos mensajeros dentro del entorno dinámico de la célula viva.

60 **Breve descripción de la invención**

Breve descripción de la invención

65 Un primer aspecto de la presente invención se refiere a un polipéptido de fusión fluorescente capaz de cambiar su localización dentro de la célula desde la membrana citoplasmática celular hasta las vesículas de retención, tras un aumento en la concentración de segundos mensajeros dentro del citoplasma celular, que comprende un péptido de

localización en la membrana, un péptido de unión a proteínas de transducción de segundos mensajeros, una señal de retención en el retículo y un péptido fluorescente en el que:

5 a. el péptido de localización en la membrana está situado en el extremo N-terminal del polipéptido de fusión fluorescente y está unido físicamente, opcionalmente a través de un ligador, al péptido fluorescente, que a su vez está unido físicamente, opcionalmente a través de un ligador, al péptido de unión a proteínas de transducción de segundos mensajeros; y

10 b. el péptido de unión a proteínas de transducción de segundos mensajeros está unido físicamente, opcionalmente a través de un ligador, a la señal de retención en el retículo, que a su vez está situada en el extremo C-terminal del polipéptido de fusión fluorescente;

y en el que el término "péptido de localización en la membrana" se pretende que signifique un péptido cuya localización intracelular natural está en la membrana plasmática.

15 En otra realización preferida del primer aspecto de la invención, el péptido de localización en la membrana es el dominio extracelular del receptor de interleucina 2 de SEQ ID NO 17 o una variante que es al menos el 90 % homóloga a esta secuencia a lo largo de toda la región basándose en la identidad de aminoácidos y la señal de retención en el retículo es un péptido seleccionado de la siguiente lista que consiste en KDEL, HDEL, KKXX, KXKXX y RXR, en los que X es cualquier aminoácido y en el que preferiblemente dicha señal de retención en el retículo es KDEL.

20 En una realización más preferida del primer aspecto de la invención, dicho péptido de unión a proteínas de transducción de segundos mensajeros es un péptido de unión a proteínas de transducción de AMPc, un péptido de unión a proteínas de transducción de calcio, un péptido de unión a proteínas de transducción de IP3, un péptido de unión a proteínas de transducción de GMPc o un péptido de unión a proteínas de transducción de diacilglicerol. Por tanto, en una realización preferida adicional de la invención, el polipéptido de fusión fluorescente del primer aspecto de la invención es capaz de cambiar su localización dentro de la célula desde la membrana citoplasmática celular hasta las vesículas de retención, tras un aumento en la concentración de un segundo mensajero seleccionado de la lista que consiste en calcio, AMPc, IP3, GMPc o diacilglicerol.

25 Un segundo aspecto de la invención se refiere a un polipéptido de fusión fluorescente capaz de cambiar su localización dentro de la célula desde la membrana citoplasmática celular hasta las vesículas de retención, tras un aumento en la concentración de calcio intracelular, que comprende un péptido de localización en la membrana, un péptido de unión a proteínas de transducción de segundos mensajeros que comprende una secuencia de unión a calmodulina, una señal de retención en el retículo y un péptido fluorescente en el que:

35 a. el péptido de localización en la membrana está situado en el extremo N-terminal del polipéptido de fusión fluorescente y está unido físicamente, opcionalmente a través de un ligador, al péptido fluorescente, que a su vez está unido físicamente, opcionalmente a través de un ligador, al péptido de unión a proteínas de transducción de segundos mensajeros que comprende la secuencia de unión a calmodulina; y

40 b. el péptido de unión a proteínas de transducción de segundos mensajeros está unido físicamente, opcionalmente a través de un ligador, a la señal de retención en el retículo, que a su vez está situada en el extremo C-terminal del polipéptido de fusión fluorescente;

y en el que el término "péptido de localización en la membrana" se pretende que signifique un péptido cuya localización intracelular natural está en la membrana plasmática.

50 En una realización preferida del segundo aspecto de la invención, la secuencia de unión a calmodulina se selecciona de la lista que consiste en SEQ ID NO 1 (MEKRRWKKNFIAVSAANRFKKISSSGAL), SEQ ID NO 2 (ASPWKSARLMVHTVATFNSI), SEQ ID NO 3 (AIGFKKLAEAVKFSKLMGQ), SEQ ID NO 4 (KKTFFKEVANAVKISASLMGT), SEQ ID NO 5 (GAVLKVLTGLPALISWIKR), SEQ ID NO 6 (RGGFRRIARLVGLREWAYR), SEQ ID NO 7 (GGRLALLRARKELAALAA) y SEQ ID NO 8 (AEGVRNIKSMWEKGNVFSSP) o una variante que es al menos el 90 % homóloga a cualquiera de estas secuencias a lo largo de toda la región basándose en la identidad de aminoácidos.

55 En una realización preferida adicional del segundo aspecto de la invención, la señal de retención en el retículo es un péptido seleccionado de la siguiente lista que consiste en KDEL, HDEL, KKXX, KXKXX y RXR, en los que X es cualquier aminoácido y en el que preferiblemente dicha señal de retención en el retículo es KDEL y/o el péptido de localización en la membrana es el dominio extracelular de interleucina 2 de SEQ ID NO 17 o una variante que es al menos el 90 % homóloga a cualquiera de estas secuencias a lo largo de toda la región basándose en la identidad de aminoácidos.

60 En otra realización preferida del segundo aspecto de la invención el péptido fluorescente se selecciona del grupo que consiste en GFP, YFP, turboGFP, tRFP y tRFP602.

En todavía una realización preferida adicional del segundo aspecto de la invención:

- 5 a. la secuencia de unión a calmodulina se selecciona de la lista que consiste en SEQ ID NO 1 (MEKRRWKKNFIAVSAANRFKKISSSGAL), SEQ ID NO 2 (ASPWKSARLMVHTVATFNSI), SEQ ID NO 3 (AIGFKKLAEAVKFSKLMGQ), SEQ ID NO 4 (KKTFFKEVANAVKISASLMGT), SEQ ID NO 5 (GAVLKVLTTGLPALISWIKR), SEQ ID NO 6 (RGGFRRIARLVGLREWAYR), SEQ ID NO 7 (GGRLALLRARLKELALEAA) y SEQ ID NO 8 (AEGVRNIKSMWEKGNVFSSP) o una variante que es al menos el 90 % homóloga a cualquiera de estas secuencias a lo largo de toda la región basándose en la identidad de aminoácidos;
- 10 b. el péptido de localización en la membrana es el dominio extracelular del receptor de interleucina 2 de SEQ ID NO 17 o una variante que es al menos el 90 % homóloga a esta secuencia a lo largo de toda la región basándose en la identidad de aminoácidos; y
- 15 c. la señal de retención en el retículo es un péptido seleccionado de la siguiente lista que consiste en KDEL, HDEL, KKXX, KXKXX y RXR, en los que X es cualquier aminoácido y en el que preferiblemente dicha señal de retención en el retículo es KDEL.

20 En todavía otra realización preferida de la invención, el polipéptido de fusión fluorescente de calcio comprende o consiste preferiblemente en SEQ ID NO 15.

25 Un tercer aspecto de la invención se refiere a un polipéptido de fusión fluorescente capaz de cambiar su localización dentro de la célula desde la membrana citoplasmática celular hasta las vesículas de retención, tras un aumento en la concentración de AMPc intracelular, que comprende un péptido de localización en la membrana, un péptido de unión a proteínas de transducción de segundos mensajeros que comprende una secuencia de unión a los dominios reguladores RI y RII de PKA, una señal de retención en el retículo y un péptido fluorescente en el que:

- 30 a. el péptido de localización en la membrana está situado en el extremo N-terminal del polipéptido de fusión fluorescente y está unido físicamente, opcionalmente a través de un ligador, al péptido fluorescente, que a su vez está unido físicamente, opcionalmente a través de un ligador, al péptido de unión a proteínas de transducción de segundos mensajeros; y
- 35 b. el péptido de unión a proteínas de transducción de segundos mensajeros está unido físicamente, opcionalmente a través de un ligador, a la señal de retención en el retículo, que a su vez está situada en el extremo C-terminal del polipéptido de fusión fluorescente;

40 y en el que el término "péptido de localización en la membrana" se pretende que signifique un péptido cuya localización intracelular natural está en la membrana plasmática.

45 En una realización preferida del tercer aspecto de la invención, la secuencia de unión a los dominios reguladores RI y RII de PKA se selecciona de la lista que consiste en SEQ ID NO 9 (DLIEEAASRIVDAVIEQVKAAGAY), SEQ ID NO 10 (VQGNTDEAQEELAWKIAKMIVSDVMQQ), SEQ ID NO 11 (VQGNTDEAQEELLWIKIAKMIVSDVMQQ), SEQ ID NO 12 (FEELAWKIAKMIWSDVFQQ), SEQ ID NO 13 (QIEYLAKQIVDNAIQQAK) y SEQ ID NO 14 (LEQYANQLADQIIKEATE) o una variante que es al menos el 90 % homóloga a cualquiera de estas secuencias a lo largo de toda la región basándose en la identidad de aminoácidos.

50 En una realización preferida adicional del tercer aspecto de la invención, la señal de retención en el retículo es un péptido seleccionado de la siguiente lista que consiste en KDEL, HDEL, KKXX, KXKXX y RXR, en los que X es cualquier aminoácido y en el que preferiblemente dicha señal de retención en el retículo es KDEL y/o el péptido de localización en la membrana es el dominio extracelular de interleucina 2 de SEQ ID NO 17 o una variante que es al menos el 90 % homóloga a cualquiera de estas secuencias a lo largo de toda la región basándose en la identidad de aminoácidos.

55 En otra realización preferida del tercer aspecto de la invención, el péptido fluorescente se selecciona del grupo que consiste en GFP, YFP, turboGFP, tRFP y tRFP602.

En todavía una realización preferida adicional del tercer aspecto de la invención:

- 60 a. la secuencia de unión a los dominios reguladores RI y RII de PKA se selecciona de la lista que consiste en SEQ ID NO 9 (DLIEEAASRIVDAVIEQVKAAGAY), SEQ ID NO 10 (VQGNTDEAQEELAWKIAKMIVSDVMQQ), SEQ ID NO 11 (VQGNTDEAQEELLWIKIAKMIVSDVMQQ), SEQ ID NO 12 (FEELAWKIAKMIWSDVFQQ), SEQ ID NO 13 (QIEYLAKQIVDNAIQQAK) y SEQ ID NO 14 (LEQYANQLADQIIKEATE) o una variante que es al menos el 90 % homóloga a cualquiera de estas secuencias a lo largo de toda la región basándose en la identidad de aminoácidos;
- 65

b. el péptido de localización en la membrana es el dominio extracelular del receptor de interleucina 2 de SEQ ID NO 17 o una variante que es al menos el 90 % homóloga a esta secuencia a lo largo de toda la región basándose en la identidad de aminoácidos; y

5 c. la señal de retención en el retículo es un péptido seleccionado de la siguiente lista que consiste en KDEL, HDEL, KKXX, KXKXX y RXR, en los que X es cualquier aminoácido y en el que preferiblemente la señal de retención en el retículo es KDEL.

10 En todavía otra realización preferida del tercer aspecto de la invención, el polipéptido de fusión fluorescente comprende o consiste preferiblemente en SEQ ID NO 16.

15 Un cuarto aspecto de la invención se refiere a un polipéptido de fusión fluorescente capaz de cambiar su localización dentro de la célula desde la membrana citoplasmática celular hasta las vesículas de retención, tras un aumento en la concentración de diacilglicerol intracelular, que comprende un péptido de localización en la membrana, un péptido de unión a proteínas de transducción de segundos mensajeros que comprende una secuencia de unión a PKC δ , una señal de retención en el retículo y un péptido fluorescente en el que:

20 a. el péptido de localización en la membrana está situado en el extremo N-terminal del polipéptido de fusión fluorescente y está unido físicamente, opcionalmente a través de un ligador, al péptido fluorescente, que a su vez está unido físicamente, opcionalmente a través de un ligador, al péptido de unión a proteínas de transducción de segundos mensajeros; y

25 b. el péptido de unión a proteínas de transducción de segundos mensajeros está unido físicamente, opcionalmente a través de un ligador, a la señal de retención en el retículo, que a su vez está situada en el extremo C-terminal del polipéptido de fusión fluorescente;

y en el que el término "péptido de localización en la membrana" se pretende que signifique un péptido cuya localización intracelular natural está en la membrana plasmática.

30 En una realización preferida del cuarto aspecto de la invención, la secuencia de unión a PKC δ es SEQ ID NO 19 (AARKRKGSFFYGG), o una variante que es al menos el 90 % homóloga a esta secuencia a lo largo de toda la región basándose en la identidad de aminoácidos.

35 En una realización preferida adicional del cuarto aspecto de la invención, la señal de retención en el retículo es un péptido seleccionado de la siguiente lista que consiste en KDEL, HDEL, KKXX, KXKXX y RXR, en los que X es cualquier aminoácido y en el que preferiblemente dicha señal de retención en el retículo es KDEL y/o el péptido de localización en la membrana es el dominio extracelular de interleucina 2 de SEQ ID NO 17 o una variante que es al menos el 90 % homóloga a esta secuencia a lo largo de toda la región basándose en la identidad de aminoácidos.

40 En otra realización preferida del cuarto aspecto de la invención, el péptido fluorescente se selecciona del grupo que consiste en GFP, YFP, turboGFP, tRFP y tRFP602.

En todavía una realización preferida adicional del cuarto aspecto de la invención:

45 a. la secuencia de unión a PKC δ es SEQ ID NO 19 (AARKRKGSFFYGG), o una variante que es al menos el 90 % homóloga a esta secuencia a lo largo de toda la región basándose en la identidad de aminoácidos;

50 b. el péptido de localización en la membrana es el dominio extracelular del receptor de interleucina 2 de SEQ ID NO 17 o una variante que es al menos el 90 % homóloga a esta secuencia a lo largo de toda la región basándose en la identidad de aminoácidos; y

55 c. la señal de retención en el retículo es un péptido seleccionado de la siguiente lista que consiste en KDEL, HDEL, KKXX, KXKXX y RXR, en los que X es cualquier aminoácido y en el que preferiblemente la señal de retención en el retículo es KDEL.

En todavía otra realización preferida del cuarto aspecto de la invención, el polipéptido de fusión fluorescente comprende SEQ ID NO 18.

60 Un quinto aspecto de la invención se refiere a una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de polinucleótido que codifica para un polipéptido tal como se define en cualquiera de los aspectos previos de la invención.

Un sexto aspecto de la invención se refiere a un biosensor que comprende el polipéptido de fusión tal como se define en los aspectos primero, segundo, tercero y cuarto de la invención.

65 Un séptimo aspecto de la invención se refiere a una célula que comprende el polipéptido de fusión fluorescente tal

como se define en cualquiera de los aspectos primero, segundo, tercero o cuarto de la invención o el biosensor tal como se define en el sexto aspecto de la invención, en el que preferiblemente dicha célula es la línea celular U2O2.

5 En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a varios usos *in vitro* del polipéptido de fusión fluorescente tal como se define en cualquiera de los aspectos primero, segundo, tercero o cuarto de la invención o del biosensor tal como se define en el sexto aspecto de la invención.

Breve descripción de los dibujos

10 Los dibujos adjuntos, que se incorporan en y constituyen parte de esta memoria descriptiva, ilustran varias realizaciones y junto con la descripción ilustran las composiciones y los métodos divulgados.

15 Figura 1. Representación esquemática del modelo de localización celular de biosensor fluorescente. El biosensor fluorescente cambia su localización dentro de la célula desde la membrana citoplasmática celular hasta las vesículas, tras un aumento en la concentración de segundos mensajeros dentro del citoplasma celular.

20 Figura 2. Determinación de segundos mensajeros usando el biosensor fluorescente. Un aumento en la concentración de segundos mensajeros promueve una redistribución del biosensor fluorescente. El cambio en la fluorescencia celular se calculó como un incremento de la granularidad de estas células. Se obtuvieron estos mismos resultados con tres clones diferentes de las líneas celulares anteriores tal como se ilustra en esta figura que proporciona una prueba de la reproducibilidad de estos resultados correspondientes a tres clones que contienen el biosensor de calcio (gráfico de la izquierda) o tres clones que contienen el biosensor de AMPc (gráfico de la derecha).

25 Figura 3. Distribución celular de células estimuladas con biosensor de calcio. Se estimularon U2OS, que expresaban de manera estable el receptor de neurocinina humano 1 y biosensor de calcio fluorescente, con 10 μM de agonista de sustancia P durante 6 horas. Tras el tratamiento, el biosensor fluorescente se internalizó en vesículas en el citosol. Se determinó la actividad del receptor de neurocinina humano 1 midiendo la generación de la vesícula usando algoritmos de análisis de imágenes.

30 Figura 4. Curva de respuesta a la concentración para la sustancia P en la línea celular con receptor de neurocinina 1 - biosensor de calcio. Se trataron las células con series de dilución de 10 log (n=4). La CE50 para la sustancia P fue de $\sim 9,5 \times 10^{-12}$ M tras un tratamiento de 6 h con agonista. Se fijaron las células y se tiñeron los núcleos con DAPI. Se calculó el % de actividad en relación al positivo (10 μM). Se validó el ensayo de internalización con un promedio de $Z'=0,85 \pm 0,01$ para el cribado de alto contenido.

35 Figura 5. Distribución celular de células estimuladas con biosensor de AMPc. Se estimularon U2OS que expresaban de manera estable el receptor adrenérgico beta 2 humano y biosensor de AMPc fluorescente con 10 μM de agonista de isoproterenol durante 36 horas. Tras el tratamiento, el biosensor fluorescente se internalizó en vesículas en el citosol. Se determinó la actividad de receptor adrenérgico beta 2 humano midiendo la generación de la vesícula usando algoritmos de análisis de imágenes.

40 Figura 6. Curva de respuesta a la concentración para isoproterenol en la línea celular con receptor adrenérgico beta 2 - biosensor de AMPc. Se trataron las células con series de dilución de 6 log (n=4). La CE50 para el isoproterenol fue de $2,3 \times 10^{-7}$ M tras un tratamiento de 36 h con agonista. Se fijaron las células y se tiñeron los núcleos con DAPI. Se calculó el % de actividad en relación al positivo (10 μM). Se validó el ensayo de internalización con un promedio de $Z'=0,7 \pm 0,01$ para el cribado de alto contenido.

45 Figura 7. Distribución celular de células estimuladas con biosensor de DAG. Se estimularon U2OS que expresaban de manera estable el biosensor de DAG fluorescente con 25 ng/ml de PMA durante 4 horas. Tras el tratamiento, el biosensor fluorescente se internalizó en vesículas en el citosol. Se determinó la actividad del biosensor de DAG midiendo la generación de la vesícula usando algoritmos de análisis de imágenes.

50 Figura 8. Curva de respuesta a la concentración para la línea celular con biosensor de DAG. Se trataron las células con series de dilución de 9 log (n=4). La CE50 para el isoproterenol fue de $2,89 \times 10^{-4}$ ng/ml tras un tratamiento de 4 h con DAG. Se fijaron las células y se tiñeron los núcleos con DAPI. Se calculó el % de actividad en relación al positivo (50 ng/ml). Se validó el ensayo de internalización con un promedio de $Z'=0,76 \pm 0,01$ para el cribado de alto contenido.

60 Descripción de la invención

A menos que se especifique expresamente lo contrario, el término “que comprende” se usa en el contexto del presente documento para indicar que pueden estar presentes opcionalmente elementos adicionales además de los elementos de la lista introducidos por “que comprende”. Sin embargo, se contempla como una realización específica de la presente invención que el término “que comprende” abarque la posibilidad de que no estén presentes elementos adicionales, es decir, para el fin de esta realización “que comprende” ha de entenderse como que tiene el

significado de “que consiste en”.

Definiciones

5 En el contexto de la presente invención, el término “polipéptido de fusión” se refiere a un polipéptido híbrido que comprende una combinación de al menos cuatro péptidos de diferentes proteínas que se combinan en la misma estructura de polipéptido.

10 En el contexto de la presente invención, el término “péptido de localización en la membrana” se pretende que signifique un péptido cuya localización intracelular natural está en la membrana plasmática.

15 Tal como se usa en el presente documento, el término “péptido de unión a proteínas de transducción” se pretende que signifique un péptido que es capaz de unirse a una proteína de transducción en una conformación específica. Por tanto, este péptido es capaz de unirse a la proteína de transducción solo cuando esta proteína de transducción está interactuando con un segundo mensajero (AMPC, Ca2+, IP3, GMPc, diacilglicerol...).

20 Tal como se usa en el presente documento, el término “señal de retención en el retículo” se pretende que signifique una cadena peptídica corta que dirige el transporte del polipéptido al retículo endoplasmático y a través de la vía secretora que confiere de ese modo una localización multivesicular.

Tal como se usa en el presente documento, el término “péptido fluorescente” se pretende que signifique un péptido fluorescente que tiene capacidades fluorescentes. Los dominios de péptido fluorescente se caracterizan por tener un espectro de excitación y espectro de emisión específicos.

25 En el contexto de la presente invención, el ligador tiene al menos un residuo de aminoácido, preferiblemente al menos dos residuos de aminoácido consecutivos.

30 Tal como se usa en el presente documento, el término “biosensor” se pretende que signifique una herramienta o entidad molecular que es sensible a, y puede responder a, un estímulo físico o químico y transmitir información sobre el estado celular.

Tal como se usa en el presente documento, el término “fármaco” se pretende que signifique una molécula que actúa potencialmente como agonista o antagonista o modulador de una vía de señalización.

35 Tal como se usa en el presente documento “línea celular estable” se pretende que signifique una línea celular que se ha transfectado o infectado con un fragmento exógeno de ADN que se ha incorporado por sí mismo en el genoma de la célula.

40 Tal como se usa en el presente documento “secuencia de unión a calmodulina” se pretende que signifique la secuencia de aminoácidos correspondiente al dominio de unión a calmodulina de la cinasa de cadena ligera de miosina del músculo esquelético. Esta secuencia está incluida en la subclase 1-8-14 básica del motivo de unión a calmodulina 1-14. La secuencia consenso de la 1-8-14 básica es (RK)(RK)(RK)(FILVW)xxxxx(FILVW)xxxxx(FILVW). Estos tipos de secuencias pueden encontrarse fácilmente en la base de datos de uniones a calmodulina (<http://calcium.uhnres.utoronto.ca/ctdb/ctdb/home.html>).

45 Tal como se usa en el presente documento “secuencia de unión a los dominios reguladores RI y RII de PKA” se pretende que signifique la secuencia de aminoácidos conservada que está presente en la familia de proteínas de anclaje a cinasa A (AKAP) y cuya función principal es unirse al dominio regulador (RI o RII) de la proteína cinasa A (PKA).

50 Tal como se usa en el presente documento “HT31” es el péptido derivado de la proteína de anclaje a cinasa A de tiroides humana (AKAP) que puede destruir el anclaje de la cinasa A (tras la activación mediante señal de AMPC) compitiendo con AKAP. HT31 se une a los dos dominios reguladores (RI y RII) de la proteína cinasa A, pero su afinidad por estos dominios es: baja para el dominio RI y alta para el dominio RII.

55 Tal como se usa en el presente documento “secuencia de unión a PKCdelta” se pretende que signifique la secuencia de aminoácidos correspondiente a un péptido soluble sintético que se une específicamente a PKCdelta y no a otras PKC. Estos tipos de secuencias pueden encontrarse fácilmente en la base de datos de PKCLab (http://www.pkclab.org/PKC/link/sustrate_specificity.htm).

Descripción detallada de la invención

60 La presente invención afronta el problema de proporcionar herramientas de localización precisa, alto intervalo dinámico y tan poca perturbación de la fisiología celular como sea posible que sean capaces de monitorizar una variación en los niveles de concentración intracelular de segundos mensajeros *in vivo* usando cribado de alto contenido (HCS) en sistemas basados en células, en los que estas herramientas no tienen las desventajas de

biosensores basados en FRET.

Con el fin de solucionar el problema anterior, los autores de la presente invención diseñaron un nuevo polipéptido de fusión fluorescente que comprende un péptido de localización en la membrana, un péptido fluorescente, un péptido de unión a proteínas de transducción de segundos mensajeros y una señal de retención en el retículo. Este biosensor está formado por dos péptidos dirigidos a dos compartimentos celulares diferentes, permitiendo la medición de la concentración de segundos mensajeros monitorizando la distribución del polipéptido fluorescente dentro del citoplasma celular. En este sentido, la translocación del biosensor dentro de la célula se debe a un cambio en su conformación tridimensional que oculta o expone las señales de localización en ambos extremos del polipéptido desencadenado por la unión de la proteína de transducción al péptido de unión a proteínas de transducción de segundos mensajeros. En el estado basal, el biosensor está situado en uno de los compartimentos; esto significa que el péptido de localización dirigido al otro compartimento celular está oculto por la conformación tridimensional. Cuando la concentración del segundo mensajero aumenta debido a una estimulación celular, estos segundos mensajeros se unen a la proteína de transducción que se vuelve activa. La proteína de transducción activa es capaz de unirse al péptido de unión a proteínas de transducción en el biosensor provocando un cambio conformacional. En este momento, se modifica la distribución espacial de los diferentes elementos estructurales en el biosensor y se expone el péptido de localización dirigido al otro compartimento celular por la nueva conformación tridimensional de modo que todo el biosensor se transporta a su nueva localización en el nuevo compartimento celular. Todo este proceso puede rastrearse en células vivas debido a la presencia de la proteína fluorescente en el biosensor. Puede visualizarse una vista esquemática del proceso en la representación esquemática mostrada en la figura 1.

Sin embargo, los autores de la presente invención se dieron cuenta de que el orden de los péptidos dentro del polipéptido de fusión fluorescente mencionado anteriormente no podría colocarse arbitrariamente dentro del polipéptido. Este es el caso puesto que después de numerosos experimentos, los autores concluyeron que solo una combinación de elementos proporcionó el efecto técnico de transporte del biosensor al otro compartimento celular, tal combinación fue:

a. el péptido de localización en la membrana debe situarse en el extremo N-terminal del polipéptido de fusión fluorescente y debe estar unido físicamente, opcionalmente a través de un ligador, al péptido fluorescente, que a su vez debe estar unido físicamente, opcionalmente a través de un ligador, al péptido de unión a proteínas de transducción de segundos mensajeros; y

b. el péptido de unión a proteínas de transducción de segundos mensajeros debe estar unido físicamente, opcionalmente a través de un ligador, a la señal de retención en el retículo, que a su vez debe estar situada en el extremo C-terminal del polipéptido de fusión fluorescente;

y en el que el término “péptido de localización en la membrana” se pretende que signifique un péptido cuya localización intracelular natural está en la membrana plasmática.

Los autores sometieron a prueba si tal biosensor que tiene la estructura anterior podría emplearse para detectar y cuantificar diferentes tipos de segundos mensajeros. Tal como se ilustra en ejemplos 1-3 divulgados en el presente documento, los autores de la presente invención construyeron tres polipéptidos de fusión fluorescentes diferentes, comprendiendo todos ellos el dominio extracelular del receptor de interleucina 2 de SEQ ID NO 17 como péptido de localización en la membrana, el péptido KDEL como señal de retención en el retículo y turboGFP como péptido fluorescente. Por tanto, la única diferencia entre estos polipéptidos de fusión fluorescentes se encontraba en el tipo de péptido de unión a proteínas de transducción de segundos mensajeros usado. En este sentido, en el caso del biosensor de calcio del ejemplo 1 los autores usaron un péptido de unión a proteínas de transducción de segundos mensajeros que comprendía un dominio de unión a calmodulina, en el caso del biosensor de AMPc del ejemplo 2 los autores usaron un péptido de unión a proteínas de transducción de segundos mensajeros que comprendía un dominio de unión a proteína cinasa A (PKA) de la proteína de anclaje a cinasa A (AKAP) y en el caso del biosensor de diacilglicerol del ejemplo 3 los autores usaron un péptido de unión a proteínas de transducción de segundos mensajeros que comprendía el dominio de unión de SEQ ID NO 19.

De manera sorprendente, los resultados mostrados en los ejemplos y dibujos presentados en el presente documento usando los polipéptidos de fusión anteriores de los ejemplos 1-3 indicaron que un aumento en la concentración del segundo mensajero indujo un cambio conformacional en el biosensor que promovió una redistribución del biosensor fluorescente. Se calculó la actividad en los tres casos como un incremento de la granularidad de las células transfectadas con los biosensores de la invención. La redistribución de fluorescencia del biosensor se detectó mediante fluorescencia usando algoritmos de análisis de imágenes. Por consiguiente, las variaciones en las concentraciones de segundos mensajeros pueden monitorizarse a través de este proceso de “ocultación y exposición” de las señales de localización y la localización final del biosensor.

Por tanto, un primer aspecto de la presente invención se refiere a un polipéptido de fusión fluorescente capaz de cambiar su localización dentro la célula desde la membrana citoplasmática celular hasta las vesículas de retención, tras un aumento en la concentración de segundos mensajeros dentro del citoplasma celular, que comprende un

péptido de localización en la membrana, un péptido de unión a proteínas de transducción de segundos mensajeros, una señal de retención en el retículo y un péptido fluorescente en el que:

5 a. el péptido de localización en la membrana está situado en el extremo N-terminal del polipéptido de fusión fluorescente y está unido físicamente, opcionalmente a través de un ligador, al péptido fluorescente, que a su vez está unido físicamente, opcionalmente a través de un ligador, al péptido de unión a proteínas de transducción de segundos mensajeros; y

10 b. el péptido de unión a proteínas de transducción de segundos mensajeros está unido físicamente, opcionalmente a través de un ligador, a la señal de retención en el retículo, que a su vez está situada en el extremo C-terminal del polipéptido de fusión fluorescente;

y en el que el término "péptido de localización en la membrana" se pretende que signifique un péptido cuya localización intracelular natural está en la membrana plasmática.

15 En otra realización preferida del primer aspecto de la invención, el péptido de localización en la membrana es el dominio extracelular del receptor de interleucina 2 de SEQ ID NO 17 o una variante que es al menos el 90 % homóloga a esta secuencia a lo largo de toda la región basándose en la identidad de aminoácidos y la señal de retención en el retículo es un péptido seleccionado de la siguiente lista que consiste en KDEL, HDEL, KKXX, KXKXX y RXR, en los que X es cualquier aminoácido y en el que preferiblemente dicha señal de retención en el retículo es KDEL.

20 En una realización más preferida del primer aspecto de la invención, dicho péptido de unión a proteínas de transducción de segundos mensajeros es un péptido de unión a proteínas de transducción de AMPc, un péptido de unión a proteínas de transducción de calcio, un péptido de unión a proteínas de transducción de IP3, un péptido de unión a proteínas de transducción de GMPc o un péptido de unión a proteínas de transducción de diacilglicerol. Por tanto en una realización preferida adicional de la invención, el polipéptido de fusión fluorescente del primer aspecto de la invención es capaz de cambiar su localización dentro de la célula desde la membrana citoplasmática celular hasta las vesículas de retención, tras un aumento en la concentración de un segundo mensajero seleccionado de la lista que consiste en calcio, AMPc, IP3, GMPc o diacilglicerol.

25 Un segundo aspecto de la invención se refiere a un polipéptido de fusión fluorescente capaz de cambiar su localización dentro de la célula desde la membrana citoplasmática celular hasta las vesículas de retención, tras un aumento en la concentración de calcio intracelular, que comprende un péptido de localización en la membrana, un péptido de unión a proteínas de transducción de segundos mensajeros que comprende una secuencia de unión a calmodulina, una señal de retención en el retículo y un péptido fluorescente en el que:

35 a. el péptido de localización en la membrana está situado en el extremo N-terminal del polipéptido de fusión fluorescente y está unido físicamente, opcionalmente a través de un ligador, al péptido fluorescente, que a su vez está unido físicamente, opcionalmente a través de un ligador, al péptido de unión a proteínas de transducción de segundos mensajeros que comprende la secuencia de unión a calmodulina; y

40 b. el péptido de unión a proteínas de transducción de segundos mensajeros está unido físicamente, opcionalmente a través de un ligador, a la señal de retención en el retículo, que a su vez está situada en el extremo C-terminal del polipéptido de fusión fluorescente;

y en el que el término "péptido de localización en la membrana" se pretende que signifique un péptido cuya localización intracelular natural está en la membrana plasmática.

50 En una realización preferida del segundo aspecto de la invención, la secuencia de unión a calmodulina se selecciona de la lista que consiste en SEQ ID NO 1 (MEKRRWKKNFIAVSAANRFKIKSSSGAL), SEQ ID NO 2 (ASPWKSARLMVHTVATFNSI), SEQ ID NO 3 (AIGFKKLAEAVKFSKLMGQ), SEQ ID NO 4 (KKTFKEVANAVKISASLMGT), SEQ ID NO 5 (GAVLKVLTGLPALISWIKR), SEQ ID NO 6 (RGGFRRIARLVGLREWAYR), SEQ ID NO 7 (GGRLALLRARKELAALAA) y SEQ ID NO 8 (AEGVRNIKSMWEKGNVFSSP) o una variante que es al menos el 90 % homóloga a cualquiera de estas secuencias a lo largo de toda la región basándose en la identidad de aminoácidos.

55 En una realización preferida adicional del segundo aspecto de la invención, la señal de retención en el retículo es un péptido seleccionado de la siguiente lista que consiste en KDEL, HDEL, KKXX, KXKXX y RXR, en los que X es cualquier aminoácido y en el que preferiblemente dicha señal de retención en el retículo es KDEL y/o el péptido de localización en la membrana es el dominio extracelular de interleucina 2 de SEQ ID NO 17 o una variante que es al menos el 90 % homóloga a cualquiera de estas secuencias a lo largo de toda la región basándose en la identidad de aminoácidos.

60 En otra realización preferida del segundo aspecto de la invención el péptido fluorescente se selecciona del grupo que consiste en GFP, YFP, turboGFP, tRFP y tRFP602.

En todavía una realización preferida adicional del segundo aspecto de la invención:

- 5 a. la secuencia de unión a calmodulina se selecciona de la lista que consiste en SEQ ID NO 1 (MEKRRWKKNFIAVSAANRFKKISSSGAL), SEQ ID NO 2 (ASPWKSARLMVHTVATFNSI), SEQ ID NO 3 (AIGFKKLAEAVKFSAKLMGQ), SEQ ID NO 4 (KKTFFKEVANAVKISASLMGT), SEQ ID NO 5 (GAVLKVLTTGLPALISWIKR), SEQ ID NO 6 (RGGFRRIARLVGLREWAYR), SEQ ID NO 7 (GGRLALLRARLKELALEAA) y SEQ ID NO 8 (AEGVRNIKSMWEKGNVFSSP) o una variante que es al menos el 90 % homóloga a cualquiera de estas secuencias a lo largo de toda la región basándose en la identidad de aminoácidos;
- 10 b. el péptido de localización en la membrana es el dominio extracelular del receptor de interleucina 2 de SEQ ID NO 17 o una variante que es al menos el 90 % homóloga a esta secuencia a lo largo de toda la región basándose en la identidad de aminoácidos; y
- 15 c. la señal de retención en el retículo es un péptido seleccionado de la siguiente lista que consiste en KDEL, HDEL, KKXX, KXKXX y RXR, en los que X es cualquier aminoácido y en el que preferiblemente dicha señal de retención en el retículo es KDEL.

20 En todavía otra realización preferida de la invención, el polipéptido de fusión fluorescente comprende o consiste preferiblemente en SEQ ID NO 15.

25 Un tercer aspecto de la invención se refiere a un polipéptido de fusión fluorescente capaz de cambiar su localización dentro de la célula desde la membrana citoplasmática celular hasta las vesículas de retención, tras un aumento en la concentración de AMPc intracelular, que comprende un péptido de localización en la membrana, un péptido de unión a proteínas de transducción de segundos mensajeros que comprende una secuencia de unión a los dominios reguladores RI y RII de PKA, una señal de retención en el retículo y un péptido fluorescente en el que:

- 30 a. el péptido de localización en la membrana está situado en el extremo N-terminal del polipéptido de fusión fluorescente y está unido físicamente, opcionalmente a través de un ligador, al péptido fluorescente, que a su vez está unido físicamente, opcionalmente a través de un ligador, al péptido de unión a proteínas de transducción de segundos mensajeros; y
- 35 b. el péptido de unión a proteínas de transducción de segundos mensajeros está unido físicamente, opcionalmente a través de un ligador, a la señal de retención en el retículo, que a su vez está situada en el extremo C-terminal del polipéptido de fusión fluorescente;

40 y en el que el término "péptido de localización en la membrana" se pretende que signifique un péptido cuya localización intracelular natural está en la membrana plasmática.

45 En una realización preferida del tercer aspecto de la invención, la secuencia de unión a los dominios reguladores RI y RII de PKA se selecciona de la lista que consiste en SEQ ID NO 9 (DLIEEAASRIVDAVIEQVKAAGAY), SEQ ID NO 10 (VQGNTDEAQEELAWKIAKMIVSDVMQQ), SEQ ID NO 11 (VQGNTDEAQEELLWIKIAKMIVSDVMQQ), SEQ ID NO 12 (FEELAWKIAKMIWSDVFQQ), SEQ ID NO 13 (QIEYLAKQIVDNAIQQAK) y SEQ ID NO 14 (LEQYANQLADQIIKEATE) o una variante que es al menos el 90 % homóloga a cualquiera de estas secuencias a lo largo de toda la región basándose en la identidad de aminoácidos.

50 En una realización preferida adicional del tercer aspecto de la invención, la señal de retención en el retículo es un péptido seleccionado de la siguiente lista que consiste en KDEL, HDEL, KKXX, KXKXX y RXR, en los que X es cualquier aminoácido y en el que preferiblemente dicha señal de retención en el retículo es KDEL y/o el péptido de localización en la membrana es el dominio extracelular de interleucina 2 de SEQ ID NO 17 o una variante que es al menos el 90 % homóloga a cualquiera de estas secuencias a lo largo de toda la región basándose en la identidad de aminoácidos.

55 En otra realización preferida del tercer aspecto de la invención, el péptido fluorescente se selecciona del grupo que consiste en GFP, YFP, turboGFP, tRFP y tRFP602.

En todavía una realización preferida adicional del tercer aspecto de la invención:

- 60 a. la secuencia de unión a los dominios reguladores RI y RII de PKA se selecciona de la lista que consiste en SEQ ID NO 9 (DLIEEAASRIVDAVIEQVKAAGAY), SEQ ID NO 10 (VQGNTDEAQEELAWKIAKMIVSDVMQQ), SEQ ID NO 11 (VQGNTDEAQEELLWIKIAKMIVSDVMQQ), SEQ ID NO 12 (FEELAWKIAKMIWSDVFQQ), SEQ ID NO 13 (QIEYLAKQIVDNAIQQAK) y SEQ ID NO 14 (LEQYANQLADQIIKEATE) o una variante que es al menos el 90 % homóloga a cualquiera de estas secuencias a lo largo de toda la región basándose en la identidad de aminoácidos;
- 65

b. el péptido de localización en la membrana es el dominio extracelular del receptor de interleucina 2 de SEQ ID NO 17 o una variante que es al menos el 90 % homóloga a esta secuencia a lo largo de toda la región basándose en la identidad de aminoácidos; y

5 c. la señal de retención en el retículo es un péptido seleccionado de la siguiente lista que consiste en KDEL, HDEL, KKXX, KXKXX y RXR, en los que X es cualquier aminoácido y en el que preferiblemente la señal de retención en el retículo es KDEL.

10 En todavía otra realización preferida del tercer aspecto de la invención, el polipéptido de fusión fluorescente comprende o consiste preferiblemente en SEQ ID NO 16.

15 Un cuarto aspecto de la invención se refiere a un polipéptido de fusión fluorescente capaz de cambiar su localización dentro de la célula desde la membrana citoplasmática celular hasta las vesículas de retención, tras un aumento en la concentración de diacilglicerol intracelular, que comprende un péptido de localización en la membrana, un péptido de unión a proteínas de transducción de segundos mensajeros que comprende una secuencia de unión a PKC δ , una señal de retención en el retículo y un péptido fluorescente en el que:

20 a. el péptido de localización en la membrana está situado en el extremo N-terminal del polipéptido de fusión fluorescente y está unido físicamente, opcionalmente a través de un ligador, al péptido fluorescente, que a su vez está unido físicamente, opcionalmente a través de un ligador, al péptido de unión a proteínas de transducción de segundos mensajeros; y

25 b. el péptido de unión a proteínas de transducción de segundos mensajeros está unido físicamente, opcionalmente a través de un ligador, a la señal de retención en el retículo, que a su vez está situada en el extremo C-terminal del polipéptido de fusión fluorescente;

y en el que el término "péptido de localización en la membrana" se pretende que signifique un péptido cuya localización intracelular natural está en la membrana plasmática.

30 En una realización preferida del cuarto aspecto de la invención, la secuencia de unión a PKC δ es SEQ ID NO 19 (AARKRKGSFFYGG), o una variante que es al menos el 90 % homóloga a esta secuencia a lo largo de toda la región basándose en la identidad de aminoácidos.

35 En una realización preferida adicional del cuarto aspecto de la invención, la señal de retención en el retículo es un péptido seleccionado de la siguiente lista que consiste en KDEL, HDEL, KKXX, KXKXX y RXR, en los que X es cualquier aminoácido y en el que preferiblemente dicha señal de retención en el retículo es KDEL y/o el péptido de localización en la membrana es el dominio extracelular de interleucina 2 de SEQ ID NO 17 o una variante que es al menos el 90 % homóloga a cualquiera de estas secuencias a lo largo de toda la región basándose en la identidad de aminoácidos.

40 En otra realización preferida del cuarto aspecto de la invención, el péptido fluorescente se selecciona del grupo que consiste en GFP, YFP, turboGFP, tRFP y tRFP602.

45 En todavía una realización preferida adicional del cuarto aspecto de la invención:

a. la secuencia de unión a PKC δ es SEQ ID NO 19 (AARKRKGSFFYGG), o una variante que es al menos el 90 % homóloga a esta secuencia a lo largo de toda la región basándose en la identidad de aminoácidos;

50 b. el péptido de localización en la membrana es el dominio extracelular del receptor de interleucina 2 de SEQ ID NO 17 o una variante que es al menos el 90 % homóloga a esta secuencia a lo largo de toda la región basándose en la identidad de aminoácidos; y

55 c. la señal de retención en el retículo es un péptido seleccionado de la siguiente lista que consiste en KDEL, HDEL, KKXX, KXKXX y RXR, en los que X es cualquier aminoácido y en el que preferiblemente la señal de retención en el retículo es KDEL.

En todavía otra realización preferida del cuarto aspecto de la invención, el polipéptido de fusión fluorescente comprende SEQ ID NO 18.

60 Un quinto aspecto de la invención se refiere a una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de polinucleótido que codifica para un polipéptido tal como se define en cualquiera de los aspectos previos de la invención.

65 Un sexto aspecto de la invención se refiere a un biosensor que comprende el polipéptido de fusión tal como se define en los aspectos primero, segundo, tercero y cuarto de la invención.

Un séptimo aspecto de la invención se refiere a una célula que comprende el polipéptido de fusión fluorescente tal como se define en cualquiera de los aspectos primero, segundo, tercero o cuarto de la invención o el biosensor tal como se define en el sexto aspecto de la invención, en el que preferiblemente dicha célula es la línea celular U2O2.

5 En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a varios usos para el polipéptido de fusión fluorescente tal como se define en cualquiera de los aspectos primero, segundo, tercero o cuarto de la invención o del biosensor tal como se define en el sexto aspecto de la invención. Un primer uso del biosensor según la presente invención es para detectar y cuantificar segundos mensajeros incluyendo, pero sin limitarse a, AMPc, calcio, diacilglicerol, IP3 y GMPc. Tal como ya se ha mencionado, la unión del segundo mensajero al polipéptido de fusión fluorescente de cualquiera de los aspectos de esta invención da como resultado un cambio sustancial en la conformación espacial que conduce a un cambio en la localización de la fluorescencia intracelular. Esta translocación de la fluorescencia puede aprovecharse para la cuantificación de segundos mensajeros mediante microscopía de fluorescencia. Además, todo este proceso puede rastrearse en células vivas debido a la presencia de la proteína fluorescente en el biosensor.

15 Además, el polipéptido de fusión fluorescente tal como se define en cualquiera de los aspectos primero, segundo, tercero o cuarto de la invención o el biosensor tal como se define en el sexto aspecto de la invención es útil en la práctica de esencialmente cualquier aplicación para la cual se obtiene la lectura de la transducción de segundos mensajeros. Tales aplicaciones se conocen bien en la técnica. Sin embargo, las aplicaciones meramente a modo de ejemplo de la presente invención incluyen, pero no se limitan a:

- 25 a. identificación de compuestos de prueba que actúan como agonistas, antagonistas, agonistas inversos o ligandos naturales del receptor de la superficie celular seleccionados de factores de crecimiento, citocinas, receptores acoplados a proteínas G, integrinas y canales de ion calcio estudiando el movimiento de segundos mensajeros usando dispositivos de microscopía de fluorescencia. En una realización preferida, dicho receptor de la superficie celular es un receptor acoplado a proteína G (GPCR).
- 30 b. Clonación de la expresión del agonista, antagonista y agonista inverso peptídico de receptores.
- c. Clonación de la expresión de moduladores que cambian la presencia intracelular de segundos mensajeros.
- 35 d. Establecimiento de curvas de respuesta a la dosis de moduladores de moléculas de membrana.
- e. Determinación de alteraciones en moléculas de membrana y moduladores implicados en una enfermedad o trastorno cuya cascada de señalización depende de estos segundos mensajeros y, de ese modo, puede usarse el biosensor como herramienta de diagnóstico.

40 El polipéptido de fusión fluorescente y el biosensor correspondiente de la presente invención pueden prepararse mediante técnicas bien conocidas por los expertos en la técnica pero, a modo de ejemplo, pueden construirse tal como sigue. Las secuencias codificantes correspondientes al péptido de localización en la membrana, el péptido fluorescente, el péptido de interacción con la transducción de proteínas y la señal de localización en el retículo pueden amplificarse fácilmente mediante PCR y clonarse en un plásmido lanzadera. Estas secuencias codificantes pueden clonarse entonces fácilmente en el plásmido de fusión final en el orden específico presentado en el presente documento usando los sitios de enzimas de restricción que flanqueaban cada secuencia.

Los siguientes ejemplos sirven meramente para ilustrar la presente invención.

50 Ejemplos

Ejemplo 1. Construcción y uso de un biosensor de calcio para la medición de calcio en células vivas dentro de un intervalo dinámico amplio de concentraciones fisiológicas de este segundo mensajero.

55 Los autores de la presente invención construyeron un polipéptido de fusión fluorescente que comprendía el dominio extracelular del receptor de interleucina 2 de SEQ ID NO 17 como péptido de localización en la membrana, el dominio de unión a calmodulina de la cinasa de cadena ligera de miosina muscular de SEQ ID NO 1 como péptido de unión a proteínas de transducción de segundos mensajeros, el péptido KDEL como señal de retención en el retículo y turboGFP como péptido fluorescente en el que:

- 60 a. el péptido de localización en la membrana se situaba en el extremo N-terminal del polipéptido de fusión fluorescente y estaba unido físicamente, a través de un ligador, al péptido fluorescente, que a su vez estaba unido físicamente, a través de un ligador, al péptido de unión a proteínas de transducción de segundos mensajeros; y
- 65 b. el péptido de unión a proteínas de transducción de segundos mensajeros estaba unido físicamente, a

través de un ligador, a la señal de retención en el retículo, que a su vez está situada en el extremo C-terminal del polipéptido de fusión fluorescente.

El polipéptido de fusión fluorescente completo se ilustra en SEQ ID NO 15.

Con el fin de evaluar si este polipéptido induce redistribución de la fluorescencia intracelular en células vivas, se clonó el polipéptido de turboGFP como péptido fluorescente y se analizó la localización celular del biosensor tras activación inducida por calcio. En este sentido, se transfectaron de manera estable las líneas celulares HEK293 y U2O2 con la construcción de plásmido que contiene el ADNc de biosensor mencionado anteriormente (remítase a SEQ ID NO 15). Tras la transfección, ambas líneas celulares presentaron una distribución en la membrana de la fluorescencia. Sin embargo, se observó una disminución sustancial en la distribución en la membrana del biosensor tras aumentar los niveles intracelulares de calcio con 10 ng/ml de PMA y 1 μ M de ionomicina. Este resultado indica que un aumento en la concentración de calcio intracelular induce un cambio conformacional en el biosensor que promueve una redistribución del biosensor fluorescente. Se calculó la actividad como un incremento de la granularidad de estas células. Se obtuvieron estos mismos resultados con tres clones diferentes de las líneas celulares anteriores tal como se ilustra en la figura 2 (gráfico de la izquierda) que proporciona una prueba de la reproducibilidad de estos resultados.

En segundo lugar, con el fin de determinar si el calcio induce un cambio conformacional significativo dentro de un intervalo dinámico fisiológico, se transfectó de manera estable la línea celular estable de biosensor U2O2 con el receptor de taquicinina 1 humano. El receptor de taquicinina 1 (TACR1) también conocido como receptor de neurocinina 1 (NK1R) o receptor de sustancia P (SPR) es un receptor acoplado a proteína G que se encuentra en el sistema nervioso central y el sistema nervioso periférico. El ligando endógeno para este receptor es la sustancia P, aunque tiene algo de afinidad por otras taquicininas, la sustancia P se sintetiza por las neuronas y se transporta a las vesículas sinápticas; se consigue la liberación de sustancia P a través de la acción de despolarización de mecanismos dependientes de calcio. Cuando se estimulan los receptores de NK1, pueden generar diversos segundos mensajeros, que pueden desencadenar una amplia variedad de mecanismos efectores que regulan la excitabilidad y función celular. Uno de estos mecanismos conduce a la movilización de calcio de tanto fuentes intra como extracelulares.

Se sembró la línea celular estable doble a 20.000 células por pocillo sobre placas ópticas de 96 mm, y se cultivaron en 200 μ l de DMEM F12 complementado con suero bovino fetal al 10 %. Para la redistribución del biosensor fluorescente, se estimularon células con diferentes concentraciones del agonista sustancia P durante 6 horas. Tras el tratamiento, se tiñeron los núcleos con DAPI y se detectó la redistribución de fluorescencia del biosensor mediante fluorescencia usando algoritmos de análisis de imágenes. Cuando se trataron las células con el agonista, se internalizó el biosensor de la membrana plasmática en vesículas de alta intensidad (figura 3). Se calculó la actividad como un incremento de la granularidad de estas células. Se trataron las células con series de dilución de 11 log (n=5). La CE50 para la sustancia P fue de $\sim 9,5 \times 10^{-12}$ M tras un tratamiento de 6 h con agonista. Se validó el ensayo de redistribución con un promedio de $Z'=0,85 \pm 0,01$ para el cribado de alto contenido (figura 4).

Para comprobar la sensibilidad del biosensor en comparación con otros métodos, se realizó un ensayo de calcio fluorescente típico usando Fura-2/AM ratiométrico. Se midió el aumento de calcio dentro de la célula usando la razón de la fluorescencia de Fura2 unido y no unido al ion. Se incubaron células con Fura2-AM y se trataron con concentraciones de sustancia P crecientes. Se trataron células con concentraciones de sustancia P que oscilaban entre 0 y 10 μ M por cuadruplicado. La CE50 para la sustancia P fue de $\sim 1,4 \times 10^{-8}$ M. Se validó el ensayo de calcio con una $Z'=0,84$ para el cribado de alto contenido.

En ambos métodos de cuantificación, se realizó la adquisición de imágenes usando un dispositivo Bioimager de alto contenido "BD Pathway 855" de BD Biosciences.

Ejemplo 2. Construcción y uso de un biosensor de AMPc para la medición de AMPc en células vivas dentro de un intervalo dinámico amplio de concentraciones fisiológicas de este segundo mensajero.

Los autores de la presente invención construyeron un polipéptido de fusión fluorescente que comprendía el dominio extracelular del receptor de interleucina 2 de SEQ ID NO 17 como péptido de localización en la membrana, el dominio de unión a proteína cinasa A (PKA) de la proteína de anclaje a cinasa A (AKAP) de SEQ ID NO 9 como péptido de unión a proteínas de transducción de segundos mensajeros, el péptido KDEL como señal de retención en el retículo y turboGFP como péptido fluorescente en el que:

- a. el péptido de localización en la membrana se situaba en el extremo N-terminal del polipéptido de fusión fluorescente y estaba unido físicamente, a través de un ligador, al péptido fluorescente, que a su vez estaba unido físicamente, a través de un ligador, al péptido de unión a proteínas de transducción de segundos mensajeros; y
- b. el péptido de unión a proteínas de transducción de segundos mensajeros estaba unido físicamente, a través de un ligador, a la señal de retención en el retículo, que a su vez está situada en el extremo C-

terminal del polipéptido de fusión fluorescente.

El polipéptido de fusión fluorescente completo se ilustra en SEQ ID NO 16.

5 Como con el biosensor del ejemplo 1, con el fin de valorar si la activación del polipéptido mencionado anteriormente induce redistribución de la fluorescencia intracelular en células vivas, se clonó el péptido turboGFP como péptido fluorescente y se analizó la localización celular del biosensor tras activación inducida por AMPc. En este sentido, se transfectoron de manera estable las líneas celulares SHSY5Y y U2O2 con la construcción de plásmido que contiene la secuencia codificante del biosensor mencionado anteriormente. Ambas líneas celulares presentaron una
10 distribución en la membrana de la fluorescencia. Como con el ejemplo 1, se calculó la actividad como un incremento de granularidad tratando estas células con 10 μM de forskolina y 25 μM de IBMX en tres clones estables diferentes durante 36 h (figura 2, gráfico de la derecha).

15 Para determinar si AMPc induce un cambio conformacional significativo dentro de un intervalo dinámico fisiológico, se transfectó de manera estable la línea celular estable de biosensor U2O2 con el receptor adrenérgico beta 2 humano. Los receptores adrenérgicos son una clase de receptores acoplados a proteínas G que son dianas de las catecolaminas, especialmente noradrenalina (norepinefrina) y adrenalina (epinefrina). Se sembró la línea celular estable doble a 20.000 células por pocillo sobre placas ópticas de 96 mm, y se cultivaron en 200 μl de DMEM F12 complementado con suero bovino fetal al 10 %. Para la redistribución del biosensor fluorescente, se estimularon las
20 células con diferentes concentraciones de agonista de isoproterenol durante 36 horas (figura 5). Tras el tratamiento, se tiñeron los núcleos con DAPI y se detectó la redistribución de la fluorescencia del biosensor mediante fluorescencia usando algoritmos de análisis de imágenes. Cuando se trataron las células con el agonista, el biosensor se internalizó de la membrana plasmática en vesículas de alta intensidad. Se calculó la actividad como un incremento de granularidad de estas células. Se trataron las células con series de dilución de 11 log (n=5). La CE50 para el isoproterenol fue de $\sim 2,3 \times 10^{-7}$ M tras un tratamiento de 24 h con agonista. Se validó el ensayo de redistribución con un promedio de $Z'=0,7 \pm 0,01$ para el cribado de alto contenido. Los resultados se muestran en la
25 figura 6.

30 Ejemplo 3. Construcción y uso de un biosensor de diacilglicerol para la medición de diacilglicerol en células vivas dentro de un intervalo dinámico amplio de concentraciones fisiológicas de este segundo mensajero.

Los autores de la presente invención construyeron un polipéptido de fusión fluorescente que comprendía el dominio extracelular del receptor de interleucina 2 de SEQ ID NO 17 como péptido de localización en la membrana, la secuencia de unión de SEQ ID NO 19 como péptido de unión a proteínas de transducción de segundos mensajeros, el péptido KDEL como señal de retención en el retículo y turboGFP como péptido fluorescente en el que:

- a. el péptido de localización en la membrana se situaba en el extremo N-terminal del polipéptido de fusión fluorescente y estaba unido físicamente, a través de un ligador, al péptido fluorescente, que a su vez estaba unido físicamente, a través de un ligador, al péptido de unión a proteínas de transducción de segundos mensajeros; y
- b. el péptido de unión a proteínas de transducción de segundos mensajeros estaba unido físicamente, a través de un ligador, a la señal de retención en el retículo, que a su vez se situaba en el extremo C-terminal del polipéptido de fusión fluorescente.

45 El polipéptido de fusión fluorescente completo se ilustra en SEQ ID NO 18.

Como con los ejemplos previos, con el fin de valorar si la activación del polipéptido mencionado anteriormente induce redistribución de la fluorescencia intracelular en células vivas, se clonó el péptido turboGFP como péptido fluorescente y se analizó la localización celular del biosensor tras activación inducida por diacilglicerol. En este sentido, se transfectó de manera estable la línea celular U2O2 con la construcción de plásmido que contenía la secuencia codificante del biosensor mencionado anteriormente. Esta línea celular transfectada de manera estable presentó una distribución en la membrana de la fluorescencia antes de inducir la activación de diacilglicerol intracelular. Como con los ejemplos previos, se calculó la actividad como un incremento de granularidad tratando estas células con dosificaciones crecientes de PMA. Los resultados se muestran en la figura 7 y la figura 8.

Listado de secuencias

60 **SEQ ID No 1:** MEKRRWKKNFIAVSAANRFKISSSGAL

SEQ ID No 2: ASPWKSARLMVHTVATFNSI

SEQ ID No 3: AIGFKKLAEAVKFSAKLMGQ

SEQ ID No 4: KKTFKEVANAVKISASLMGT

SEQ ID No 5: GAVLKVLTTGLPALISWIKR

5 **SEQ ID No 6:** RGGFRRIARLVGLREWAYR

SEQ ID No 7: GGRLALLRARLKELALEAA

10 **SEQ ID No 8:** AEGVRNIKSMWEKGNVFSSP

SEQ ID No 9: DLIEEAASRIVDAVIEQVKAAGAY

SEQ ID no 10: VQGNTDEAQEELAWKIAKMIVSDVMQQ

15 **SEQ ID No 11:** VQGNTDEAQEELLWKIAKMIVSDVMQQ

SEQ ID No 12: FEELAWKIAKMIWSDVFQQ

20 **SEQ ID No 13:** QIEYLAKQIVDNAIQQAK

SEQ ID No 14: LEQYANQLADQIIKEATE

SEQ ID No 15:

MDSYLLMWGLLTFIMVPGCQAE LCDDDPPEIPHATFKAMAYKEG TMLNCECKRGFRRIKSGSLYMLCTGNSSHSSWDNQ
CQCTSSATRN TT KQVTPQPEEQKERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERIYHFVVGQMVVYQCVQGYR
ALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICTGEMETSQFPGEEKPQASPEGRPESETSCLVTTTDFQIQTEMAATMETSIFTTD
LQVAVAGCVFLLISVLLSGLTWQRRQRKSGRTIGIQLVVDQQQQQGILQSTVPMESDESGLPAMEIECRITGTLNGVEFE
LVGGEGTPEQGRMTNKMKSTKGALTFSPYLLSHVMGYGFYHFGTYPGYPENPFLHAINNGGYTNTRIEKYEDGGVLHVSF
SYRYEAGRVIGDFKVMGTGFPEDSVIFTDKIIRS NATVEHLHPMGDNDLDG SFTRTFSLRDGGYSSVVD SHMHFKSAIHPSI
LQNGGPMFAFRRVEEDHSNTEL GIVEYQHAFKTPDADAGEERSREMEKRRWKKNFIAVSAANRFKISSSGALKDEL

SEQ ID No 16:

MDSYLLMWGLLTFIMVPGCQAE LCDDDPPEIPHATFKAMAYKEG TMLNCECKRGFRRIKSGSLYMLCTGNSSHSSWDNQ
CQCTSSATRN TT KQVTPQPEEQKERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERIYHFVVGQMVVYQCVQGYR
ALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICTGEMETSQFPGEEKPQASPEGRPESETSCLVTTTDFQIQTEMAATMETSIFTTD
LQVAVAGCVFLLISVLLSGLTWQRRQRKSGRTIGIQLVVDQQQQQGILQSTVPMESDESGLPAMEIECRITGTLNGVEFE
LVGGEGTPEQGRMTNKMKSTKGALTFSPYLLSHVMGYGFYHFGTYPGYPENPFLHAINNGGYTNTRIEKYEDGGVLHVSF
SYRYEAGRVIGDFKVMGTGFPEDSVIFTDKIIRS NATVEHLHPMGDNDLDG SFTRTFSLRDGGYSSVVD SHMHFKSAIHPSI
25 LQNGGPMFAFRRVEEDHSNTEL GIVEYQHAFKTPDADAGEERSRVDLIEEAASRIVDAVIEQVKAAGAYGGKDEL

SEQ ID No 17:

MDSYLLMWGLLTFIMVPGCQAE LCDDDPPEIPHATFKAMAYKEG TMLNCECKRGFRRIKSGSLYMLCTGNSSHSSWDNQ
CQCTSSATRN TT KQVTPQPEEQKERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERIYHFVVGQMVVYQCVQGYR
ALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICTGEMETSQFPGEEKPQASPEGRPESETSCLVTTTDFQIQTEMAATMETSIFTTD
LQVAVAGCVFLLISVLLSGLTWQRRQRKSGRTI

SEQ ID No 18:

MDSYLLMWGLLTFIMVPGCQAE LCDDPPEIPHATFKAMAYKEGTM LNCECKRGFRRIKSGSLYMLCTGNSSHSWDNQ
CQCTSSATRNTTKQVTPQPEEQKERKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPWENEATERIYHFVVGQMVVYQCVQGYR
ALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQPQLICTGEMETSQFPGEKQPQASPEGRPESETSCLVTTTDFQIQTEMAATMETSIFTTD
LQVAVAGCVFLLISVLLLSGLTWQRRQRKSGRTIGIQLVVDQQQQQGILQSTVPMESDESGLPAMEIECRITGTLNGVEFE
LVGGGEGTPEQGRMTNKMKSTKGALTFSPYLLSHVMGYGFYHFGTYPSGYENPFLHAINNGGYTNTRIEKYEDGGVLHVSF
SYRYEAGRVIGDFKVMGTGFPEDSVIFTDKIIRSNATVEHLHPMGDNDLDGSFTRTFLRDGGYSSVVD SHMHFKSAIHPSI
LQNGGPMFAFRRVEEDHSNTELGIVEYQHAFKTPDADAGEERSRVAARKRKG SFFYGGKDEL

SEQ ID No 19:

AARKRKG SFFYGG

SEQ ID No 20:

MSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLT LKFICTTGKLPVPWPTLVTTFSYGVQCFSRYPDHMKQH
DFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKIDFKEDGNILGHKLEYNYN SHNVYIMADKQKNGIKV
NFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALS KDPNEKRDHMLLEFVTAAGITHGMDELYK

5

SEQ ID No 21

MFKGIVEGIGIIEKIDIYTDLDKYAIRFPENMLNGIKKESIMFNGCFLTVTSVNSNIVWFDIFEKEARKLDTFREYKVGDRVNL
GTFPKFGAASGGHILSARISCVASIIIEINEDYQQMWIQIPENFTEFLIDKDYIAVDGISLTIDTIKNNQFFISLPLKIAQNTNMK
WRKKGDKVNVELSNKINANQCW

SEQ ID No 22

MESDESGLPAMEIECRITGTLNGVEFELVGGGEGTPEQGRMTNKMKSTKGALTFSPYLLSHVMGYGFYHFGTYPSGYENPFL
LHAINNGGYTNTRIEKYEDGGVLHVSFSYRYEAGRVIGDFKVMGTGFPEDSVIFTDKIIRSNATVEHLHPMGDNDLDGSFTR
TFLRDGGYSSVVD SHMHFKSAIHPSILQNGGPMFAFRRVEEDHSNTELGIVEYQHAFKTPDADAGEE

10

SEQ ID No 23

MVSKGEELIKENMHMKLYMEGTVNNHHFKCTSEGEGKPYEGTQTMRIKVV EGGPLPFAFDILATSFMYGSRTFINHTQGIP
DFFKQSFPEGFTWERVTTYEDGGVLTATQDTSLQDGLIYNVKIRGVNFPSNGPVMQKKT LGWEANTEM LYPADGGLEGR
SDMALKLVGGGHLCNFKTTYRSKPPAKNLKMPGVVYVDHRLERIKEADKETYVEQHEVAVARYCDLPSKLGHLN

SEQ ID No 24

MVGEDSELITENMHMKLYMEGTVNNHHFKCTSEGEGKPYEGTQTMKIKVVEGGPLPFAFDILATSFMYGSKAFINHTQGIP
DFFKQSFPEGFTWERITTYEDGGVLTATQDTSLQNGCLIYNVKINGVNFPSNGPVMQKKT LGWEASTEM LYPADSGLRGH
GQMALKLVGGGYLHCSLKT TYRSKPPAKNLKMPGFHFVDHRLERIKEADKETYVEQHEMAVAKYCDLPSKLGHS

SEQ ID No 25

MSGGEELFAGIVPVLIELDGDVHGHKFSVRGEGEGDADY GLEIKFICTTGKLPVPWPTLVTTLCYGIQCFARYPEHMKMND
FFKSAMPEGYIQERTIQFQDDGKYKTRGEVKFEGDTLVNRIELKIDFKEDGNILGHKLEYSFN SHNVYIRPKANNGLEANF
KTRHNIEGGGVQLADHYQTNVPLGDGPVLIPINH YLSTQT KISKDRNEARDHMLLESFSACCHTHGMDELY

15

REIVINDICACIONES

- 5 1. Polipéptido de fusión fluorescente capaz de cambiar su localización dentro de la célula desde la membrana citoplasmática celular hasta las vesículas de retención, tras un aumento en la concentración de segundos mensajeros dentro del citoplasma celular, que comprende un péptido de localización en la membrana, un péptido de unión a proteínas de transducción de segundos mensajeros, una señal de retención en el retículo y un péptido fluorescente en el que:
- 10 a. el péptido de localización en la membrana está situado en el extremo N-terminal del polipéptido de fusión fluorescente y está unido físicamente, opcionalmente a través de un ligador, al péptido fluorescente, que a su vez está unido físicamente, opcionalmente a través de un ligador, al péptido de unión a proteínas de transducción de segundos mensajeros; y
- 15 b. el péptido de unión a proteínas de transducción de segundos mensajeros está unido físicamente, opcionalmente a través de un ligador, a la señal de retención en el retículo, que a su vez está situada en el extremo C-terminal del polipéptido de fusión fluorescente;
- y en el que el término “péptido de localización en la membrana” se pretende que signifique un péptido cuya localización intracelular natural está en la membrana plasmática.
- 20 2. Polipéptido de fusión fluorescente según la reivindicación 1, en el que dicho polipéptido es capaz de cambiar su localización dentro de la célula desde la membrana citoplasmática celular hasta las vesículas de retención, tras un aumento en la concentración de un segundo mensajero seleccionado de la lista que consiste en calcio, AMPc o diacilglicerol.
- 25 3. Polipéptido de fusión fluorescente según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en el que:
- 30 a. el péptido de localización en la membrana es el dominio extracelular del receptor de interleucina 2 de SEQ ID NO 17 o una variante que es al menos el 90 % homóloga a esta secuencia a lo largo de toda la región basándose en la identidad de aminoácidos; y
- b. la señal de retención en el retículo es el péptido seleccionado de la siguiente lista que consiste en KDEL, HDEL, KKXX, KXKXX y RXR, en los que X es cualquier aminoácido.
- 35 4. Polipéptido de fusión fluorescente según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en el que:
- a. el péptido de localización en la membrana es el dominio extracelular del receptor de interleucina 2 de SEQ ID NO 17; y
- 40 b. la señal de retención en el retículo es el péptido KDEL.
5. Polipéptido de fusión fluorescente según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicho polipéptido es capaz de cambiar su localización dentro de la célula desde la membrana citoplasmática celular hasta las vesículas de retención, tras un aumento en la concentración de calcio intracelular, y en el que el péptido de unión a proteínas de transducción de segundos mensajeros comprende una secuencia de unión a calmodulina.
- 45 6. Polipéptido de fusión fluorescente según la reivindicación 5, en el que:
- 50 a. la secuencia de unión a calmodulina se selecciona de la lista que consiste en SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 5, SEQ ID NO 6, SEQ ID NO 7 y SEQ ID NO 8 o una variante que es al menos el 90 % homóloga a cualquiera de estas secuencias a lo largo de toda la región basándose en la identidad de aminoácidos;
- 55 b. el péptido de localización en la membrana es el dominio extracelular del receptor de interleucina 2 de SEQ ID NO 17; y
- c. la señal de retención en el retículo es KDEL.
- 60 7. Polipéptido de fusión fluorescente según la reivindicación 5, en el que dicho polipéptido comprende SEQ ID NO 15.
- 65 8. Polipéptido de fusión fluorescente según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicho polipéptido es capaz de cambiar su localización dentro de la célula desde la membrana citoplasmática celular hasta las vesículas de retención, tras un aumento en la concentración de AMPc intracelular, y en el que el péptido de unión a proteínas de transducción de segundos mensajeros comprende una secuencia de unión a

los dominios reguladores RI y RII de PKA.

9. Polipéptido de fusión fluorescente según la reivindicación 8, en el que:
- 5 a. la secuencia de unión a los dominios reguladores RI y RII de PKA se selecciona de la lista que consiste en SEQ ID NO 9, SEQ ID NO 10, SEQ ID NO 11, SEQ ID NO 12, SEQ ID NO 13 y SEQ ID NO 14 o una variante que es al menos el 90 % homóloga a cualquiera de estas secuencias a lo largo de toda la región basándose en la identidad de aminoácidos;
- 10 b. el péptido de localización en la membrana es el dominio extracelular del receptor de interleucina 2 de SEQ ID NO 17; y
- c. la señal de retención en el retículo es KDEL.
- 15 10. Polipéptido de fusión fluorescente según la reivindicación 8, en el que dicho polipéptido comprende SEQ ID NO 16.
- 20 11. Polipéptido de fusión fluorescente según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicho polipéptido es capaz de cambiar su localización dentro de la célula desde la membrana citoplasmática celular hasta las vesículas de retención, tras un aumento en la concentración de diacilglicerol intracelular, y en el que el péptido de unión a proteínas de transducción de segundos mensajeros comprende una secuencia de unión a PKC δ .
- 25 12. Polipéptido de fusión fluorescente según la reivindicación 11, en el que:
- a. el péptido de unión a proteínas de transducción de segundos mensajeros comprende una secuencia de unión a PKC δ seleccionada de la lista que consiste en SEQ ID NO 19 o una variante que es al menos el 90 % homóloga a esta secuencia a lo largo de toda la región basándose en la identidad de aminoácidos;
- 30 b. el péptido de localización en la membrana es el dominio extracelular del receptor de interleucina 2 de SEQ ID NO 17;
- c. el péptido fluorescente se selecciona del grupo que consiste en GFP, YFP, turboGFP, tRFP y tRFP602; y
- 35 d. la señal de retención en el retículo es KDEL.
- 40 13. Polipéptido de fusión fluorescente según la reivindicación 11, en el que dicho polipéptido comprende SEQ ID NO 18.
- 45 14. Molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de polinucleótido que codifica para un polipéptido tal como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-13.
15. Biosensor que comprende el polipéptido de fusión tal como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-13.
- 45 16. Célula que comprende el polipéptido fluorescente tal como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-13 o el biosensor tal como se define en la reivindicación 15.
- 50 17. Uso *in vitro* del biosensor según la reivindicación 15 o el polipéptido fluorescente según cualquiera de las reivindicaciones 1-13, para detectar y/o cuantificar segundos mensajeros.

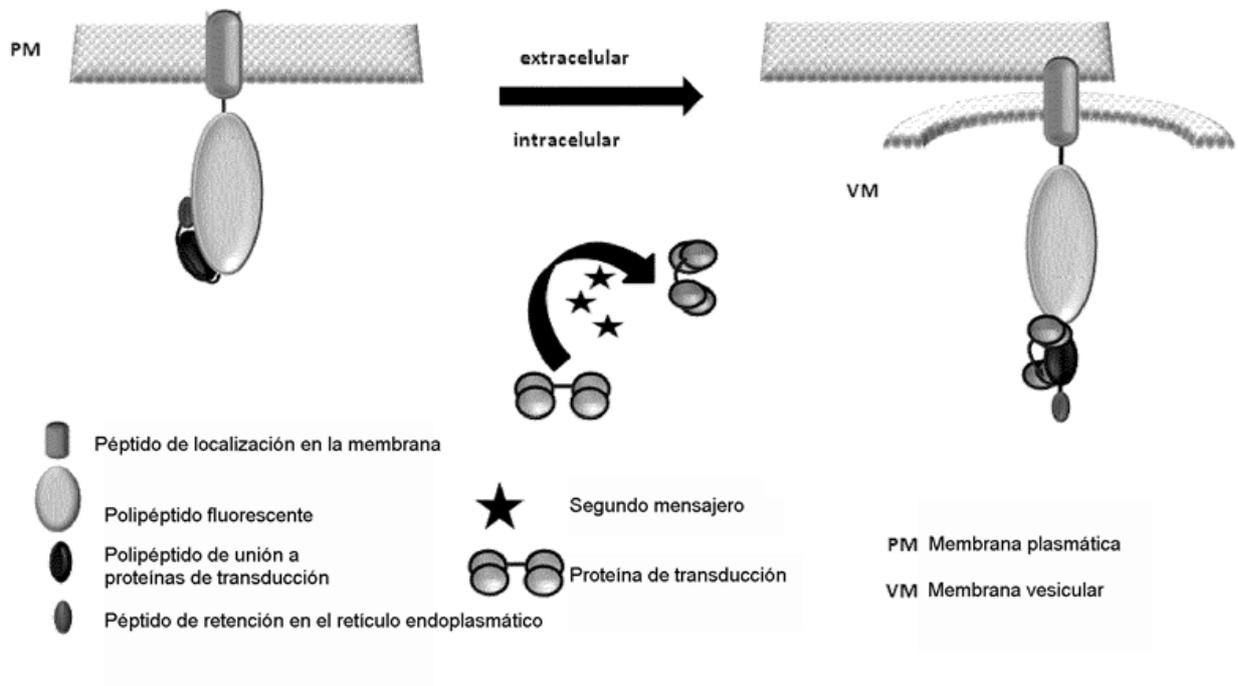


Fig. 1

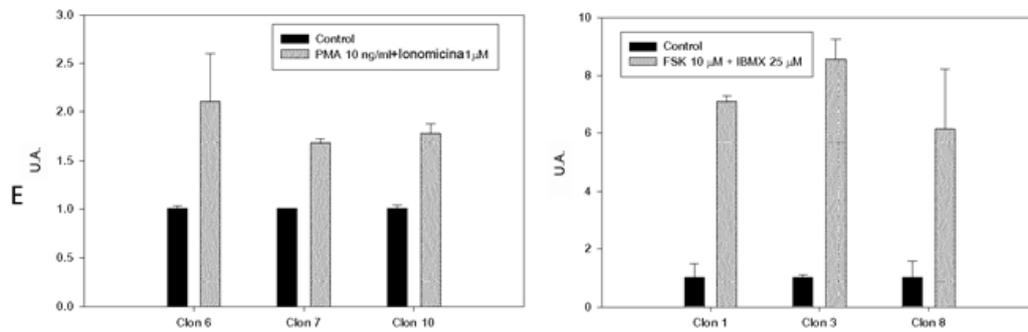
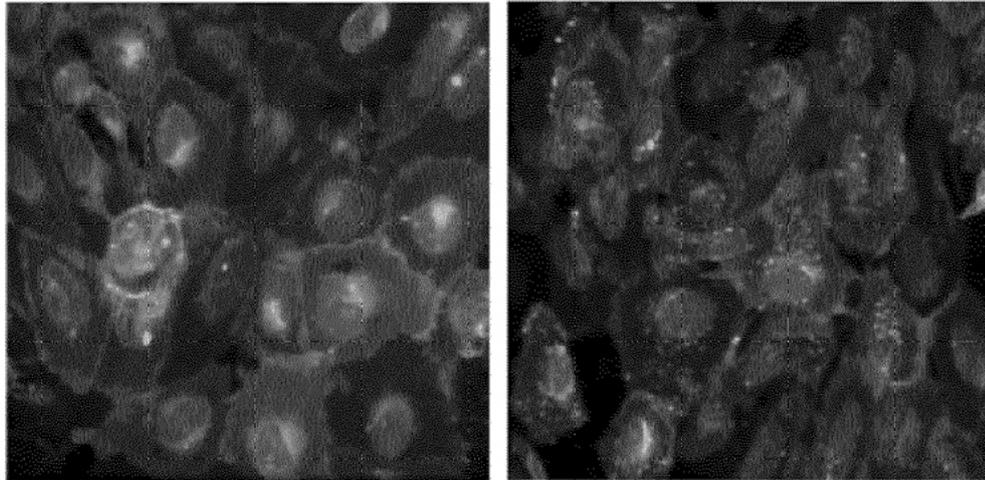


Fig. 2.



Células no estimuladas

Células estimuladas

Fig.3.

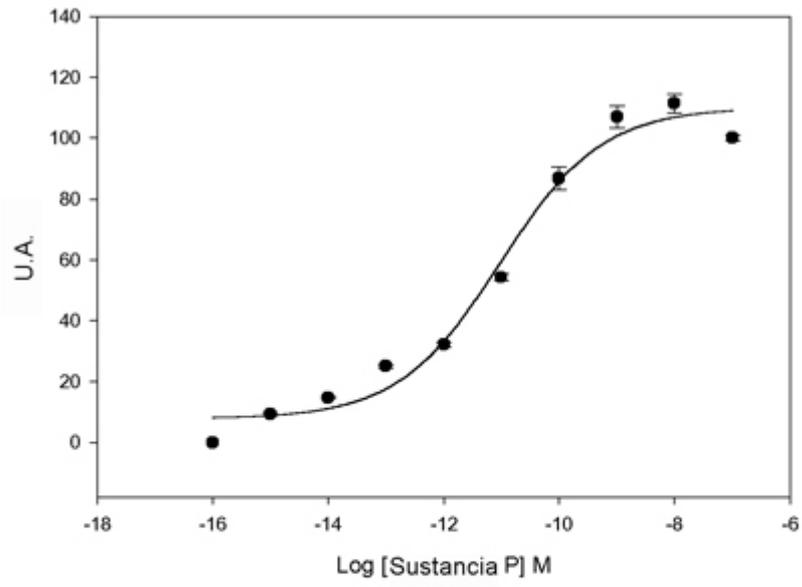


Fig.4

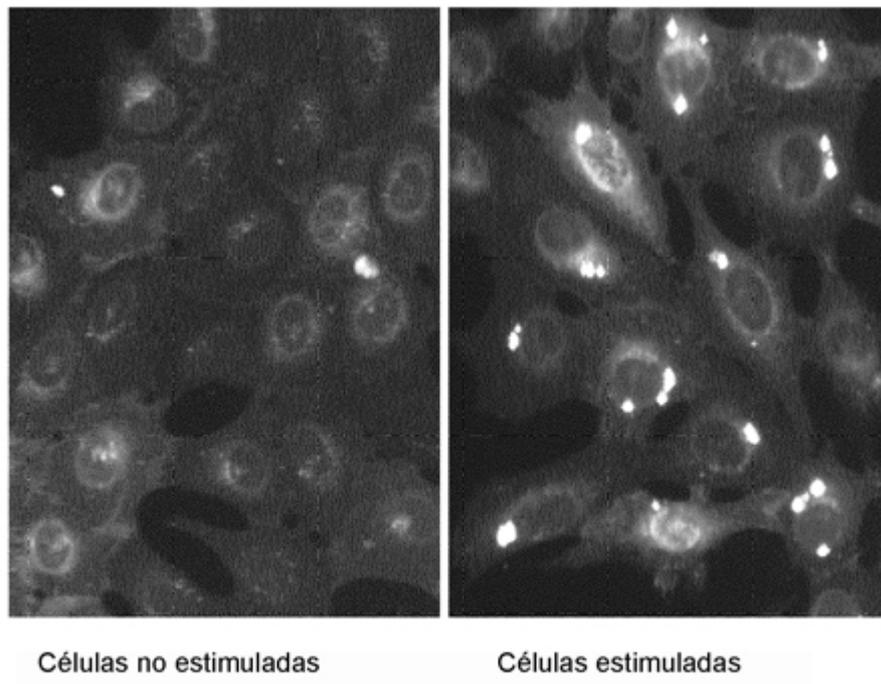


Fig.5

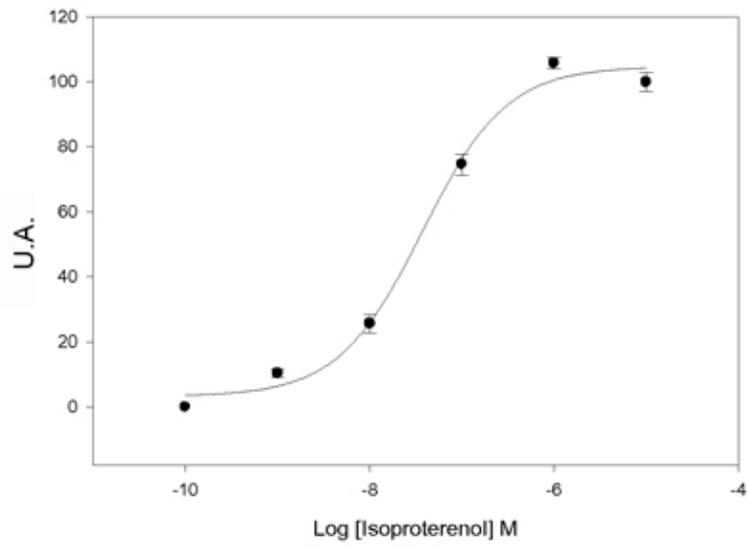


Fig.6

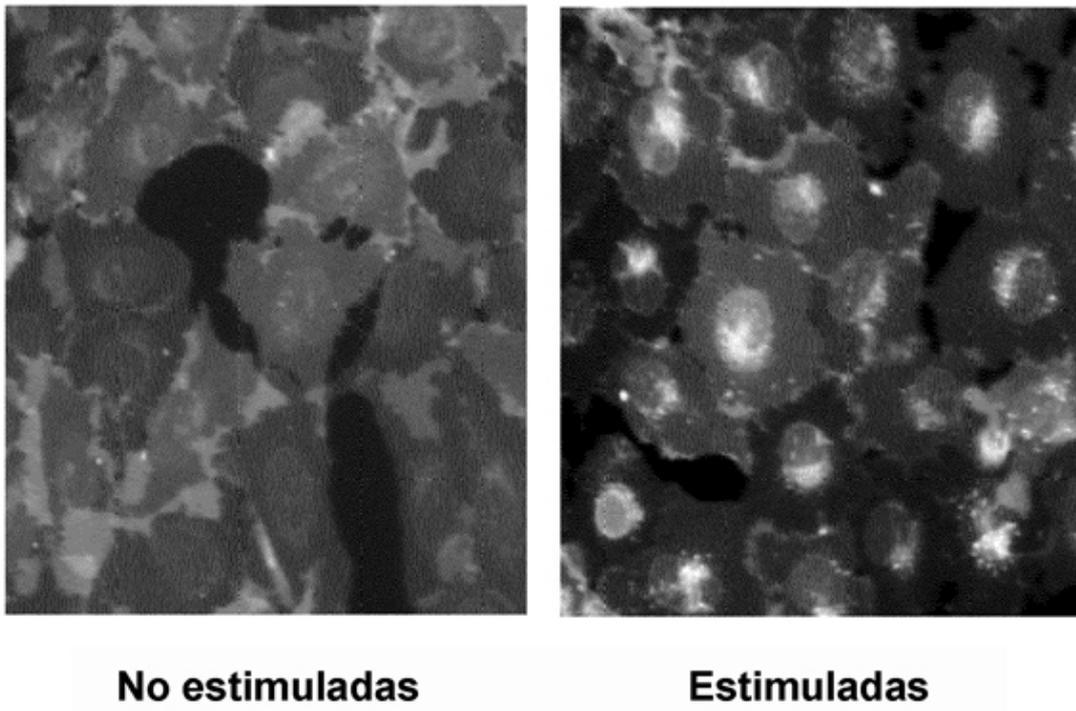


Fig.7

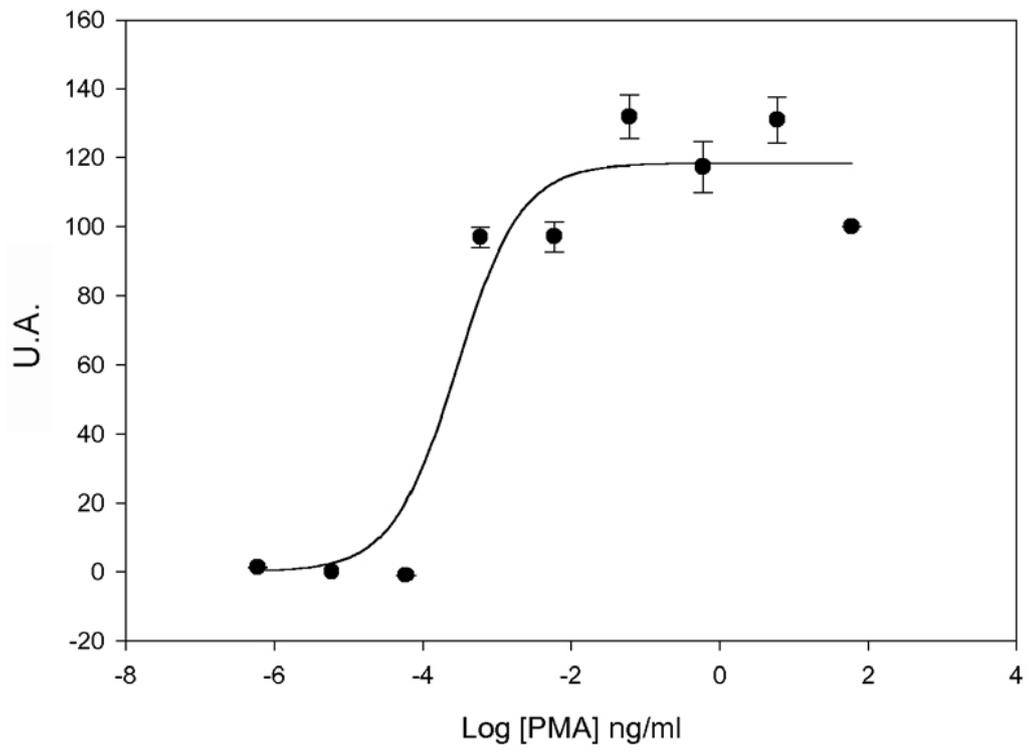


Fig.8