

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 686 141**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/37 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.10.2014 PCT/US2014/062260**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.04.2015 WO15061738**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.10.2014 E 14805702 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.07.2018 EP 3060677**

54 Título: **Ensayo enzimático con fluoróforos duplicados**

30 Prioridad:

25.10.2013 US 201361895533 P
30.10.2013 US 201361897352 P
19.06.2014 US 201462014586 P
01.10.2014 US 201462058532 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.10.2018

73 Titular/es:

BIOMADISON, INC. (100.0%)
1568 Luneta Drive
Del Mar, CA 92014, US

72 Inventor/es:

TUCKER, WARD C.

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 686 141 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 enzimático con fluoróforos duplicados

5 Campo de la invención

El campo de la invención es el de los ensayos de proteasas, especialmente los relacionados con neurotoxinas de *Clostridium botulinum*.

10 Antecedentes

Las neurotoxinas *botulínicas* (BoNT) son producidas por *Clostridium botulinum*, y se encuentran entre las toxinas más potentes conocidas. Estas toxinas son una fuente bien reconocida de intoxicación alimentaria, que resulta frecuentemente en daños graves o incluso la muerte de las víctimas. Existen una serie de neurotoxinas botulínicas o serotipos estructuralmente similares (BoNT/A-G, y un BoNT/H propuesto), cada uno de los cuales se compone de una cadena pesada (~100 kD) y una cadena ligera (~50 kD). La cadena pesada media la entrada de la toxina en una célula objetivo a través de endocitosis mediada por receptor. Una vez internalizada, la cadena ligera se transloca del lumen de la vesícula endosomal al citosol, y actúa como una proteasa dependiente de zinc para escindir las proteínas específicas de sustrato que median la fusión de membrana objetivo a vesícula, un proceso que es clave para liberar neurotransmisores.

Las proteínas sustratos de BoNT incluyen la proteína de membrana celular sintaxina, la proteína de membrana periférica SNAP-25, y la proteína de membrana vesicular sinaptobrevina (Syb). Estas proteínas se denominan en conjunto proteínas SNARE (receptor de proteína de unión a factor sensible a N-etilmaleimida soluble). La escisión de las proteínas SNARE bloquea la fusión de las vesículas con la membrana celular y anula la liberación de neurotransmisores a las uniones neuromusculares. Entre las proteínas SNARE, la sintaxina y la SNAP-25 residen usualmente en la membrana objetivo y por lo tanto se denominan t-SNARE, mientras que la sinaptobrevina se asocia exclusivamente con vesículas sinápticas dentro de la sinapsis y se denomina v-SNARE. Juntas, estas tres proteínas forman un complejo que se piensa que sea la maquinaria mínima necesaria para mediar la fusión entre la membrana de la vesícula y la membrana plasmática. BoNT/A, E, y C escinden SNAP-25, mientras que BoNT/B, D, F, y G escinden sinaptobrevina (Syb) en sitios separados y distintos. BoNT/C también escinde sintaxina además de SNAP-25. Ya que las BoNT actúan como enzimas, incluso cantidades mínimas pueden tener un efecto devastador en un individuo afectado.

Mientras que la toxina *botulínica* es una fuente de intoxicación alimentaria y tiene potencial para su uso como un arma para el terrorismo biológico, existen aplicaciones terapéuticas. Recientemente, la toxina *botulínica* se ha utilizado para tratar afecciones asociadas con contracciones musculares no deseadas (tales como estrabismo) y en el tratamiento de migrañas persistentes. También se usa ampliamente para fines cosméticos, donde la parálisis selectiva de músculos pequeños debajo de la piel reduce temporalmente la aparición de arrugas relacionadas con la edad. Con tal uso generalizado existe la necesidad de caracterizar sensiblemente y rápidamente las proteínas BoNT. Este proceso se complica por la necesidad de cuantificar con precisión la actividad de BoNT en lugar de simplemente cuantificar la cantidad de proteína BoNT presente, ya que los procesos de purificación utilizados para aislar estas proteínas pueden conducir a un grado significativo de desnaturalización y la resultante inactivación de estas proteínas.

Actualmente, un método comúnmente usado para detectar las BoNT y cuantificar su actividad es realizar ensayos de toxicidad mediante el uso de ratones. Dichos métodos requieren el uso de grandes cantidades de ratones, consumen mucho tiempo y no pueden usarse para estudiar la cinética catalítica de la toxina. También se han desarrollado varios sistemas de inmunoensayo basados en anticuerpos desarrollados contra proteínas BoNT, pero aunque dichos ensayos pueden ser útiles para cuantificar la cantidad de proteína BoNT presente no pueden usarse para determinar la actividad enzimática de la toxina. Se han desarrollado métodos para detectar productos de reacción de BoNT para medir las actividades enzimáticas de estas toxinas, por ejemplo, mediante el uso de HPLC o inmunoensayos dirigidos a productos de escisión. Estos métodos, sin embargo, generalmente son complejos, consumen tiempo, y pueden ser caros (por ejemplo, utilizan anticuerpos especializados), lo que los hace difíciles de automatizar e inaplicables para el tamizaje a gran escala.

Recientemente, los investigadores han comenzado a explorar el uso de los métodos de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) para cuantificar las actividades enzimáticas. Los métodos de FRET implican el uso de dos porciones fluorescentes, un fluoróforo donador y un fluoróforo aceptor. El espectro de emisión del fluoróforo donador se solapa con el espectro de excitación del fluoróforo aceptor, y bajo condiciones definidas y a una separación y orientación apropiada de los fluoróforos la excitación del fluoróforo donador puede conducir a la emisión del fluoróforo aceptor. La eficiencia de esta transferencia de energía es altamente dependiente de la distancia entre el fluoróforo donador y el fluoróforo aceptor, y se han desarrollado varios ensayos de fluorescencia para explotar este fenómeno. Para su aplicación en los ensayos basados en células, tales sondas FRET pueden generarse dentro de la célula mediante manipulación genética. En un enfoque de proteínas fluorescentes, en particular la Proteína Fluorescente Verde y variantes de esta como se describe en la solicitud de patente internacional WO2008/145301A1 (otorgada a

Tasdemir y Corazza), se usan frecuentemente ya que estas proteínas no necesitan la adición de un cofactor o sustrato para fluorescer. Algunos de estos ensayos son capaces de detectar la actividad enzimática. Por ejemplo, la patente de los Estados Unidos núm. 7,749,759 (otorgada a Fernandez-Salas, Steward, y Aoki) describe el uso de células que contienen un sustrato para una toxina de *Clostridium*, donde el sustrato (que se expresa a partir de un constructo genético) incluye un fluoróforo donador y un fluoróforo aceptor separados por un péptido que es escindido por la toxina de *Clostridium*. La exposición a la toxina de *Clostridium* da como resultado la escisión del sustrato, y la posterior separación entre el fluoróforo donador y el fluoróforo aceptor da como resultado los cambios en la fluorescencia observada. Tales ensayos basados en FRET, sin embargo, tienen limitaciones. El espectro de excitación del fluoróforo donador y del fluoróforo aceptor frecuentemente se solapan, lo que resulta en una señal de fondo inherentemente alta del fluoróforo aceptor incluso en ausencia de FRET. De manera similar, en algunos constructos reporteros los fluoróforos pueden auto agregar, formar complejos de fluoróforos dentro de y/o entre constructos agregados que no se disocian en la escisión de un sitio objetivo. Además, el uso de secuencias peptídicas más grandes como sitios de escisión para acomodar sitios más complejos de unión a enzimas y de escisión (por ejemplo, los de neurotoxinas de *Clostridia*) puede reducir dramáticamente la eficiencia de la transferencia de energía entre fluoróforos separados por tales secuencias peptídicas.

Como un resultado de esta baja eficiencia y alta fluorescencia de fondo, los constructos basados en FRET se sobreexpresan frecuentemente dentro de las células, lo que resulta en toxicidad celular y agregación de constructos indeseables. La patente de los Estados Unidos núm. 6,936,428 (otorgada a Davis y Vellencourt) describe un enfoque en el cual la fluorescencia de fondo en los constructos de FRET que utilizan proteínas fluorescentes donoras yceptoras se reduce mediante el uso de constructos en los que los pares de fluoróforos de proteína multimérica se ubican para formar homodímeros intramoleculares, lo que reduce de esta manera la formación de heterodímeros de donores/aceptores que generan la fluorescencia de fondo. Alternativamente, la patente de los Estados Unidos 8,067,231 (otorgada a Fernandez-Salas y otros) describe un ensayo basado en células en el que se observa un cambio en la distribución de la fluorescencia observable desde una membrana celular al espacio citoplasmático celular, sin embargo tal caracterización necesita instrumentos ópticos sofisticados y análisis de imágenes.

La solicitud de patente internacional WO 00/26408 A2 describe unos sistemas y un método para el análisis de sistemas ópticos de células para determinar rápidamente la distribución, ambiente o actividad de moléculas reporteras etiquetadas con fluorescencia en células para el propósito de tamizar grandes cantidades de compuestos para los que afectan específicamente las funciones biológicas particulares. Esta incluye un ejemplo que usa múltiples fluoróforos reporteros y describe un constructo con múltiples insertos de una "segunda secuencia señal" que sirve como un "dominio de direccionamiento de reactivo". De acuerdo con la descripción de WO 00/26408 A2 un dominio de direccionamiento de reactivo sirve para dirigir el reactivo (un constructo intacto) a una porción diferente de la célula; la liberación de la porción diferente de la célula es un indicio de la escisión que libera la primera secuencia señal.

La solicitud de patente de los Estados Unidos US 2013/065259 A1 describe ensayos convencionales de inmunocaptura, que utilizan anticuerpos inmovilizados dirigidos a neurotoxinas botulínicas para capturar dichas neurotoxinas y la caracterización de la actividad proteolítica de neurotoxinas sobre la fase sólida después de una etapa de lavado.

Cuando una definición o uso de un término en una referencia es inconsistente o contrario a la definición de ese término proporcionado en la presente, se aplica la definición de ese término proporcionado en la presente y la definición de ese término en la referencia no se aplica.

Por lo tanto, se necesitan composiciones y métodos mejorados para proporcionar una caracterización rápida y precisa de las BoNT y las actividades de BoNT.

Breve descripción de la invención

La presente invención proporciona un constructo reportero de acuerdo con la reivindicación 1 y un método de acuerdo con la reivindicación 10. El constructo o método puede usarse en ensayos que detectan neurotoxinas botulínicas (BoNT). El constructo de acuerdo con la reivindicación 1 incluye al menos dos ejemplos del mismo reportero, tal como un fluoróforo o cromóforo. El constructo incluye un sitio de anclaje que une el constructo a una membrana celular y/o vesicular, que a su vez proporciona protección del reportero de una actividad degradativa en el citosol. El constructo también incluye un sitio de escisión que separa el sitio de anclaje de al menos uno de los reporteros y también sirve como un sustrato para una actividad enzimática (por ejemplo, actividad proteasa). La actividad enzimática en el sitio de escisión libera el reportero del constructo; la degradación posterior de los reporteros en el citosol da como resultado un cambio medible a partir de una señal de línea base que es proporcional a la actividad enzimática.

Las modalidades del concepto de la invención incluyen un constructo reportero que puede usarse para caracterizar una actividad enzimática (por ejemplo, la actividad de una neurotoxina botulínica), y las células que incluyen un ácido nucleico que codifica un constructo reportero tal. El constructo reportero incluye un dominio de anclaje a

membrana que interactúa con una membrana de una célula (por ejemplo, una membrana plasmática o una membrana vesicular), un dominio reportero que incluye dos o más apariciones de un péptido generador de señal (por ejemplo, una secuencia peptídica que corresponde a una proteína fluorescente o que tiene al menos 80 % de identidad de secuencia con la Proteína Fluorescente Verde), y un sitio de escisión que se localiza entre el sitio de anclaje a membrana y el dominio reportero. Los péptidos generadores de señal producen señales indistinguibles, y la señal total producida por el dominio reportero es un agregado de estas señales individuales aún indistinguibles. El sitio de escisión incluye un péptido que es susceptible a escisión por la actividad enzimática (por ejemplo una proteína SNARE o un fragmento de esta), y tal escisión da como resultado la liberación del dominio reportero en el citoplasma. Tales sitios de escisión pueden seleccionarse para que sean susceptibles a la escisión por más de una enzima (por ejemplo, BoNT/A y BoNT/E). El dominio reportero experimenta eventos degradativos después de la liberación en el citoplasma, con eventos degradativos separados que provocan una pérdida de señal de cada uno de los péptidos generadores de señal y que dan como resultado una pérdida gradual de la señal agregada del dominio reportero. En algunas modalidades un péptido enlazador se interpone entre los péptidos generadores de señal. En una modalidad preferida del concepto de la invención, el constructo puede escindirse por más de una enzima, y muestra un sesgo reducido con respecto a la susceptibilidad de la escisión por una actividad enzimática (por ejemplo BoNT/A) sobre una segunda actividad enzimática (por ejemplo BoNT/E) en relación con un constructo análogo que tiene un dominio reportero con un péptido generador de señal único. En algunas modalidades el constructo reportero incluye un dominio reportero auxiliar que proporciona una señal que es distinguible de la del dominio reportero.

De acuerdo con la presente invención, se proporciona un método de acuerdo con la reivindicación 10 para caracterizar una actividad enzimática proporcionando una célula que expresa el constructo reportero de acuerdo con la reivindicación 1, poniendo en contacto la célula con una muestra con sospecha de incluir la actividad enzimática, y observando una disminución de una señal generada por el constructo reportero en presencia de la actividad enzimática. El constructo reportero incluye un dominio de anclaje a membrana que interactúa con una membrana de una célula (por ejemplo, una membrana plasmática o una membrana vesicular), un dominio reportero que incluye dos o más apariciones de un péptido generador de señal (por ejemplo, una secuencia peptídica que corresponde a una proteína fluorescente y/o que tiene al menos 80 % de identidad de secuencia con la Proteína Fluorescente Verde), y un sitio de escisión que se localiza entre el sitio de anclaje a membrana y el dominio reportero. Los péptidos generadores de señal producen señales indistinguibles, de manera que la señal total producida por el dominio reportero es un agregado de estas señales individuales aún indistinguibles. El sitio de escisión incluye un péptido que es susceptible a escisión por la actividad enzimática (por ejemplo una proteína SNARE o un fragmento de esta), y tal escisión da como resultado la liberación del dominio reportero en el citoplasma. El dominio reportero experimenta eventos degradativos después de la liberación en el citoplasma, con eventos degradativos separados que provocan una pérdida de señal de cada uno de los péptidos generadores de señal y que dan como resultado una pérdida gradual de la señal agregada del dominio reportero. En algunas modalidades la señal agregada del dominio reportero es observable después de la pérdida de la señal de uno de los péptidos generadores de señal a partir de un evento degradativo. En una modalidad preferida del concepto de la invención, el constructo puede escindirse por más de una enzima, y muestra un sesgo reducido con respecto a la susceptibilidad de la escisión por una actividad enzimática (por ejemplo BoNT/A) sobre una segunda actividad enzimática (por ejemplo BoNT/E) en relación con un constructo análogo que tiene un dominio reportero con un péptido generador de señal único.

En algunos métodos del concepto de la invención se proporciona una señal de referencia que es distinguible de la señal proporcionada por el dominio reportero y puede utilizarse para la normalización de la señal a partir del dominio reportero del constructo reportero. En algunas modalidades se proporciona la señal de referencia mediante la inclusión de un reportero auxiliar con el constructo, donde el reportero auxiliar produce una señal distinguible a partir del dominio reportero y no se afecta por la actividad enzimática. En otras modalidades se proporciona la señal de referencia mediante poniendo en contacto la célula con un colorante de células (por ejemplo un colorante de membranas o un colorante de núcleo/nuclear). Tal colorante de células puede ponerse en contacto con la célula antes, durante, o después de poner en contacto la célula con la actividad enzimática.

Breve Descripción de los Dibujos

Las figuras 1A a 1D representan esquemáticamente los constructos del concepto de la invención y muestran los resultados típicos. Las figuras 1A a 1C representan esquemáticamente los constructos del concepto de la invención que tienen dos péptidos reporteros idénticos en varias configuraciones. La figura 1D muestra los resultados típicos de un ensayo basado en células para dos neurotoxinas *botulínicas* diferentes (BoNT/A, BoNT/E), utilizando un reportero configurado como se muestra en la figura 1A. Los resultados también se muestran para células que expresan un constructo análogo que porta un reportero único. Sorprendentemente, el sesgo entre la sensibilidad de BoNT/A y de BoNT/E se reduce dramáticamente en células que expresan el constructo del concepto de la invención.

Las figuras 2A a 2K representan esquemáticamente constructos del concepto de la invención que incluyen dos reporteros idénticos y un tercer reportero, idéntico.

La figura 3 representa un ensayo basado en células de la invención en el que el constructo incluye un dominio de anclaje a membrana celular.

La figura 4 representa un ensayo basado en células de la invención en el cual el constructo incluye un dominio de anclaje a membrana vesicular.

La figura 5 muestra una metodología de ensayo de la invención.

5 La figura 6 muestra una metodología de ensayo alternativa de la invención.

La figura 7 muestra los espectros de excitación y emisión de una proteína fluorescente(eYFP) y un colorante secundario,

10 La figura 8 representa esquemáticamente un método de ensayo del concepto de la invención que incorpora el uso de un colorante secundario.

Las figuras 9A y 9B muestran los datos ilustrativos de un ensayo del concepto de la invención, en ausencia de la corrección y con la normalización de los datos mediante el uso de un colorante secundario, respectivamente.

15 La figura 9C muestra las fotomicrografías producidas mediante el uso de microscopía fluorescencia y de campo claro de células que expresan un constructo del concepto de la invención, en ausencia y en presencia de una toxina *botulínica* correspondiente.

20 Descripción detallada

Las modalidades del concepto de la invención utiliza una o más células que incluyen un constructo (por ejemplo introducido mediante la expresión después de la transfección y/o la microinyección) que incluye los componentes que secuestran una porción o región reportera observable en una región protegida y una región sensible a analito.

25 La porción reportera puede incluir dos o más reporteros idénticos. Tales regiones protegidas pueden estar cerca de una membrana celular y/o una membrana vesicular. La interacción de la región sensible a analito con el analito da como resultado la liberación del reportero de la región protegida mediante un evento de escisión, que - de acuerdo con la presente invención - da como resultado la degradación del reportero y un cambio observable en la señal del reportero. Los ejemplos de analitos pueden incluir enzimas proteolíticas, y en tales casos la región sensible a analito puede ser un sitio de escisión que puede servir como un sustrato enzimático.

Varios objetos, características, aspectos y ventajas de la materia de la invención se harán más evidentes a partir de la siguiente descripción detallada de modalidades preferidas, junto con las figuras de los dibujos adjuntas en las que los mismos números representan los mismos componentes.

35 Las modalidades del concepto de la invención incluyen los métodos en los que tales constructos se expresan en células, que se exponen posteriormente a un analito de interés (por ejemplo, una toxina de *Clostridium botulinum* y/o de *Clostridium tetani*). Tales células pueden ser células con división bloqueada. Debería apreciarse que la disposición y la composición de constructos novedosa del concepto de la invención tienen un impacto directo en el mecanismo y en las características de rendimiento de tales ensayos. En modalidades preferidas de la descripción, la exposición al analito de interés da como resultado un evento de escisión en una región o dominio del constructo sensible al analito, que da como resultado la liberación de un fragmento de constructo que incluye una región reportera que porta dos o más regiones generadoras de señales idénticas (por ejemplo un par de fluoróforos idénticos) cada uno de los cuales genera una señal detectable. A diferencia de constructos y métodos que utilizan fluoróforos dispuestos como pares FRET (por ejemplo, diferentes fluoróforos dispuestos como pares hetero-FRET y/o fluoróforos similares o idénticos dispuestos como pares homo-FRET), cada una de las regiones generadoras de señal de un reportero liberado como un fragmento de constructo contribuye directamente a una señal agregada detectable tanto antes como inmediatamente después del evento de escisión. Por ejemplo, en algunas modalidades una señal agregada tal puede ser una suma aproximada (u otra función) de la señal observada a partir de cada una de las regiones generadoras de señal. En constructos y ensayos del concepto de la invención el cambio de la señal detectable que forma la base de la detección es el resultado de múltiples eventos de degradación que se producen en el citosol después del evento de escisión, como la pérdida de uno de un par de regiones generadoras de señal idénticas (por ejemplo, un par de fluoróforos esencialmente idénticos) que todavía proporcionan un fragmento de reportero emisor. En un constructo que utiliza un único reportero, un único evento de degradación que se produce en un fragmento de constructo liberado puede dar como resultado la fragmentación del único reportero y la pérdida de la señal detectable. De manera similar, en constructos que utilizan reporteros duplicados en los que la señal detectable es un resultado de la interacción entre los reporteros (por ejemplo, un constructo que utiliza un par de fluoróforos dispuestos para formar hetero-FRET y/o homo-FRET) la fragmentación de una región generadora de señal única debido a un evento de degradación único también da como resultado una pérdida de la señal detectable a partir de ese constructo.

Por el contrario, un fragmento que contiene reportero generado por un evento de escisión dirigido a un constructo del concepto de la invención que se configura para liberar dos o más regiones generadoras de señal idénticas/indistinguibles después del evento de escisión puede continuar para proporcionar una señal detectable después de un evento de degradación único que se produce en una de las apariciones de la región generadora de señal. Ya que se necesitan múltiples eventos de degradación para detener la generación de señal detectable por el

fragmento de escisión de constructos, la señal detectable disminuye con el aumento de la concentración de analitos pero persiste (en relación con los constructos reporteros únicos o los constructos que dependen de reporteros emparejados para la generación de señal) a altas concentraciones de analito. Esto puede dar como resultado un intervalo dinámico mejorado para ensayos basados en los constructos del concepto de la invención.

Los componentes de un constructo del concepto de la invención pueden disponerse en una variedad de formas. La siguiente descripción incluye una serie de ejemplos en los que los dominios funcionales de un constructo reportero, por ejemplo, un ancla de membrana (A), un sitio de escisión (B), múltiples apariciones de una región/reportero primario generador de señal (C, C'), y en algunos ejemplos un reportero secundario (D) se representan como unidos en varias disposiciones por las regiones enlazadoras o enlazadores (-). Debería apreciarse que, en las siguientes figuras y sus descripciones, la presencia de estos enlazadores puede considerarse opcional. Como tal, en las modalidades de la descripción, pueden omitirse una o más porciones descritas como un enlazador. En algunas modalidades las regiones enlazadoras del concepto de la invención también pueden incluir porciones de una región funcional que no están implicadas en la función de esa región. Por ejemplo, si un reportero es un fluoróforo de proteína un enlazador puede ser una porción de la secuencia del fluoróforo de proteína que no está implicada directamente en la fluorescencia. De manera similar, un enlazador puede ser una porción de la secuencia del sitio de escisión que no sirve directamente como un sustrato de proteasa. Alternativamente, en otras modalidades de la descripción un enlazador puede ser una secuencia peptídica sintética o modificada genéticamente, que puede diseñarse, por ejemplo, para reducir FRET (es decir, homo-FRET y/o heter-FRET) entre las regiones generadoras de señal a niveles no útiles (por ejemplo, menos de aproximadamente 5 %). Una secuencia peptídica sintética tal puede ser una secuencia flexible, una secuencia rígida, o una secuencia con porciones tanto flexibles como rígidas. Las sec. con núm. de ident. 1, sec. con núm. de ident. 2, sec. con núm. de ident. 3, sec. con núm. de ident. 4, sec. con núm. de ident. 5, sec. con núm. de ident. 6, sec. con núm. de ident. 7, sec. con núm. de ident. 8, y sec. con núm. de ident. 9 muestran secuencias enlazadoras sintéticas ilustrativas. En algunos aspectos descritos una región enlazadora puede incluir apariciones repetidas de tales secuencias enlazadoras (por ejemplo, en una disposición de tipo concatenadora) para proporcionar la longitud deseada, flexibilidad, y/u otras características estructurales deseadas. Debe apreciarse que, como se usa en la presente descripción, el término "enlazador" no denota un sitio de escisión que es escindido por un analito enzimático, sino más bien una región estructural que se une a otras regiones funcionales de un constructo reportero.

En algunos aspectos descritos la región que contiene reportero puede contener al menos dos ejemplos de un reportero primario que es un fluoróforo y/o un cromóforo. En algunas modalidades de la descripción dos ejemplos de un reportero primario tienen la misma secuencia aminoacídica. En otras modalidades, dos ejemplos de un reportero primario pueden tener diferentes composiciones pero tener espectros de excitación y emisión sustancialmente similares (es decir, que exhiben un solapamiento mayor que o igual a 80 %). En modalidades preferidas un reportero primario puede ser una proteína fluorescente, por ejemplo la Proteína Fluorescente Verde (sec. con núm. de ident. 10) o un péptido que tiene al menos 80 % de identidad de secuencia con la secuencia de la Proteína Fluorescente Verde. Los fluoróforos de proteínas fluorescentes adecuados incluyen la Proteína Fluorescente Amarilla (por ejemplo eYFP, sec. con núm. de ident. 11), la Proteína Fluorescente Roja, la Proteína Fluorescente Ciano (sec. con núm. de ident. 12), mBanana, mStrawberry, mCherry, tdTomato, J-Red, monómero DsRed, mCitrine, Venus (sec. con núm. de ident. 13), proteína YPet, Emerald, EGFP, CyPet, mCFPm, Cerulean, mPlum, mOrange, mKO, T-Sapphire, un derivado de la Proteína Fluorescente Amarilla, un derivado de mCitrine, un derivado de Venus, un derivado de proteína YPet, y/o la variante de Proteína Fluorescente Verde. En una modalidad especialmente preferida, un reportero primario puede ser un derivado monomérico de proteína fluorescente de la Proteína Fluorescente Verde de *Aequorea victoria*, tal como Sirius, Azurite, EBFP2, TagBFP, mTurquoise, ECFP, Cerulean, TagCFP, mTFP1, mUkG1, mAG1, AcGFP1, TagGFP2, EDFP, mWasabi, EmGFP, TagYFP, eYFP (sec. con núm. de ident. 11), Topaz, SYFP2, Venus, Citrine, mKO, mKO2, mOrange, mOrange2, TagRFP, TagRFP-T, mStrawberry, mRuby, mCherry, mRaspberry, mKate2, mPlum, mNeptune, T-Sapphire, mAmetrine, y/o mKeima (ver "Fluorescent Proteins and Their Applications in Imaging Living Cells and Tissues" (Chudakov, D.M. y otros, *Physiol. Rev.* 90:1103-1163,2010). De manera similar, los reporteros primarios adecuados pueden ser fluoróforos de proteínas derivados de la Proteína Fluorescente Verde de *Aequorea victoria* que incluyen una mutación A206K. Alternativamente, un reportero primario puede ser un no-fluoróforo y/o un no-cromóforo, por ejemplo un apagador de la fluorescencia.

Dentro de los constructos de la descripción la disposición de los reporteros primarios dentro de la porción que contiene reportero puede ser de manera que se encuentren los suficientemente distante entre sí y/o se orienten de manera que exhiban transferencia de energía FRET (por ejemplo, homo-FRET) no útil (es decir, menos del 5 %). Los bajos niveles contemplados de transferencia de energía homo-FRET pueden ser menores o iguales a aproximadamente 1 %, menores que o iguales a aproximadamente 0,1 %, menores que o iguales a aproximadamente 0,01 %, y/o menores que o iguales a aproximadamente 0,001 % de transferencia de energía entre fluoróforos. De manera similar, los bajos niveles contemplados de transferencia de energía homo-FRET pueden ser menores que o iguales a aproximadamente 10 %, menores que o iguales a aproximadamente 1 %, menores que o iguales a aproximadamente 0,1 %, menores que o iguales a aproximadamente 0,01 %, y/o menores que o iguales a aproximadamente el 0,001 % del ruido de fondo de la señal observable. Alternativamente, en algunas modalidades del constructo de la invención, los reporteros primarios 120, 130 pueden disponerse de manera que exhiban significativa transferencia de energía homo-FRET (es decir, mayor que aproximadamente 1 %). Tales fenómenos pueden controlarse mediante el uso de la longitud de un enlazador o región enlazadora interpuesta entre tales

reporteros primarios. En algunas modalidades del concepto de la invención un enlazador tal puede tener una longitud de 20, 30, 40 50 o más aminoácidos. De manera similar, un enlazador tal puede tener una dimensión lineal de al menos aproximadamente 4, aproximadamente 6, aproximadamente 8, aproximadamente 10, aproximadamente 15, aproximadamente 20 o más nanómetros cuando el constructo está en su estado nativo, plegado.

Se contempla que un reportero primario de un constructo de la descripción puede incluir más de una porción fluorescente. Por ejemplo, un par de fluoróforos con diferentes pero solapados espectros de excitación y emisión pueden disponerse como un par FRET que actúa como un ejemplo único de un reportero primario. De manera similar, un par de fluoróforos idénticos podrían disponerse como un par homo-FRET que actúa como un ejemplo único de un reportero primario (por ejemplo, como se detecta mediante anisotropía de fluorescencia). Por ejemplo, en una modalidad tal un constructo reportero podría incluir un par de fluoróforos primarios, donde cada fluoróforo primario incluye dos fluoróforos con diferentes peros solapados espectros de excitación y emisión dispuestos como un par hetero-FRET. Alternativamente, en una modalidad tal un constructo reportero podría incluir un par de fluoróforos primarios, donde cada fluoróforo primario incluye dos fluoróforos con espectros de excitación y emisión similares o idénticos dispuestos como un par homo-FRET.

Como se notó anteriormente, los dominios de un constructo de la descripción pueden disponerse en una variedad de formas. Una modalidad preferida de la descripción que puede caracterizarse como una disposición A-B-C-C', se muestra esquemáticamente en la Figura 1A. Un constructo reportero tal puede incluir un ancla de membrana 170 que se enlaza a un sitio de escisión 160 mediante un enlazador de ancla/sitio de escisión interpuesto 150. El sitio de escisión se enlaza a su vez a un primer ejemplo de un par de reporteros primarios idénticos 120 mediante un enlazador de reportero/sitio de escisión 165. Este primer ejemplo de un par de reporteros primarios idénticos 120 se enlaza a un segundo ejemplo de un par de reporteros primarios idénticos 130 mediante un enlazador de reportero primario/reportero primario interpuesto 140. En una modalidad tal la región que contiene reportero puede contener al menos dos ejemplos de un reportero primario. Un ejemplo de un constructo reportero que tiene una estructura tal se muestra en la sec. con núm. de ident. 14.

Una disposición alternativa del constructo reportero (que puede caracterizarse como A-C-B-C') se muestra esquemáticamente en la Figura 1B, en la que un ancla de membrana 170 se enlaza a un primer ejemplo de un par de reporteros primarios idénticos 120 mediante un enlazador de ancla/reportero primario interpuesto 125. El primer ejemplo de un par de reporteros primarios idénticos 120 se enlaza a un sitio de escisión 160 mediante un primer enlazador de sitio de escisión/fluoróforo 165A. El sitio de escisión 160 se enlaza además a un segundo ejemplo de un par de reporteros primarios idénticos 130 mediante un enlazador secundario de sitio de escisión/fluoróforo 165B. La emisión de un reportero 120 bloqueado tal puede usarse, por ejemplo, como una señal de línea base o de normalización.

Otra disposición alternativa del constructo reportero (que puede caracterizarse como C-A-B-C') se muestra en la Figura 1C, en la que un primer ejemplo de un par de reporteros primarios idénticos 120 se enlaza a una porción de ancla de membrana 170 mediante un enlazador de ancla/reportero primario interventor 125. El ancla de membrana 170 se enlaza además a un sitio de escisión 160 mediante un enlazador de ancla/sitio de escisión 150. El sitio de escisión 160 se enlaza, a su vez, a un segundo ejemplo de un par de reporteros primarios idénticos 130 mediante un enlazador de sitio de escisión/reportero 165. La emisión de un reportero 120 tal puede usarse, por ejemplo, como una señal de línea base o de normalización. Aunque se muestra una representación de esta configuración, debería apreciarse que el enlazador de reportero 140 puede colocarse en cualquier lado del sitio de escisión 160 en una modalidad tal.

En las configuraciones del constructo mostradas en la Figura 1A, Figura 1B, y Figura 1C la hidrólisis del sitio de escisión 160, por ejemplo mediante una proteasa, da como resultado la liberación de uno o más reporteros primarios 120, 130 del dominio de anclaje a membrana 170. El sitio de escisión, por lo tanto, determina al menos parcialmente la especificidad de los ensayos basados en tales constructos para actividades enzimáticas específicas, y preferentemente incluye los sitios de hidrólisis donde la actividad enzimática da como resultado la escisión del esqueleto peptídico del constructo y los sitios de reconocimiento que proporcionan sitios de interacción con la enzima y confieren al menos una porción de especificidad a sustrato. En algunas modalidades el sitio de escisión puede incluir regiones que interactúan con exositos o sitios alostéricos de una enzima objetivo. En modalidades preferidas del concepto de la invención el sitio de escisión es susceptible a escisión por una actividad proteasa de la neurotoxina de *Botulinum* BoNT, por ejemplo BoNT/A, BoNT/B, BoNT/C, BoNT/D, BoNT/E, BoNT/F, y/o BoNT/G. Se contempla que una secuencia del sitio de escisión puede seleccionarse o diseñarse para proporcionar sitios de escisión y reconocimiento durante dos o más BoNT diferentes (por ejemplo, BoNT/A y BoNT/E). En algunas modalidades el sitio de escisión puede incluir secuencias intactas o secuencias derivadas de una proteína SNARE, tal como una proteína asociada a sinaptosomas (por ejemplo, SNAP-25; sec. con núm. de ident. 10), una proteína de membrana asociada a vesícula (por ejemplo, VAMP o sinaptobrevina; sec. con núm. de ident. 11), y/o secuencias derivadas de una syntaxina. Los ejemplos de secuencias adecuadas de sitio de escisión incluyen la sec. con núm. de ident. 15, sec. con núm. de ident. 16, sec. con núm. de ident. 17, y sec. con núm. de ident. 18.

Como se notó anteriormente, la liberación de un dominio de anclaje a membrana puede permitir que uno o más reporteros primarios difundan desde una región protegida. Tales regiones protegidas pueden incluir la proximidad a

una membrana celular y/o a una membrana vesicular. Con ese fin, un dominio de anclaje puede incluir un péptido que se localiza en la membrana celular y/o un péptido que se localiza en la membrana vesicular. Una región de anclaje tal puede incluir una región transmembrana en la que al menos una porción de la cadena peptídica entra y/o pasa a través de una membrana de la célula. Alternativamente, una región de anclaje puede incluir un sitio de palmitoilación que, después del procesamiento postraduccional por la célula, proporciona un sitio que interactúa con una membrana de la célula. Alternativamente, un sitio de anclaje a membrana puede incluir una secuencia peptídica que interactúa con un receptor o ligando de unión a membrana. En algunas modalidades de la descripción un dominio de anclaje puede incluir secuencias derivadas de una sinaptobrevina (por ejemplo un péptido transmembrana de sinaptobrevina) y/o de SNAP-25 (por ejemplo una región de palmitoilación de SNAP-25). En otras modalidades de la descripción un dominio de anclaje a membrana puede ser una syntaxina o un fragmento de syntaxina.

Como se notó anteriormente, una vez liberados de una región de anclaje 170, los reporteros primarios pueden difundir en el citosol. El uso de dos o más reporteros primarios proporciona un número de ventajas técnicas. Las ventajas de los constructos que liberan dos o más reporteros primarios tras la escisión se describen anteriormente. Otras ventajas incluyen la capacidad de utilizar niveles de expresión más bajos del constructo (que minimiza de esta manera el riesgo de toxicidad y/o agregación de constructos) y/o la capacidad de utilizar muchas menos células en un ensayo basado en células. Además, la señal relativamente fuerte generada por múltiples reporteros primarios puede proporcionar mediciones de línea base más estables y reproducibles, que también sirven para aumentar la sensibilidad del ensayo al permitir una diferenciación más robusta de la señal de ruido. Debe señalarse que investigadores anteriores (A.G. von Armin, X.W. Deng, y M.G. Stacey; Gene 221 (1998), páginas 35-43) han utilizado constructos incorporando dos o más conjuntos de las secuencia de la Proteína Fluorescente Amarilla como marcadores para la expresión génica pero descubrieron fluorescencia clara en todas las células, tales constructos no pudieron demostrar los eventos degradativos que no son solamente característicos de los constructos de la descripción sino que son necesarios para su utilización en el ensayo basado en células.

Sorprendentemente, los inventores han descubierto que los constructos con regiones reporteras que incluyen múltiples reporteros primarios pueden proporcionar una selectividad diferente entre objetivos enzimáticos en comparación con constructos análogos en los que la región reportera contiene una aparición única de un reportero primario. Un ejemplo de esto se encuentra en la Figura 1D, que muestra datos comparativos para la respuesta de los ensayos basados en células a BoNT/A y a BoNT/E, donde las células incluyen un constructo de la descripción que incluye dos fluoróforos de proteína eYFP en una disposición A-B-C' o un constructo análogo que incluye un fluoróforo de proteína eYFP único en una disposición A-B-C. Tanto BoNT/A como BoNT/E reconocen y escinden el sitio de escisión de ambos constructos, sin embargo, el constructo de fluoróforo único tiene un sesgo de aproximadamente 80 veces (es decir, aproximadamente 80 veces mejor sensibilidad, como se expresa en términos de EC₅₀) para la neurotoxina BoNT/A sobre la neurotoxina BoNT/E (ver la figura 1D, 37 °C). El mismo estudio realizado mediante el uso de células que expresan el constructo reportero "fluoróforo dual" (es decir, el constructo que porta dos fluoróforos de eYFP) mostró sensibilidad similar a BoNT/A, pero sensibilidad aumentada a BoNT/E, lo que reduce el sesgo del ensayo a 26 veces. Esta reducción del sesgo del ensayo permite ventajosamente que el mismo constructo se use para ensayos dirigidos a más de un analito enzimático. Sin pretender unirse a ninguna teoría, los inventores creen que el uso de secuencias peptídicas fluorescentes adicionales imparte una estructura terciaria al constructo que proporciona un acceso mejorado a un mayor número de sitios de reconocimiento dentro del dominio de escisión del constructo.

En algunas modalidades de la descripción un constructo reportero puede incluir, además de dos o más reporteros primarios, un reportero secundario que difiere de los reporteros primarios. El reportero secundario puede tener una estructura química distinta o diferente a la de los reporteros primarios. Un reportero secundario tal puede tener un espectro de emisión que solapa el espectro de excitación de un reportero primario. En una modalidad tal el constructo puede disponerse de manera que se produce una FRET significativa (es decir, mayor que aproximadamente 1 %) entre un reportero secundario y un reportero primario. En una modalidad preferida el reportero secundario es una proteína fluorescente, tal como la Proteína Fluorescente Amarilla, la Proteína Fluorescente Roja, la Proteína Fluorescente Ciano, la Proteína Fluorescente Verde, mBanana, mStrawberry, mCherry, tdTomato, J-Red, monómero de DsRed, mCitrine, Venus, proteína YPet, Emerald, EGFP, CyPet, mCFPm, Cerulean, mPlum, mOrange, mKO, T-Sapphire, un derivado de la Proteína Fluorescente Amarilla, un derivado de mCitrine, un derivado de Venus, un derivado de proteína YPet, y/o a la variante de Proteína Fluorescente Verde.

Preferentemente, el constructo reportero puede disponerse de manera que no se produce una FRET significativa o útil (es decir, el grado de FRET que se produce es menor que o igual a 5 %) entre el reportero secundario y un reportero primario. La disposición del reportero secundario y al menos uno de los reporteros primarios dentro del constructo reportero puede ser de manera que estén lo suficientemente distantes entre sí que muestren una FRET esencialmente no útil (es decir, menor que o igual a 5 %). Los niveles no útiles contemplados de la transferencia de energía FRET puede ser menor que o igual a aproximadamente 10 %, menor que o igual a aproximadamente 5 %, menor que o igual a aproximadamente 1 %, o menor que o igual a aproximadamente 0,1 % de la fluorescencia de fondo asociada. Esto puede lograrse al seleccionar un enlazador que proporciona una distancia suficiente entre el reportero secundario y un reportero primario. En algunas modalidades de la descripción un enlazador tal puede tener una longitud de 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65 o más aminoácidos. De manera similar, el un enlazador entre

dos reporteros primarios tiene una longitud de al menos aproximadamente 4, aproximadamente 6, aproximadamente 8, aproximadamente 10, aproximadamente 15, aproximadamente 20 o más nanómetros cuando el constructo se encuentra en su estado nativo, plegado. Los enlazadores adecuados pueden incluir péptidos sintéticos, y tales péptidos pueden ser péptidos flexibles, péptidos rígidos o pueden incluir porciones tanto flexibles como rígidas.

5 En algunas modalidades de la descripción una señal o emisión de un reportero secundario puede utilizarse como una referencia o como datos de normalización útiles para ajustar o normalizar una señal observada de uno o más reporteros de la porción que contiene reportero, mejorando de esta manera la precisión y/o la sensibilidad de un ensayo que utiliza un constructo tal. En otras modalidades una señal o emisión de un reportero secundario puede
10 utilizarse mediante un sistema de reconocimiento de imágenes para identificar la ubicación dentro de una imagen adquirida en donde una reacción del ensayo puede tener lugar, simplificando de esta manera la adquisición de datos.

15 Un ejemplo de una modalidad que incluye un reportero secundario tal (que puede caracterizarse por tener la estructura A-D-B-C-C', donde "D" representa el reportero secundario) se muestra esquemáticamente en la Figura 2A. En un constructo reportero tal un ancla de membrana 270 se enlaza a un reportero secundario 280 mediante un enlazador de ancla/reportero secundario intermedio 285. El reportero secundario 280 se enlaza además a un sitio de escisión 260 mediante un enlazador de reportero secundario/sitio de escisión 255. El sitio de escisión 260 se enlaza,
20 a su vez, a un primer ejemplo de un par de reporteros primarios idénticos 220 mediante un enlazador de sitio de escisión/reportero primario 265, y el primer ejemplo de un par de reporteros primarios idénticos 220 y el segundo ejemplo de un par de reporteros primarios idénticos 230 se unen mediante un enlazador de reportero primario/reportero primario intermedio 240.

25 Una modalidad alternativa de un constructo reportero con dos o más reporteros primarios y al menos un reportero secundario (que puede describirse como D-A-B-C-C') se representa esquemáticamente en la Figura 2B. En esta modalidad un reportero secundario 280 se acopla a un ancla de membrana 270 mediante un enlazador de ancla/reportero secundario intermedio 285. El ancla de membrana 270 se enlaza a su vez a un sitio de escisión 260 mediante un enlazador de ancla/sitio de escisión 250. El par de reporteros primarios idénticos 220, 230, que se unen mediante un enlazador de reportero primario/reportero primario 240 se unen a su vez al sitio de escisión 260
30 mediante un enlazador de sitio de escisión/reportero primario 265.

35 La Figura 2C representa esquemáticamente una modalidad de un constructo reportero (que puede describirse como C-D-A-B-C') en la que un primer ejemplo de un par de reporteros primarios idénticos 220 se une a un reportero secundario 280 mediante un enlazador de reportero primario/reportero secundario 275. El reportero secundario 280 se acopla a su vez a un ancla de membrana 270 mediante un enlazador de ancla/reportero secundario intermedio 275. El ancla de membrana 270 se une además a un sitio de escisión 260, con un enlazador de ancla/sitio de escisión 250 interpuesto entre ellos. Un segundo ejemplo de un par de reporteros primarios idénticos 230 se acopla además al sitio de escisión 260 mediante un enlazador de sitio de escisión/reportero primario 265.

40 La Figura 2D representa esquemáticamente una modalidad de un constructo reportero (que puede describirse como D-C-A-B-C') en la que un reportero secundario 280 se une a un primer ejemplo de un par de reporteros primarios idénticos 220 mediante un enlazador de reportero primario/reportero secundario 275. El primer ejemplo de un par de reporteros primarios idénticos 220 se acopla a su vez al ancla de membrana 270, con un enlazador de ancla/reportero primario 245 interpuesto entre ellos. El ancla de membrana 270 se une además a un sitio de escisión
45 260 mediante un enlazador de ancla/sitio de escisión 250. Un segundo ejemplo de un par de reporteros primarios idénticos 230 se acopla al sitio de escisión 260 mediante un enlazador de sitio de escisión/reportero primario interpuesto 240.

50 La Figura 2E representa esquemáticamente una modalidad de un constructo reportero (que puede describirse como A-D-C-B-C') en la que un ancla de membrana 270 se une a un reportero secundario 280 mediante un enlazador de ancla/reportero secundario 285. El reportero secundario 280 se acopla además a un primer ejemplo de un par de reporteros primarios idénticos 220 mediante un enlazador de reportero primario/reportero secundario intermedio 275. El primer ejemplo de un par de reporteros primarios idénticos 220 se acopla a su vez a un sitio de escisión 260 mediante un enlazador de sitio de escisión/reportero primario 265A. El segundo ejemplo de un par de reporteros primarios idénticos 230 se une además a este sitio de escisión 260 mediante otro enlazador de sitio de escisión/reportero primario 265B.
55

60 La Figura 2F representa esquemáticamente una modalidad de un constructo reportero (que puede describirse como A-C-D-B-C') en la que un ancla de membrana 270 se une a un primer ejemplo de un par de reporteros primarios idénticos 220 mediante un enlazador de ancla/reportero primario interpuesto 245. Un reportero secundario 280 se acopla además al primer ejemplo de un par de reporteros primarios idénticos 220 mediante un enlazador de reportero primario/reportero secundario 275. Este reportero secundario 280 se enlaza a un sitio de escisión 260 mediante un enlazador de reportero secundario/sitio de escisión 255. Posteriormente, el sitio de escisión 260 se une a un segundo ejemplo de un par de reporteros primarios idénticos 230 mediante un enlazador de sitio de escisión/reportero primario 265.
65

La Figura 2G representa esquemáticamente una modalidad de un constructo reportero (que puede describirse como A-C-B-C'-D) en la que un ancla de membrana 270 se acopla a un primer ejemplo de un par de reporteros primarios idénticos 220 mediante un enlazador de ancla/reportero primario 245. Este primer ejemplo de un par de reporteros primarios idénticos 220 se une a un sitio de escisión 260 mediante un primer enlazador de sitio de escisión/reportero primario 265A. El sitio de escisión 260 se une además a un segundo ejemplo de un par de reporteros primarios idénticos 230 mediante un segundo enlazador de sitio de escisión/reportero primario 265B. Un reportero secundario 280 se acopla además al segundo ejemplo de un par de reporteros primarios idénticos 230 mediante un enlazador de reportero primario/reportero secundario intermedio 275.

La Figura 2H representa esquemáticamente una modalidad de un constructo reportero (que puede describirse como A-C-B-D-C') en la que un ancla de membrana 270 se acopla a un primer ejemplo de un par de reporteros primarios idénticos 220 mediante un enlazador de ancla/reportero primario 245. Este primer ejemplo de un par de reporteros primarios idénticos 220 se une a un sitio de escisión 260 mediante un enlazador de sitio de escisión/reportero primario 265. El sitio de escisión 260 se une además a un reportero secundario 280 mediante un enlazador de reportero secundario/sitio de escisión 255. Un segundo ejemplo de un par de reporteros primarios idénticos 230 se acopla además al reportero secundario 280, mediante un enlazador de reportero primario/reportero secundario intermedio 275.

La Figura 2I representa esquemáticamente una modalidad de un constructo reportero (que puede describirse como A-B-C-D-C') en la que un ancla de membrana 270 se acopla a un sitio de escisión 260 mediante un enlazador de ancla/sitio de escisión 250. Este sitio de escisión 260 se une a un primer ejemplo de un par de reporteros primarios idénticos 220 mediante un enlazador de sitio de escisión/reportero primario 265. Este primer ejemplo de un par de reporteros primarios idénticos 220 se une además a un reportero secundario 280 mediante un primer enlazador de reportero primario/reportero secundario 275A. Un segundo ejemplo de un par de reporteros primarios idénticos 230 se une además al reportero secundario 280 mediante un segundo enlazador de reportero primario/reportero secundario 275B.

La Figura 2J representa esquemáticamente una modalidad de un constructo reportero (que puede describirse como C-A-B-D-C') en la que un primer ejemplo de un par de reporteros primarios idénticos 220 se une a un ancla de membrana 270 mediante un enlazador de ancla/reportero primario interpuesto 245. El ancla de membrana 270 se acopla además a un sitio de escisión 260 mediante un enlazador de ancla/sitio de escisión 250. El sitio de escisión 260 se enlaza posteriormente a un reportero secundario 280 mediante un enlazador de sitio de escisión/reportero secundario 255. Un segundo ejemplo de un par de reporteros primarios idénticos 230 se enlaza además al reportero secundario, mediante un enlazador de reportero primario/reportero secundario 275.

La Figura 2K representa esquemáticamente una modalidad de un constructo reportero (que puede describirse como C-A-B-C'-D) en la que un primer ejemplo de un par de reporteros primarios idénticos 220 se une a un ancla de membrana 270 mediante un enlazador de ancla/reportero primario interpuesto 245. El ancla de membrana 270 se acopla además a un sitio de escisión 260 mediante un enlazador de ancla/sitio de escisión 250. El sitio de escisión 260 se enlaza posteriormente a un segundo ejemplo de un par de reporteros primarios idénticos 230 mediante un enlazador de ancla/reportero primario 265. Un reportero secundario 280 se enlaza además al segundo ejemplo de un par de reporteros primarios idénticos 230 mediante un enlazador de reportero primario/reportero secundario 275.

En algunas modalidades un reportero primario se conecta a un reportero secundario mediante un enlazador intermedio. En algunas de tales modalidades, el enlazador primario/secundario se selecciona para proporcionar FRET no significativo (es decir, menor de 5 %) entre un reportero primario y un reportero secundario. Por ejemplo, un enlazador de reportero primario/secundario puede seleccionarse para que tengan una longitud, geometría, y/o rigidez para mantener una distancia y/u orientación entre un reportero primario y un reportero secundario para reducir FRET a una cantidad insignificante (es decir, <5 %). En otras modalidades, un enlazador de reportero primario/secundario puede configurarse para proporcionar un grado útil de FRET (es decir, >5 %) entre el reportero primario y un reportero secundario.

La Figura 3 representa un esquema de un ensayo ilustrativo 300 del concepto de la invención. Una célula con una membrana celular 310 y el citosol 315 ha expresado un constructo que incluye una porción de anclaje a membrana celular 350, un sitio de escisión 340, y dos reporteros idénticos 330, 335. Anclados a la membrana celular 310, los reporteros 330, 335 producen una fuerte señal 360, 365. Para realizar el ensayo la célula se expone a una actividad enzimática 320, que puede actuar en el sitio de escisión 340. La hidrólisis del esqueleto peptídico del sitio de escisión libera los reporteros en el citosol 315. Múltiples eventos degradativos posteriores dan como resultado reporteros degradados 330A, 335A que producen una señal modificada 370, 375. En algunas modalidades del concepto de la invención los reporteros son proteínas fluorescentes, y se reduce la señal de fluorescencia de las proteínas fluorescentes degradadas.

La Figura 4 representa un ensayo alternativo 400 del concepto de la invención. Una célula con una membrana celular 410, citosol 415, y una vesícula 420 ha expresado un constructo que incluye una porción de anclaje de membrana vesicular 450, un sitio de escisión 440, y dos reporteros 430, 435. Anclados a la vesícula 420, los reporteros 430, 435 producen una señal fuerte 460, 465. Para realizar el ensayo la célula se expone a una actividad

enzimática 425, que puede actuar en el sitio de escisión 440. La hidrólisis del sitio de escisión libera los reporteros, lo que da como resultado la liberación de los reporteros 430, 435. Múltiples eventos degradativos posteriores dan como resultado reporteros degradados 430A, 435A que producen una señal modificada 470, 475. En algunas modalidades del concepto de la invención los reporteros son proteínas fluorescentes, y se reduce la señal de fluorescencia de las proteínas fluorescentes degradadas.

Además de utilizar diferentes sitios de anclajes, los ensayos del concepto de la invención pueden usar una variedad de diferentes protocolos de prueba. Una modalidad de un protocolo de prueba tal se muestra en la Figura 5. Inicialmente 510, se proporciona una célula que expresa un constructo del concepto de la invención. Una línea base o primera señal se adquiere 520, después la célula se expone a la actividad enzimática 530. Por ejemplo, una muestra que contiene una actividad enzimática (tal como una BoNT) puede añadirse a medios que contienen las células. Después de un periodo de incubación una segunda señal puede detectarse 540 y posteriormente compararse con la primera señal 550. Tales señales primera y segunda pueden ser mediciones inmediatas, mediciones medias obtenidas en el tiempo, y/o mediciones de velocidad.

Una modalidad alternativa de un método de prueba del concepto de la invención se muestra en la Figura 6. Inicialmente 610, se proporciona una célula que expresa un constructo del concepto de la invención. La célula se expone después a la actividad enzimática 620. Por ejemplo, una muestra que contiene una actividad enzimática (tal como una BoNT) puede añadirse a medios que contienen las células. Después de un primer periodo de incubación se detecta una línea base o primera señal 630 y, después de un segundo periodo de incubación se detecta una segunda señal 640 y posteriormente se compara con la primera señal 650. Tales señales primera y segunda pueden ser mediciones inmediatas, mediciones medias obtenidas en el tiempo, y/o mediciones de velocidad.

En otra modalidad del concepto de la invención, las células que expresan constructos como se describió anteriormente se exponen a uno o más colorantes secundarios (por ejemplo un colorante de unión a células tal como un colorante de membrana o un tinte/colorante nuclear), que están separados del constructo y que pueden generar señales que son independientes de la actividad de BoNT. Tales colorantes secundarios pueden asociarse a una membrana y/o núcleo de una célula de un modo que es independiente de la presencia de un analito (por ejemplo, una BoNT u otra actividad enzimática), y pueden usarse para producir una línea base o señal de referencia, que puede usarse para la normalización. Por ejemplo, una célula que expresa un constructo como se describió anteriormente puede exponerse a un colorante que se asocia al núcleo o a la membrana plasmática de la célula, y a su vez proporciona una señal fluorescente de línea base. En una modalidad preferida del concepto de la invención un colorante secundario tal se selecciona de manera que las longitudes de onda de emisión del colorante de membrana son distinguibles de las de un fluoróforo reportero del constructo expresado en las células. En algunas modalidades de la descripción el colorante secundario puede seleccionarse de manera que el intervalo de longitudes de onda de excitación eficaces se solape con las de un fluoróforo reportero del constructo, permitiendo la excitación simultánea del colorante secundario y del fluoróforo reportero y de ahí la adquisición simultánea de una señal de línea base y una señal de fluoróforo reportero. En otras modalidades del concepto de la invención un colorante secundario puede seleccionarse de manera que el intervalo de longitudes de onda de excitación eficaces no se solape significativamente con las del reportero fluoróforo, permitiendo la excitación selectiva de la fluorescencia de línea base. Las secuencias de colorantes secundarios adecuados incluyen 4',6-diamidino-2-fenilindol, dihidrocloruro (DAPI), el colorante actualmente conocido como tinte de membrana plasmática rojo profundo CELLMASK™, y el colorante de tinción de núcleo conocido como HOECHST3342™. En una modalidad preferida de la descripción el colorante secundario se selecciona para proporcionar espectros de excitación y emisión que tienen poco o ningún solapamiento con los espectros de excitación y emisión del reportero fluoróforo del constructo, de manera que no se produce esencialmente transferencia de energía (*es decir*, menos de aproximadamente 5 %) debido a FRET. Las secuencias de espectros de excitación y emisión de un colorante secundario adecuado (el colorante actualmente conocido como tinte de membrana plasmática rojo profundo CELLMASK™, indicado por "Cell Mask") y un fluoróforo reportero de YFP se muestran en la Figura 7. Los inventores contemplan que otros colorantes secundarios adecuados pueden incluir una proteína (por ejemplo anticuerpos) u otras macromoléculas que tienen una afinidad por la célula y se han conjugado o acompañado con moléculas fluorescentes u otras fácilmente detectables.

Ya que la asociación de los colorantes secundarios con las células es dependiente de la presencia del analito o la actividad de interés, pueden proporcionar una señal de línea base que es una medida independiente del número, densidad, y/o distribución celular. Una señal de línea base tal tiene considerable utilidad en la normalización de la señal de reportero obtenida de las células durante la realización de un ensayo del concepto de la invención. Por ejemplo, expresando un resultado de un ensayo tal como una relación entre la señal de reportero medida de un constructo reportero que responde al analito o actividad de interés y la señal de línea base medida en la forma de fluorescencia de un colorante de membrana proporciona la corrección para la variación en la intensidad de la señal de reportero de un sitio de prueba debido a diferencias en el número, densidad y/o distribución celular. Esto mejora ventajosamente la precisión de tales ensayos, lo que a su vez conduce a una mejora en la sensibilidad eficaz. Debería apreciarse que una señal de línea base tal puede utilizarse para proporcionar tal normalización de las señales de reportero diferentes a fluorescencia.

65 EJEMPLO

1. Como se muestra esquemáticamente en la Figura 8, las células transformadas con un vector de expresión que codifica un constructo como se describe en la Figura 1A se siembran 810 en placas de 96 pocillos y se incuban durante toda la noche a 37 °C con CO₂ al 5 %.

5 2. Las células se lavan después con medios de cultivo celular y después se someten inmediatamente a BoNT 820 diluida en medios de cultivo celular a 100 µl por pocillo (típicamente).

3. Las células se incuban después durante 48 horas (típicamente) a 37 °C con CO₂ al 5 %.

10 4. Al final del periodo de incubación de 48 horas, las células se tiñen 830 con un colorante secundario. Pueden aplicarse diferentes colorantes secundarios mediante el uso de diferentes protocolos.

Protocolo A: útil para DAPI y el colorante actualmente conocido como HOECHST3342™.

15 1. Se añaden 25 µl de DAPI 5 µM o 25 µg/ml del colorante actualmente conocido como HOECHST3342™ en medios de cultivo celular a cada pocillo de la placa de 96 pocillos para obtener una concentración final de DAPI 1 µM o 5 µg/ml del colorante actualmente conocido como HOECHST3342™. Concentraciones finales útiles del colorante de núcleo en el intervalo de 0,001 - 10 µM o 0,1 - 50 µg/ml. Las concentraciones de la solución de trabajo pueden ajustarse apropiadamente.

20 2. Las células se incuban a 37 °C, CO₂ al 5 % durante 30 minutos (típicamente).

Protocolo B: útil para el colorante actualmente conocido como tinte de membrana plasmática rojo profundo CELLMASK™.

25 1. Se prepara una solución de trabajo de 0,625 - 10 µg/ml en solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (5 µg/ml es típico).

30 2. Los medios de cultivo celular que contienen BoNT se eliminan de cada pocillo.

3. Se añaden 50 µl de la solución de trabajo del colorante de membrana directamente a cada pocillo.

4. Las células se incuban a 37 °C, CO₂ al 5 % durante 20 minutos (típicamente).

35 Después de la exposición al colorante de membrana, las placas de prueba se lavan con solución salina tamponada con fosfato mediante el uso de un lavador de placas automatizado. Las placas se leen después en un lector de microplacas de fluorescencia mediante el uso de filtros con las longitudes de onda de excitación y emisión aproximadas para el fluoróforo del constructo y el colorante secundario usado 840. Por ejemplo, DAPI y el colorante actualmente conocido como HOECHST3342™ puede caracterizarse mediante el uso de una longitud de onda de excitación de aproximadamente 345 nm y una longitud de onda de emisión de aproximadamente 485 nm, mientras que el colorante actualmente conocido como tinte de membrana plasmática rojo profundo CELLMASK™ puede caracterizarse mediante el uso de una longitud de onda de excitación de aproximadamente 650 nm y una longitud de onda de emisión de aproximadamente 680 nm. Las mediciones del fluoróforo del constructo se hacen independientemente de las del colorante de membrana, mediante el uso de longitudes de onda de excitación y emisión características del fluoróforo. Para análisis de datos, la emisión del fluoróforo del constructo excitado directamente (es decir, el componente sensible a BoNT) se normaliza 850, por ejemplo mediante la división de la emisión del fluoróforo del constructo por la emisión del colorante secundario (es decir, el componente insensible a BoNT).

50 Los resultados típicos de los ensayos realizados con constructos reporteros como se describió anteriormente en combinación con colorantes secundarios se muestran en las Figuras 9A, 9B, y 9C. La Figura 9A muestra los resultados no corregidos típicos a partir del contacto de células que contienen un constructo reportero con una proteasa (en este ejemplo, la proteasa es BoNT/A y el constructo incluye un sitio de escisión para BoNT/A. El límite de detección (LOD) en este ejemplo es BoNT/A 10 pM, y el límite de cuantificación (LOQ) es 100 pM. La Figura 9B muestra el impacto de la normalización de los datos de fluorescencia de la Figura 9A mediante el uso de los datos de emisión de un colorante secundario aplicado a las mismas células como se describe en el procedimiento anterior. El LOD para los datos mostrados en la Figura 9B se reduce a 3 pM y el LOQ se reduce a 10 pM. La Figura 9C muestra fotomicrografías de dos pocillos que contienen células que contienen constructos sensibles a BoNT/A mediante microscopía de fluorescencia, de campo claro (de izquierda a derecha) a la longitud de onda de emisión de un fluoróforo del constructo, y microscopía de fluorescencia a la longitud de onda de emisión del colorante secundario aplicado a las células. El pocillo en la serie superior de fotomicrografías no se expuso a BoNT/A; el pocillo en la serie inferior de fotomicrografías se expuso a BoNT/A 1 nM. La pérdida de fluorescencia del fluoróforo del constructo es evidente en el pocillo con BoNT/A 1 nM (es decir, la serie inferior). Por el contrario, la emisión del colorante secundario se mantiene a un nivel y distribución similar, aunque distinta y diferente a la del pocillo que no se expuso a BoNT/A (es decir, la serie superior)

Las variaciones de estos protocolos también pueden ser eficaces. Por ejemplo, los colorantes secundarios pueden aplicarse antes del contacto las células con la BoNT, esencialmente de manera simultánea con el contacto de las células con la BoNT, o a un intervalo de tiempo de menos de 48 horas después del contacto de las células con la BoNT. De manera similar, se contemplan etapas de lavado adicionales antes y después de la exposición de las células a los colorantes secundarios.

Debería apreciarse que los ensayos del concepto de la invención se basan en mediciones de fluorescencia directas de volúmenes de fluido en lugar de imágenes y/o análisis de células individuales. Como tal, pueden realizarse mediante el uso de un fluorómetro simple (por ejemplo, un fluorómetro de microplacas) y son ventajosamente altamente susceptibles de adaptación a la automatización y procesos de tamizaje de alta resolución. El análisis de datos es similarmente sencillo, ya que no implica tareas de procesamiento de imágenes intensivas en el procesador, como la enumeración de células, la identificación de células individuales y la identificación de fluorescencia localizada en regiones o compartimentos subcelulares específicos.

Además de proporcionar una señal de línea base para propósitos de normalización de datos, tales colorantes secundarios pueden servir para otros propósitos. Por ejemplo, puede establecerse un valor de señal de línea base por debajo del cual los números de células se consideran insuficientes para proporcionar un resultado de ensayo preciso, permitiendo que los datos de dicho sitio de prueba sean marcados o descartados. De manera similar, puede establecerse un valor de señal de línea base por encima del cual los números de célula se consideran demasiado altos para proporcionar un resultado de ensayo preciso (por ejemplo, debido a limitaciones ópticas en los sistemas utilizados para caracterizar la fluorescencia). La inclusión de tales colorantes secundarios con reactivos específicos que se agregan durante el transcurso de un ensayo también puede usarse para verificar que tales reactivos se suministraron realmente en un sitio de prueba durante el proceso de ensayo, por ejemplo para verificar que los sistemas de ensayo automatizados funcionan correctamente.

En modalidades preferidas, la actividad enzimática que se caracteriza se asocia con la toxina *botulínica*, y la secuencia de escisión se corresponde apropiadamente. Dentro del contexto de esta solicitud, una BoNT puede definirse como una BoNT nativa o modificada que es capaz de escindir una secuencia de proteína SNARE o una porción de una secuencia de proteína SNARE. Por ejemplo, BoNT/A, E y C escinden SNAP-25 y BoNT/B, D, F, G escinden sinaptobrevina (Syb), en sitios únicos pero diferentes. BoNT/C también escinde syntaxina además de SNAP-25. Por consiguiente, los constructos para la caracterización de BoNT/A, E y C pueden incluir secuencias de sitios de escisión que incluyen todo o una porción de SNAP-25. De manera similar, los constructos para la caracterización de BoNT B, D, F y G pueden incluir secuencias de sitios de escisión que incluyen todas o partes de las regiones susceptibles respectivas de sinaptobrevina. Alternativamente, la actividad de BoNT/C podría caracterizarse utilizando constructos que incluyen sitios de escisión con secuencias derivadas de toda o parte de la syntaxina.

Las secuencias de sitios de escisión contempladas pueden comprender ventajosamente una proteína, motivo, o muteína SNARE. Las "muteínas" de una proteína deben interpretarse en la presente que tienen al menos 30 % de identidad con una proteína nativa correspondiente, que incluyen, por ejemplo, composiciones que tienen al menos 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 98 % de identidad con la proteína nativa. Las variaciones de la identidad pueden comprender una o más adiciones, deleciones y sustituciones. Las muteínas contempladas incluyen fragmentos, truncados y proteínas de fusión.

Se contempla además que las células del concepto de la invención pueden modificarse para expresar dos o más constructos. Tales constructos podrían, por ejemplo, distinguirse por los espectros de emisión de sus respectivos reporteros y proporcionan mediciones esencialmente independientes y simultáneas de diferentes actividades enzimáticas. Alternativamente, tales constructos podrían medir las actividades de la misma enzima con diferentes secuencias de sustrato. Por ejemplo, un primer constructo podría incluir un sitio de escisión derivado de SNAP-25 y un segundo constructo podría incluir un sitio de escisión derivado de syntaxina y ambos se usan para caracterizar la actividad de BoNT/C. En una modalidad tal la comparación de los resultados de ambos constructos puede mejorar la precisión, el intervalo dinámico y/o la especificidad.

Otra modalidad de la descripción es un kit que incorpora un reportero secundario. Tal kit puede contener células que expresan un constructo de detección apropiado, como se describió anteriormente, y un colorante secundario (por ejemplo, un colorante de membrana). Opcionalmente, tal kit puede incluir instrucciones para que un usuario realice el ensayo. En algunas modalidades tal kit puede incluir materiales de control o calibración que incluyen un medio de cultivo celular adecuado y una actividad enzimática que corresponde a la actividad enzimática de la muestra a caracterizar. En este contexto, se entiende que una muestra de control es una muestra usada para verificar el rendimiento del ensayo, y se entiende que una muestra de calibración es una muestra usada para calibrar la salida de un ensayo para proporcionar un resultado cuantitativo o cualitativo. Por ejemplo, debe caracterizarse una muestra que se sospecha que contiene una BoNT, tales muestras de control y/o calibración podrían incluir una BoNT correspondiente. En algunas modalidades tales muestras de control y/o calibración pueden proporcionarse premezcladas y esencialmente listas para su uso. En otras modalidades (por ejemplo, debido a factores de estabilidad) tales muestras de control y/o calibrador pueden proporcionarse como un primer recipiente de un medio de cultivo adecuado y un segundo recipiente de una solución concentrada de la actividad enzimática. En tales

modalidades los recipientes primero y segundo pueden necesitar diferentes condiciones de envío y/o almacenamiento, y como tal pueden enviarse y/o almacenarse por separado mientras permanecen como parte del mismo kit.

- 5 Otras modalidades de la descripción incluyen ensayos libres de células que utilizan los constructos descritos anteriormente. Tal ensayo podría, por ejemplo, utilizar una suspensión de vesículas libre de células en la cual las vesículas portan uno o más sitios adecuados para interactuar con una porción de anclaje a la membrana de un constructo. Tales vesículas, junto con un constructo del concepto de la invención pueden suspenderse en un medio que incluye una proteasa o enzima similar capaz de hidrolizar un reportero, de manera que la escisión de una porción enlazadora del constructo liberaría reporteros en los medios para la hidrólisis. Alternativamente, los sitios reconocidos por una porción de anclaje de un constructo pueden unirse a una micropartícula de tamaño apropiado con una química superficial adecuada. Tales micropartículas pueden portar bloqueadores estéricos, por ejemplo dextranos o poliácridatos de alto peso molecular, que permiten que las toxinas *botulínicas* accedan a la superficie de micropartículas mientras que dificultan el acceso de las proteasas o enzimas similares. Con ese fin, pueden proporcionarse proteasas o enzimas similares en formas de alto peso molecular (por ejemplo, como polímeros o como conjugados de moléculas de alto peso molecular) para potenciar tal selectividad.

Listado de secuencias

20 <110> BioMadison, Inc.
Tucker, ward

<120> Ensayo enzimático con fluoróforos duplicados

25 <130> 102320.0014

<160> 18

<170> PatentIn versión 3.5

30 <210> 1
<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia sintética

35 <400> 1

Ser Gly Leu Arg Ser Arg Ala
1 5

40 <210> 2
<211> 4

<212> PRT

<213> Secuencia sintética

45 <400> 2

Ser Asn Ser Ser
1

50 <210> 3
<211> 6

<212> PRT

<213> secuencia sintética

55 <400> 3

Ser Asn Ser Gly Gly Ser
1 5

60 <210> 4
<211> 10

<212> PRT

<213> secuencia sintética

65

ES 2 686 141 T3

<400> 4

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10

5

<210> 5
<211> 15
<212> PRT
<213> secuencia sintética

10

<400> 5

Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys
1 5 10 15

15

<210> 6
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia sintética

20

<400> 6

Gly Gly Gly Gly Gly Gly
1 5

25

<210> 7
<211> 18
<212> PRT
<213> secuencia sintética

30

<400> 7

Lys Glu Ser Gly Ser Val Ser Ser Glu Gln Leu Ala Gln Phe Arg Ser
1 5 10 15

35

Leu Asp

40

<210> 8
<211> 14
<212> PRT
<213> secuencia sintética

<400> 8

45

Glu Gly Lys Ser Ser Gly Ser Gly Ser Glu Ser Lys Ser Thr
1 5 10

50

<210> 9
<211> 12
<212> PRT
<213> secuencia sintética

<400> 9

55

Gly Ser Ala Gly Ser Ala Ala Gly Ser Gly Glu Phe
1 5 10

60

<210> 10
<211> 239
<212> PRT
<213> Aequorea victoria

<400> 10

65

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

ES 2 686 141 T3

5

10

15

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

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

20

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

25

Phe Ser Tyr Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys
65 70 75 80

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

30

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

35

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

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

40

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

45

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

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

50

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

55

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

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

60

<210> 11
<211> 247
<212> PRT
<213> Secuencia sintética

65

<400> 11

ES 2 686 141 T3

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu
 1 5 10 15
 Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly
 20 25 30
 Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile
 35 40 45
 Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr
 50 55 60
 Phe Gly Tyr Gly Leu Gln Cys Phe Ala Arg Tyr Pro Asp His Met Lys
 65 70 75 80
 Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu
 85 90 95
 Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu
 100 105 110
 Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly
 115 120 125
 Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Thr Ala Cys Ala Ala Gly Thr
 130 135 140
 Ala Ala Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn Tyr Asn Ser His Asn Val
 145 150 155 160
 Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile Lys Val Asn Phe Lys
 165 170 175
 Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala Asp His Tyr
 180 185 190
 Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn
 195 200 205
 His Tyr Leu Ser Tyr Gln Ser Ala Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys
 210 215 220
 Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr
 225 230 235 240

<210> 12
 <211> 351
 <212> PRT
 <213> secuencia sintética

ES 2 686 141 T3

<400> 12

5

10

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

15

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

20

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

25

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

30

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

35

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

40

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

45

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

50

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

55

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

60

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

65

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

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

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

ES 2 686 141 T3

5

10

15

20

25

30

35

40

<210> 13
 <211> 248
 <212> PRT
 <213> Secuencia sintética

45

<400> 13

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

Gly Leu Arg Ser Arg Ala Met Ala Glu Asp Ala Asp Met Arg Asn Glu
 245 250 255

Leu Glu Glu Met Gln Arg Arg Ala Asp Gln Leu Ala Asp Glu Ser Leu
 260 265 270

Glu Ser Thr Arg Arg Met Leu Gln Leu Val Glu Glu Ser Lys Asp Ala
 275 280 285

Gly Ile Arg Thr Leu Val Met Leu Cys Phe Pro Asp Glu Gln Gly Glu
 290 295 300

Gln Leu Glu Arg Ile Glu Glu Gly Met Asp Gln Ile Asn Lys Asp Met
 305 310 315 320

Lys Glu Ala Glu Lys Asn Leu Thr Asp Leu Gly Lys Phe Cys Gly Leu
 325 330 335

Cys Val Cys Pro Cys Asn Lys Leu Lys Ser Ser Asp Ala Tyr Lys
 340 345 350

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

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

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

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

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

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

65

ES 2 686 141 T3

5

10

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

15

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

20

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

25

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

30

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

35

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

40

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

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

45

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

Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys
 245

50

<210> 14
 <211> 719
 <212> PRT
 <213> Secuencia sintética

55

<400> 14

Ala Ser Ala Thr Met Ala Glu Asp Ala Asp Met Arg Asn Glu Leu Glu
 1 5 10 15

60

Glu Met Gln Arg Arg Ala Asp Gln Leu Ala Asp Glu Ser Leu Glu Ser
 20 25 30

65

Thr Arg Arg Met Leu Gln Leu Val Glu Glu Ser Lys Asp Ala Gly Ile
 35 40 45

Arg Thr Leu Val Met Leu Asp Glu Gln Gly Glu Gln Leu Glu Arg Ile
 50 55 60

ES 2 686 141 T3

5

10

Glu Glu Gly Met Asp Gln Ile Asn Lys Asp Met Lys Glu Ala Glu Lys
65 70 75 80

15

Asn Leu Thr Asp Leu Gly Lys Phe Cys Gly Leu Cys Val Cys Pro Cys
85 90 95

20

Asn Lys Leu Lys Ser Ser Asp Ala Tyr Lys Lys Ala Trp Gly Asn Asn
100 105 110

Gln Asp Gly Val Val Ala Ser Gln Pro Ala Arg Val Val Asp Glu Arg
115 120 125

25

Glu Gln Met Ala Ile Ser Gly Gly Phe Ile Arg Arg Val Thr Asn Asp
130 135 140

30

Ala Arg Glu Asn Glu Met Asp Glu Asn Leu Glu Gln Val Ser Gly Ile
145 150 155 160

Ile Gly Asn Leu Arg His Met Ala Leu Asp Met Gly Asn Glu Ile Asp
165 170 175

35

Thr Gln Asn Arg Gln Ile Asp Arg Ile Met Glu Lys Ala Asp Ser Asn
180 185 190

40

Lys Thr Arg Ile Asp Glu Ala Asn Gln Arg Ala Thr Lys Met Leu Gly
195 200 205

Ser Gly Ser Asn Ser Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly
210 215 220

45

Val Val Pro Ile Leu Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys
225 230 235 240

50

Phe Ser Val Ser Gly Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu
245 250 255

Thr Leu Lys Phe Ile Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro
260 265 270

55

Thr Leu Val Thr Thr Phe Gly Tyr Gly Leu Gln Cys Phe Ala Arg Tyr
275 280 285

60

Pro Asp His Met Lys Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu
290 295 300

Gly Tyr Val Gln Glu Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr

65

ES 2 686 141 T3

5

Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu
565 570 575

10

Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly
580 585 590

15

Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr
595 600 605

Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn
610 615 620

20

Gly Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser
625 630 635 640

25

Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly
645 650 655

Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Tyr Gln Ser Ala Leu
660 665 670

30

Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe
675 680 685

35

Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys Gly
690 695 700

Gly Gly Gly Ser Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Gly Thr
705 710 715

40

<210> 15
<211> 205
<212> PRT
<213> Mus musculus

45

<400> 15

Met Ala Glu Asp Ala Asp Met Arg Asn Glu Leu Glu Glu Met Gln Arg
1 5 10 15

50

Arg Ala Asp Gln Leu Ala Asp Glu Ser Leu Glu Ser Thr Arg Arg Met
20 25 30

55

Leu Gln Leu Val Glu Glu Ser Lys Asp Ala Gly Ile Arg Thr Leu Val
35 40 45

60

Met Leu Asp Glu Gln Gly Glu Gln Leu Glu Arg Ile Glu Glu Gly Met
50 55 60

65

ES 2 686 141 T3

5

Asp Gln Ile Asn Lys Met Lys Glu Ala Glu Lys Asn Leu Thr Asp Leu
65 70 75 80

10

Gly Lys Phe Cys Gly Leu Cys Val Cys Pro Cys Asn Lys Leu Lys Ser
85 90 95

15

Ser Asp Ala Tyr Lys Lys Ala Trp Gly Asn Asn Gln Asp Gly Val Val
100 105 110

20

Ala Ser Gln Pro Ala Arg Val Val Asp Glu Arg Glu Gln Met Ala Ile
115 120 125

Ser Gly Gly Phe Ile Arg Arg Val Thr Asn Asp Ala Arg Glu Asn Glu
130 135 140

25

Met Asp Glu Asn Leu Glu Gln Val Ser Gly Ile Ile Gly Asn Leu Arg
145 150 155 160

30

His Met Ala Leu Asp Met Gly Asn Glu Ile Asp Thr Gln Asn Arg Gln
165 170 175

Ile Asp Arg Ile Met Glu Lys Ala Asp Ser Asn Lys Thr Arg Ile Asp
180 185 190

35

Glu Ala Asn Gln Arg Ala Thr Lys Met Leu Gly Ser Gly
195 200 205

<210> 16

<211> 66

40

<212> PRT

<213> Secuencia sintética

<400> 16

45

Ala Arg Glu Asn Glu Met Asp Glu Asn Leu Glu Gln Val Ser Gly Ile
1 5 10 15

50

Ile Gly Asn Leu Arg His Met Ala Leu Asp Met Gly Asn Glu Ile Asp
20 25 30

Thr Gln Asn Arg Gln Ile Asp Arg Ile Met Glu Lys Ala Asp Ser Asn
35 40 45

55

Lys Thr Arg Ile Asp Glu Ala Asn Gln Arg Ala Thr Lys Met Leu Gly
50 55 60

Ser Gly
65

60

<210> 17

<211> 116

<212> PRT

65

<213> Rattus norvegicus

ES 2 686 141 T3

<400> 17

5

Met Ser Ala Thr Ala Ala Thr Ala Pro Pro Ala Ala Pro Ala Gly Glu
1 5 10 15

10

Gly Gly Pro Pro Ala Pro Pro Pro Asn Leu Thr Ser Asn Arg Arg Leu
20 25 30

15

Gln Gln Thr Gln Ala Gln Val Asp Glu Val Val Asp Ile Met Arg Val
35 40 45

Asn Val Asp Lys Val Leu Glu Arg Asp Gln Lys Leu Ser Glu Leu Asp
50 55 60

20

Asp Arg Ala Asp Ala Leu Gln Ala Gly Ala Ser Gln Phe Glu Thr Ser
65 70 75 80

25

Ala Ala Lys Leu Lys Arg Lys Tyr Trp Trp Lys Asn Leu Lys Met Met
85 90 95

Ile Ile Leu Gly Val Ile Cys Ala Ile Ile Leu Ile Ile Ile Ile Val
100 105 110

30

Tyr Phe Ser Thr
115

<210> 18

35

<211> 63

<212> PRT

<213> Secuencia sintética

<400> 18

40

Gln Gln Thr Gln Ala Gln Val Asp Glu Val Val Asp Ile Met Arg Val
1 5 10 15

45

Asn Val Asp Lys Val Leu Glu Arg Asp Gln Lys Leu Ser Glu Leu Asp
20 25 30

Asp Arg Ala Asp Ala Leu Gln Ala Gly Ala Ser Gln Phe Glu Thr Ser
35 40 45

Ala Ala Lys Leu Lys Arg Lys Tyr Trp Trp Lys Asn Leu Lys Met
50 55 60

REIVINDICACIONES

1. Un constructo reportero para caracterizar una actividad enzimática comprende:
 5 un dominio de anclaje a membrana que comprende un primer péptido que forma un complejo con una membrana de una célula;
 un dominio reportero que comprende una primera aparición de un segundo péptido que produce una primera señal a una primera longitud de onda y una segunda aparición del segundo péptido que produce una segunda señal a la primera longitud de onda, en donde el dominio reportero produce una señal agregada que es una suma de la primera señal y la segunda señal;
 10 un sitio de escisión que comprende un tercer péptido, el sitio de escisión interpuesto entre el dominio de anclaje a membrana y la primera aparición del segundo péptido,
 en donde el tercer péptido se selecciona para experimentar un evento de escisión tras la exposición a la actividad enzimática, en donde el dominio reportero se selecciona de manera que al menos una porción del dominio reportero es susceptible a degradación después del evento de escisión que da como resultado dicha degradación del reportero y da como resultado un cambio observable en la señal agregada a partir del reportero; y
 15 en donde la señal agregada es observable en ausencia de una de la primera señal o la segunda señal.
2. El constructo reportero de conformidad con la reivindicación 1, en donde la primera aparición del segundo péptido es susceptible a un primer evento degradativo en el citosol celular y la segunda aparición del segundo péptido es susceptible a un segundo evento degradativo en el citosol celular después de un evento de escisión, en donde el primer evento degradativo da como resultado la pérdida de la producción de la primera señal y el segundo evento degradativo da como resultado la pérdida de la producción de la segunda señal.
- 25 3. El constructo reportero de conformidad con la reivindicación 1, en donde el segundo péptido es una proteína fluorescente.
4. El constructo reportero de conformidad con la reivindicación 1, comprende además un péptido enlazador interpuesto entre la primera aparición del segundo péptido y la segunda aparición del segundo péptido.
- 30 5. El constructo reportero de conformidad con la reivindicación 1, en donde el segundo péptido tiene al menos 80 % de identidad de secuencia con la sec. con núm. de ident. 10.
6. El constructo reportero de conformidad con la reivindicación 1, en donde el tercer péptido es una proteína SNARE o un fragmento de esta.
- 35 7. El constructo reportero de conformidad con la reivindicación 1 comprende además un dominio reportero auxiliar que proporciona una señal a una segunda longitud de onda, en donde la segunda longitud de onda es distinguible de la primera longitud de onda.
- 40 8. El constructo reportero de conformidad con la reivindicación 1, en donde el constructo reportero muestra un sesgo de selectividad reducido entre la primera actividad enzimática y una segunda actividad enzimática con respecto a un constructo reportero análogo que incluye una sola aparición del segundo péptido, en donde el tercer péptido se selecciona para experimentar un evento de escisión tras la exposición a la primera actividad enzimática o la segunda actividad enzimática
 45 en donde la primera actividad enzimática se asocia con BoNT/A y la segunda actividad enzimática se asocia con BoNT/E.
9. El constructo reportero de conformidad con la reivindicación 1, en donde el constructo reportero no exhibe niveles útiles de FRET.
- 50 10. Un método para caracterizar una primera actividad enzimática comprende:
 proporcionar una célula que expresa un constructo reportero de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 - 9;
 55 poner en contacto la célula con una muestra que se sospecha que incluye la primera actividad enzimática; y observar una disminución en la señal detectable cuando la muestra incluye la primera actividad enzimática, en donde la señal agregada es observable en ausencia de una de la primera señal o la segunda señal.
- 60 11. El método de conformidad con la reivindicación 10, en donde el método muestra actividad reducida entre la primera actividad enzimática y una segunda actividad enzimática en relación con un ensayo que utiliza un constructo reportero análogo que incluye una aparición única del segundo péptido, en donde el tercer péptido se selecciona para experimentar un evento de escisión tras la exposición a la primera actividad enzimática o la segunda actividad enzimática, preferentemente en donde la primera actividad enzimática se asocia con BoNT/A y la segunda actividad enzimática se asocia con BoNT/E.
- 65

- 5
- 10
- 15
12. El método de conformidad con la reivindicación 10 en donde el constructo reportero comprende además un reportero de referencia que produce una señal de referencia, en donde la señal de referencia es distinguible de la señal detectable y es dependiente de la actividad enzimática de la muestra; preferentemente en donde la señal de referencia se usa para normalizar la señal agregada.
 13. El método de conformidad con la reivindicación 10, comprende además la etapa de poner en contacto la célula con un colorante celular, en donde el colorante celular se selecciona para proporcionar una señal de colorante que es distinguible de la señal agregada.
 14. El método de conformidad con la reivindicación 13, en donde la célula se pone en contacto con el colorante celular antes de poner en contacto la célula con la muestra; o en donde la célula se pone en contacto con el colorante celular después de que la célula se pone en contacto con la muestra.
 15. El método de conformidad con la reivindicación 13, en donde la célula se pone en contacto con el colorante celular y la muestra durante el mismo intervalo de tiempo.

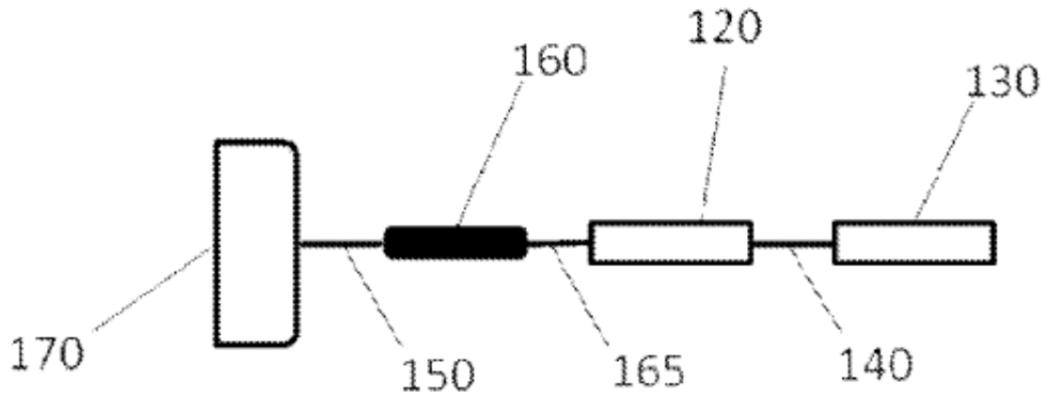


Figura 1A

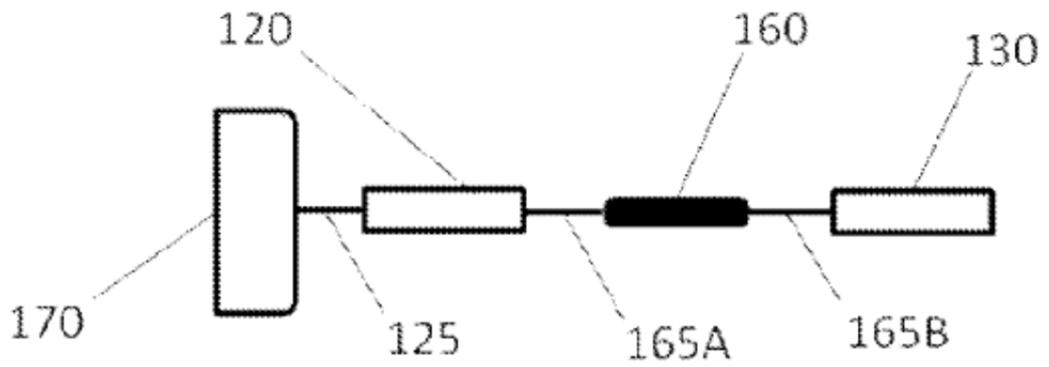


Figura 1B

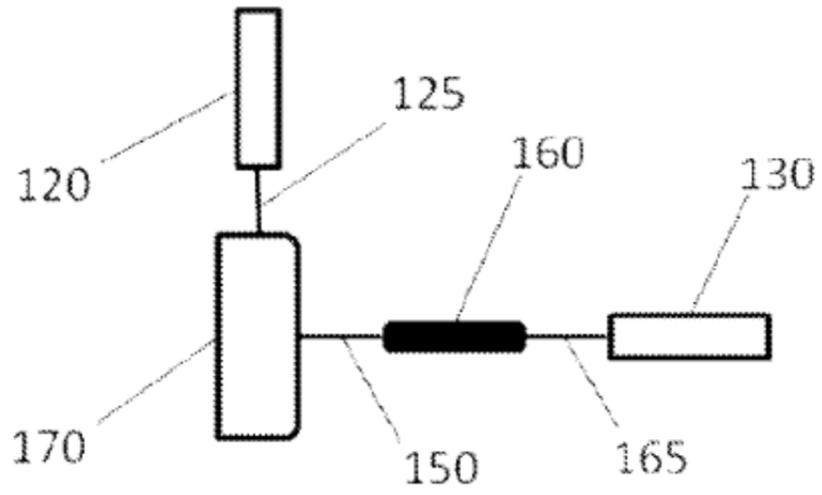
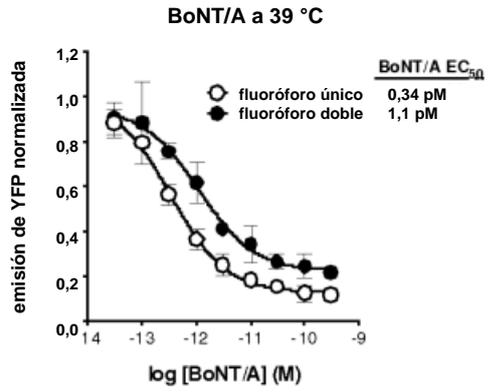
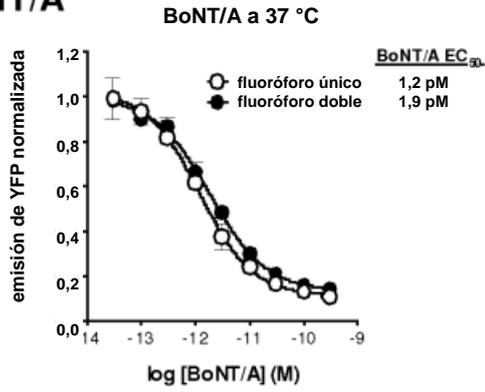


Figura 1C

BoNT/A



BoNT/E

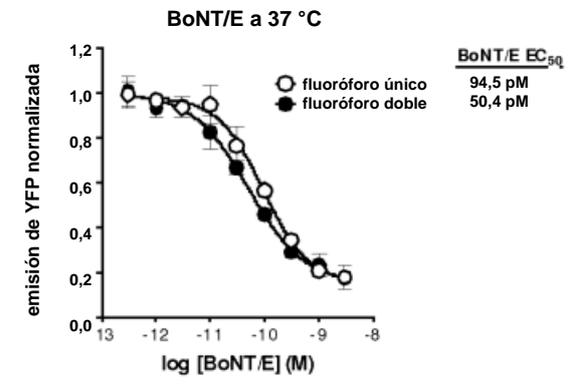
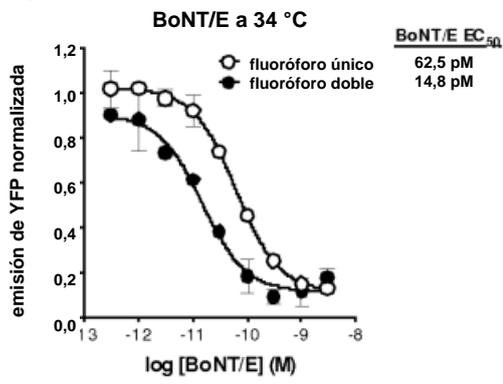


Figura 1D

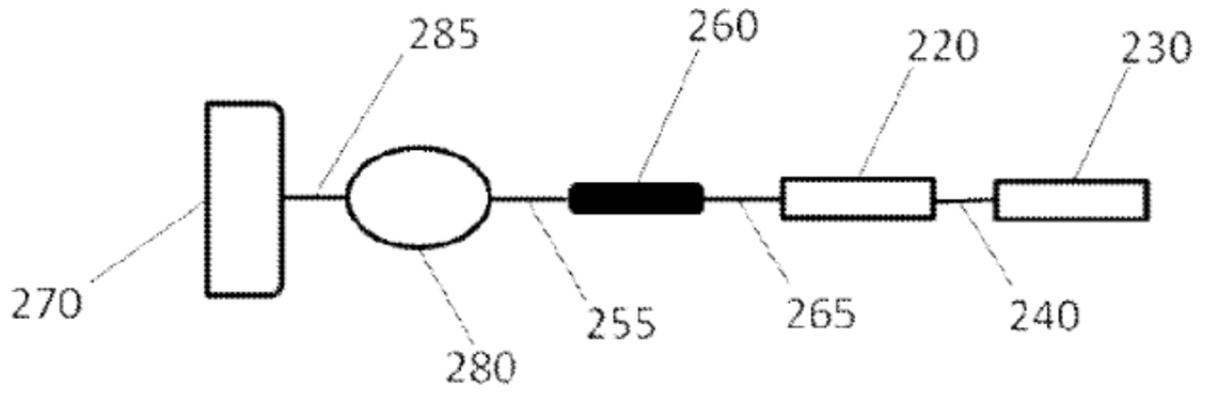


Figura 2A

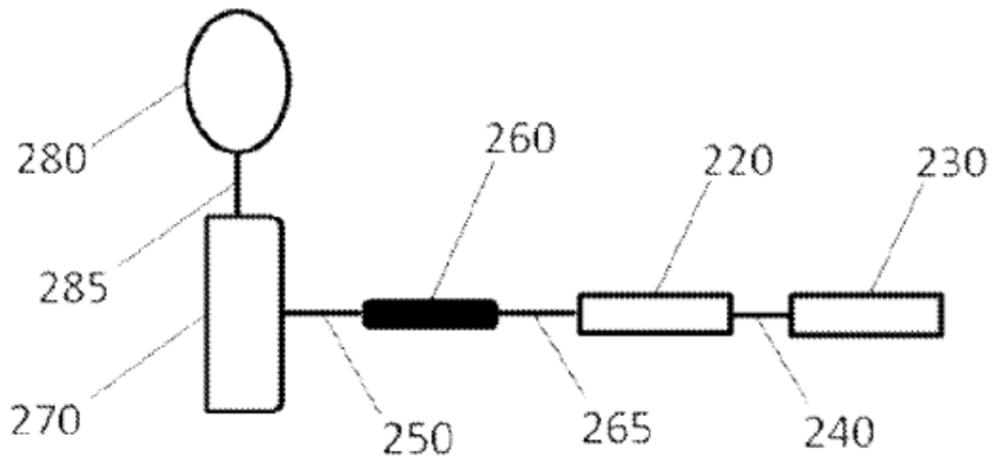


Figura 2B

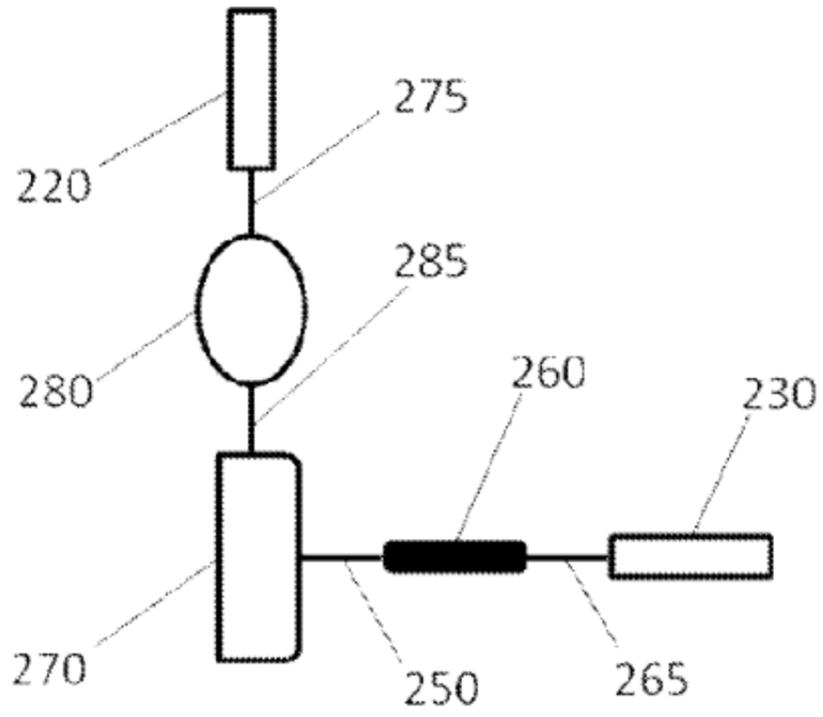


Figura 2C

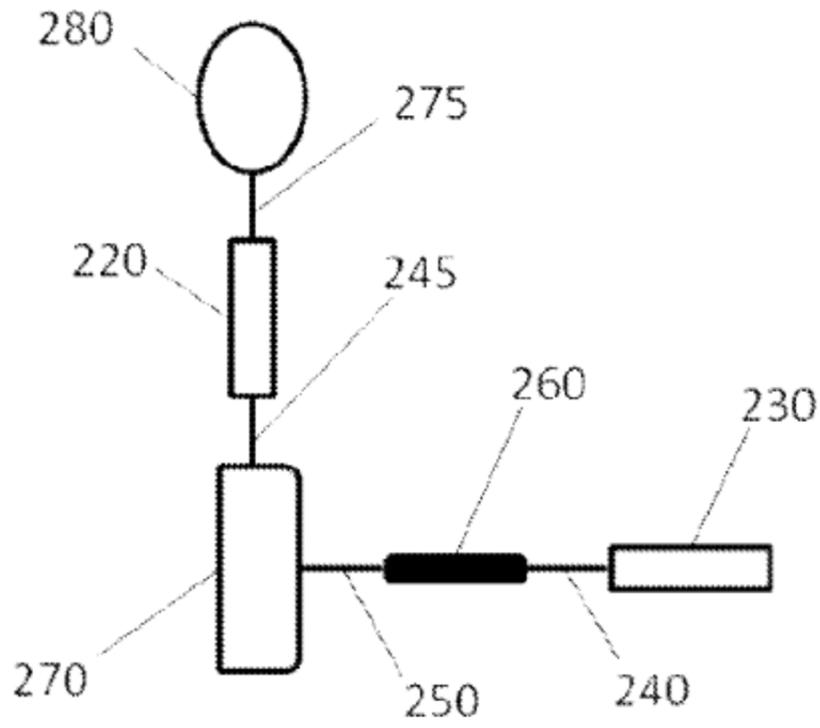


Figura 2D

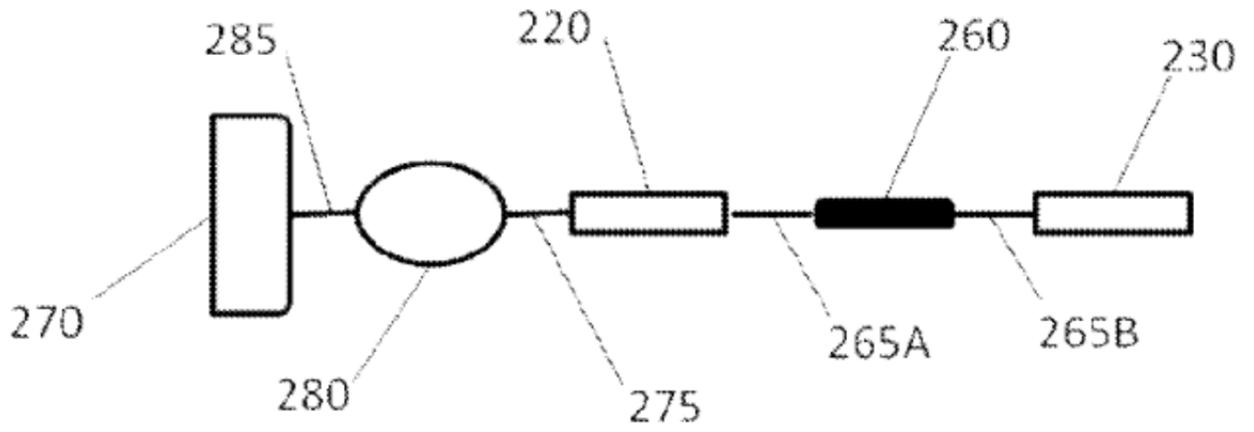


Figura 2E

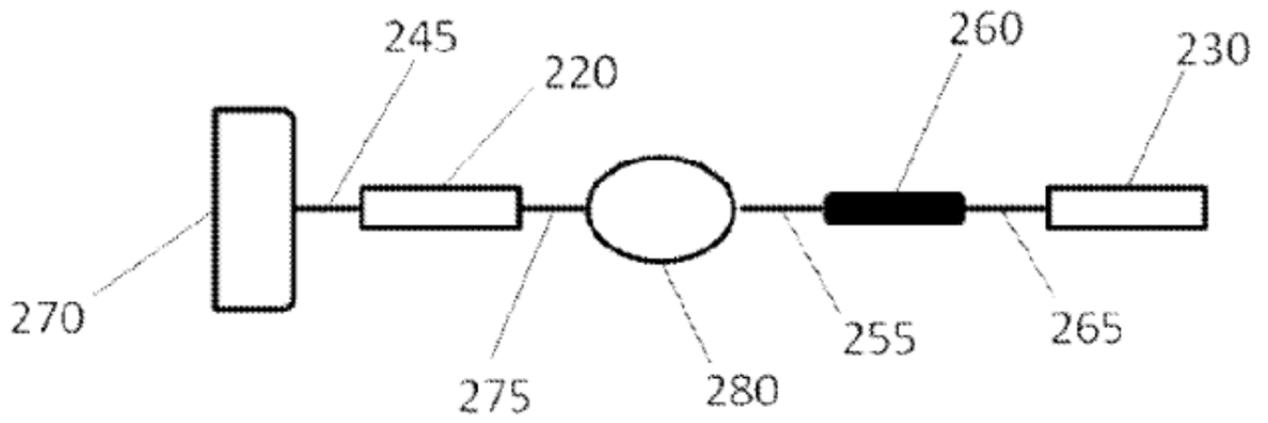


Figura 2F

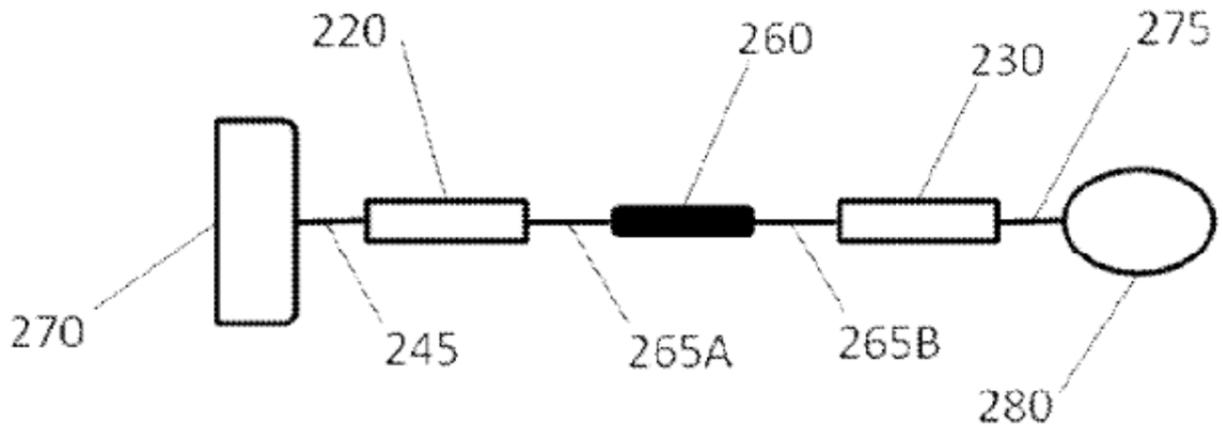


Figura 2G

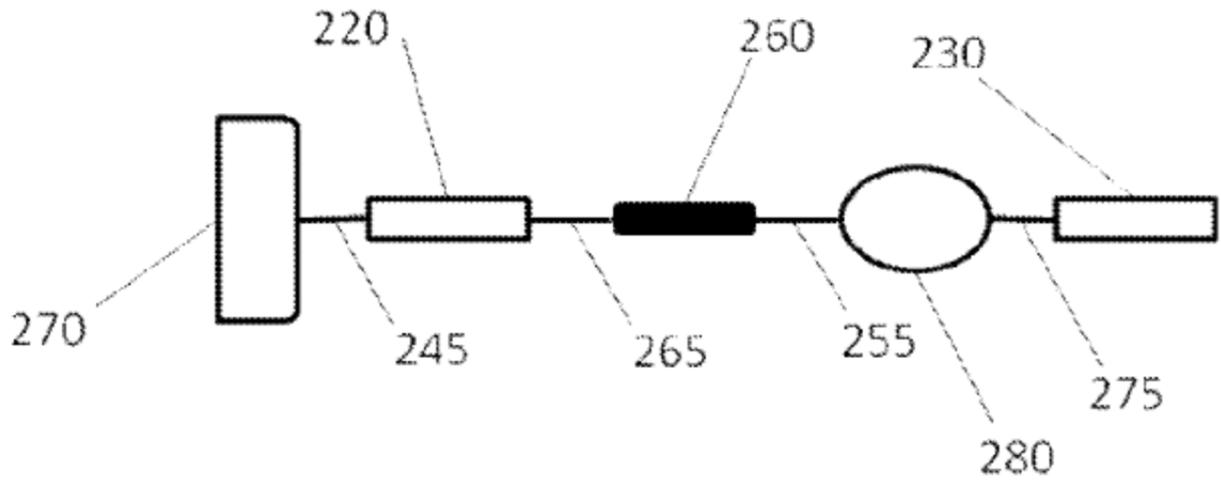


Figura 2H

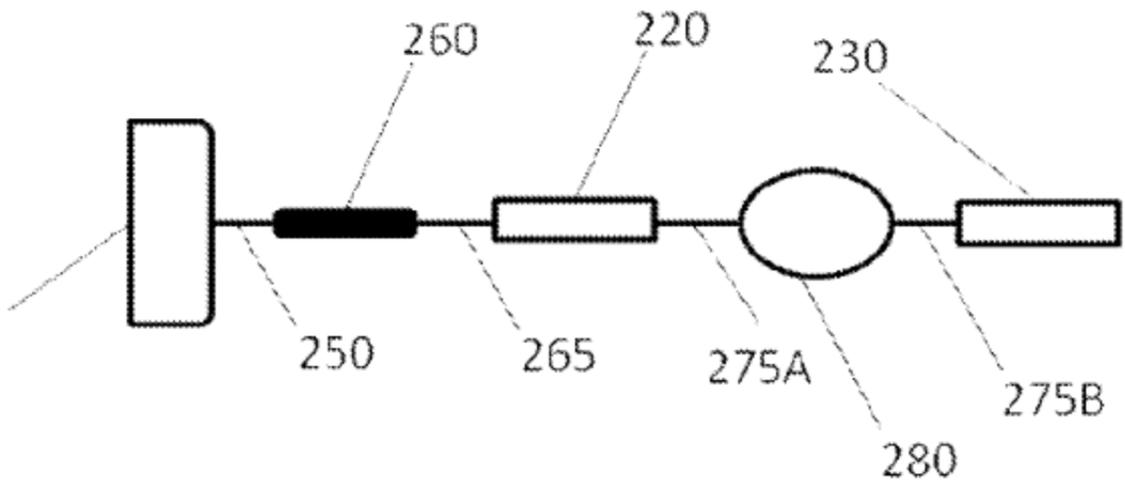


Figura 2I

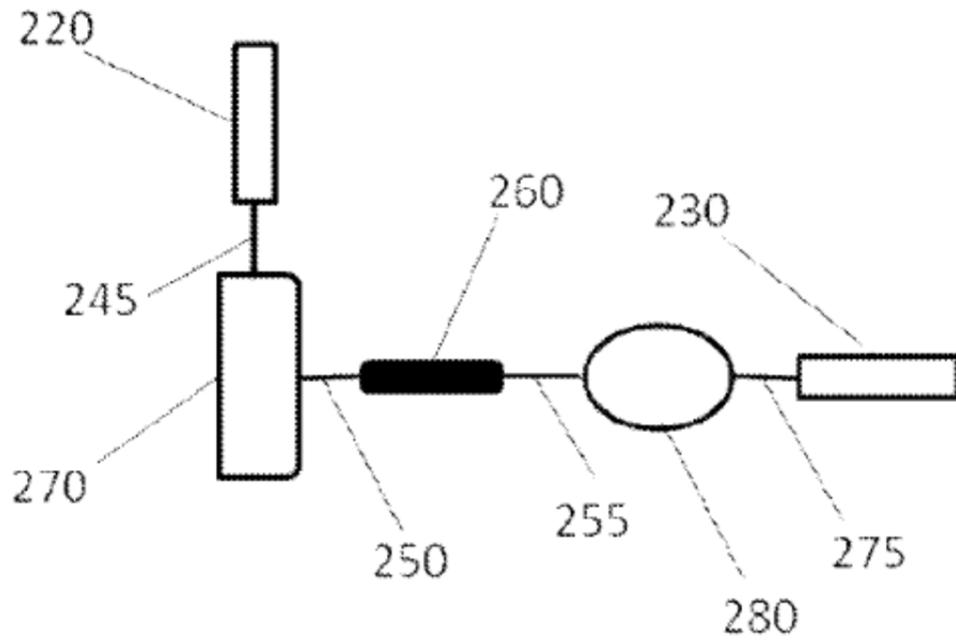


Figura 2J

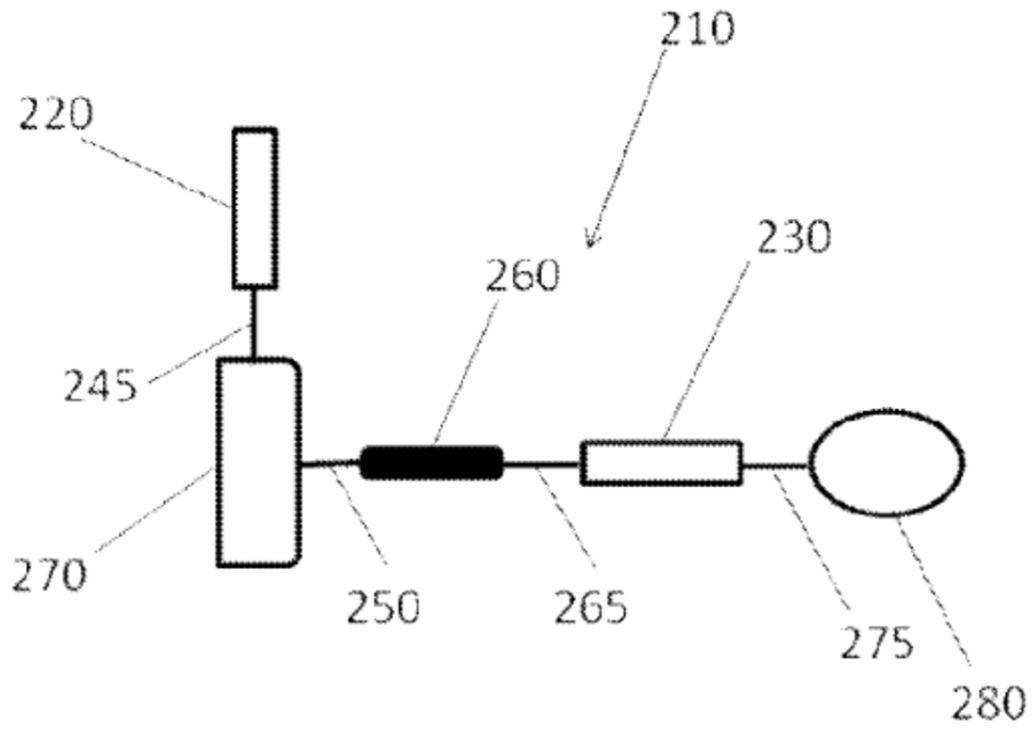


Figura 2K

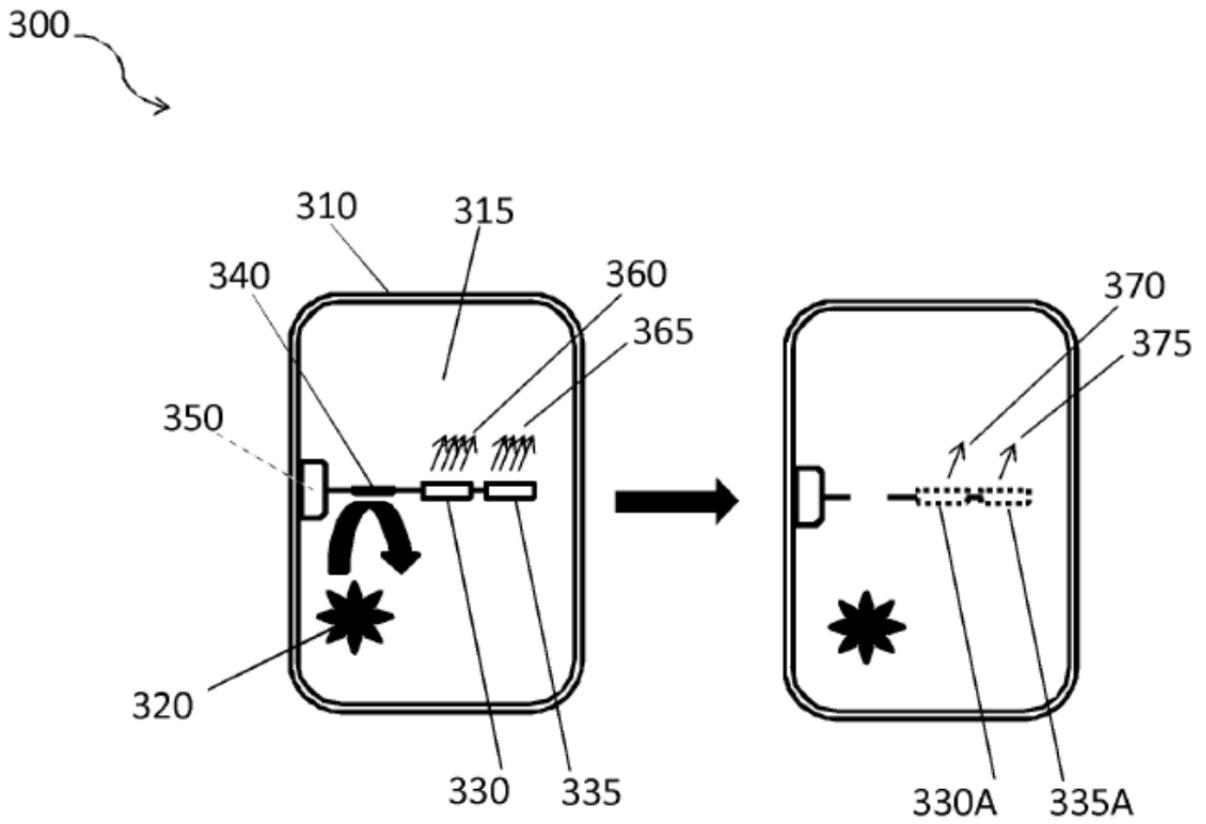


Figura 3

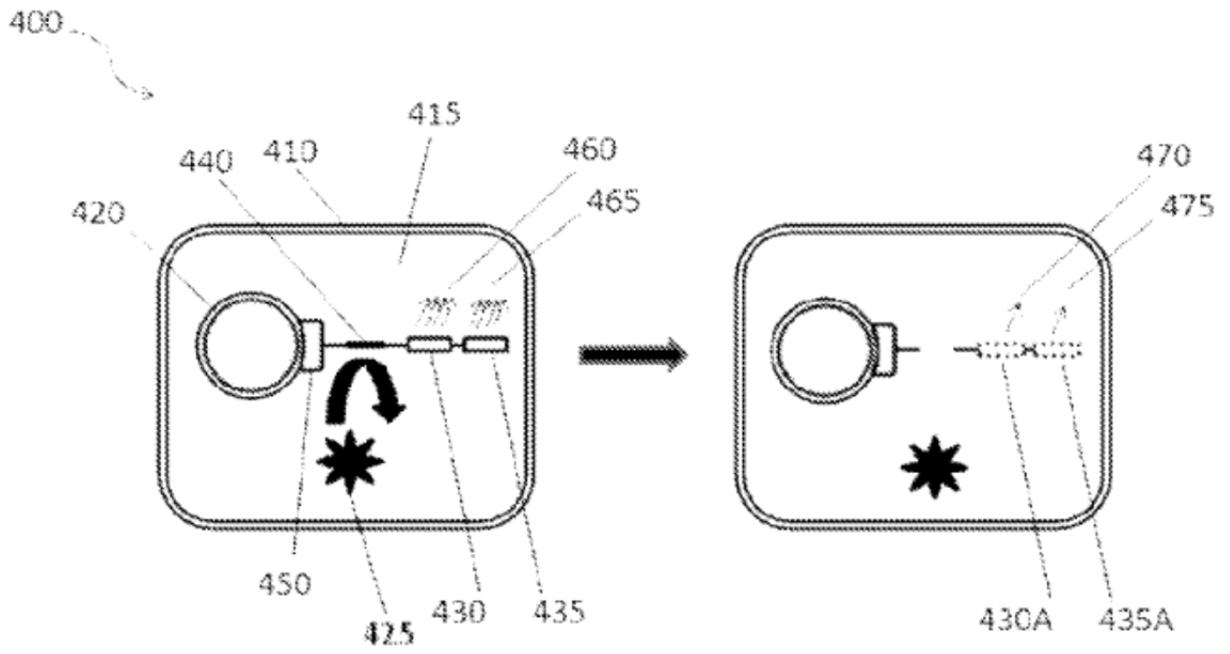


Figura 4

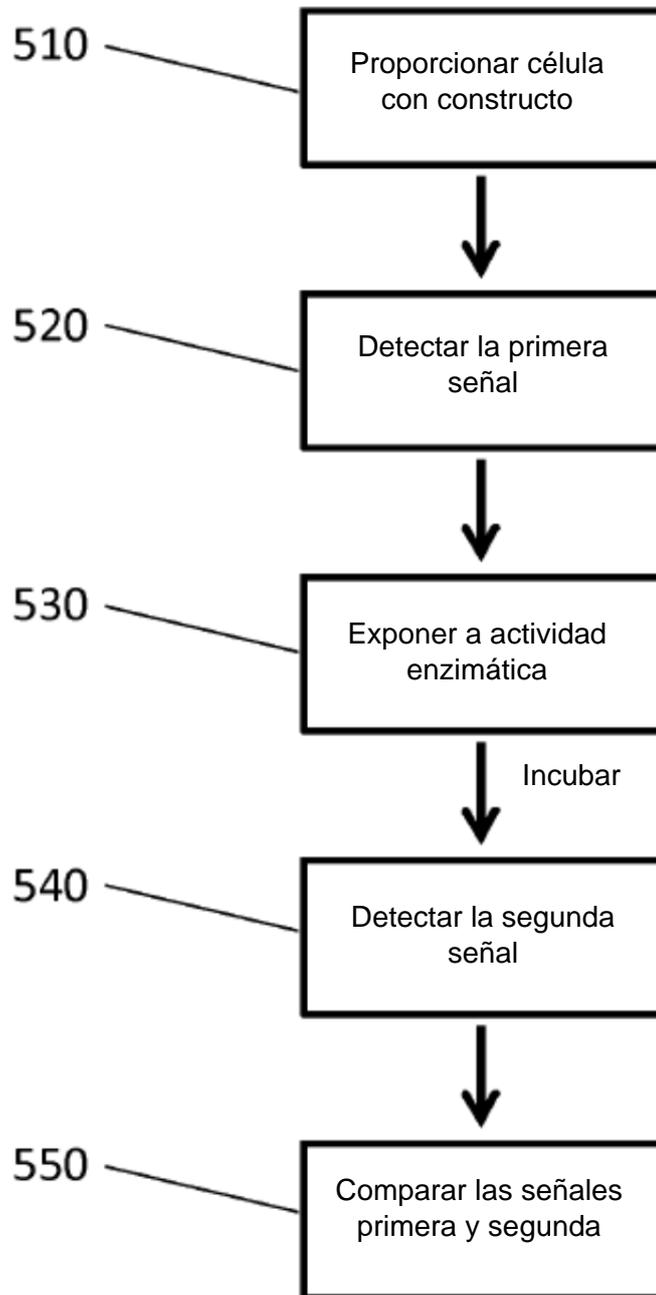


Figura 5

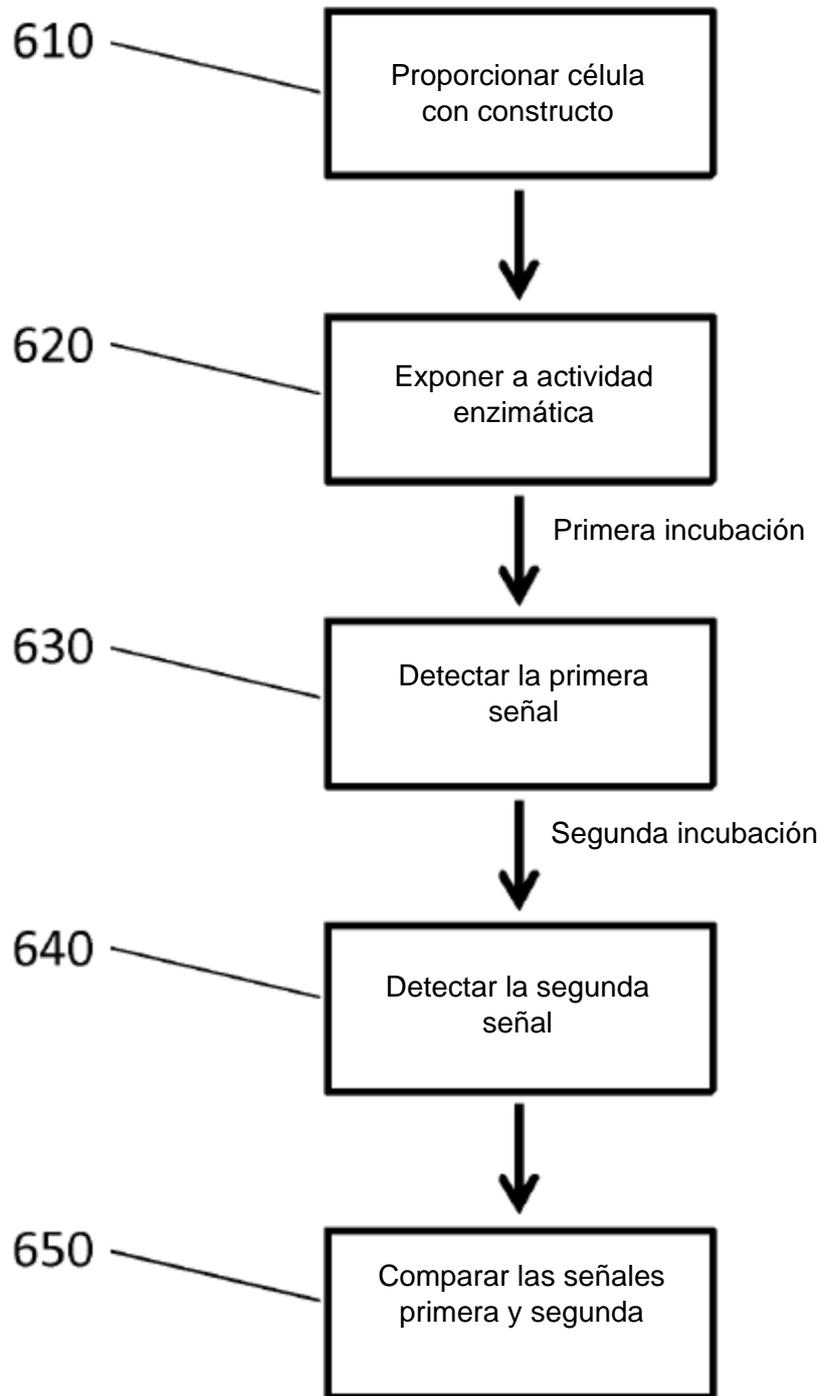


Figura 6

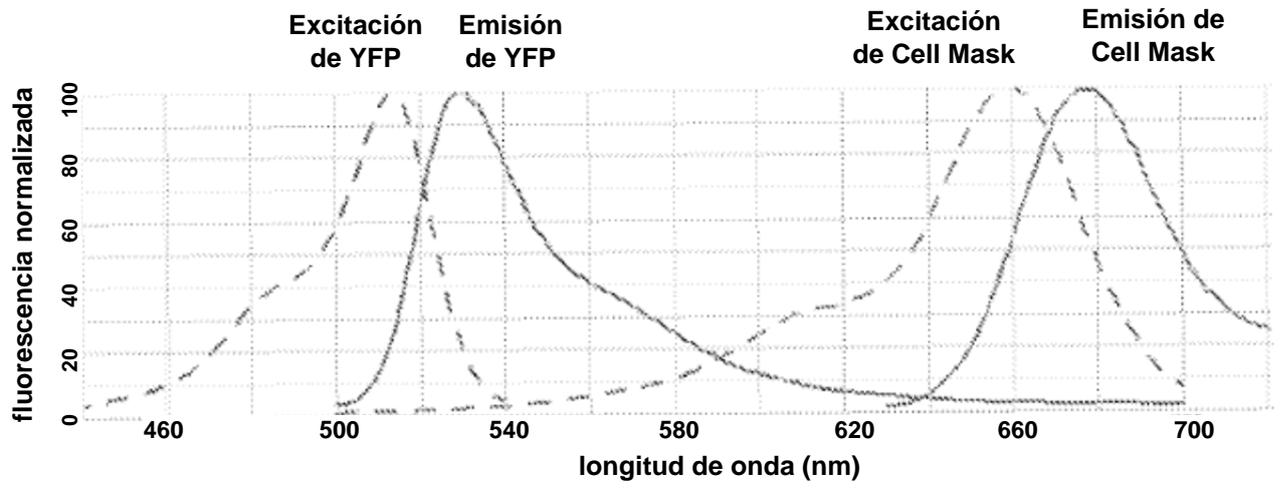


Figura 7

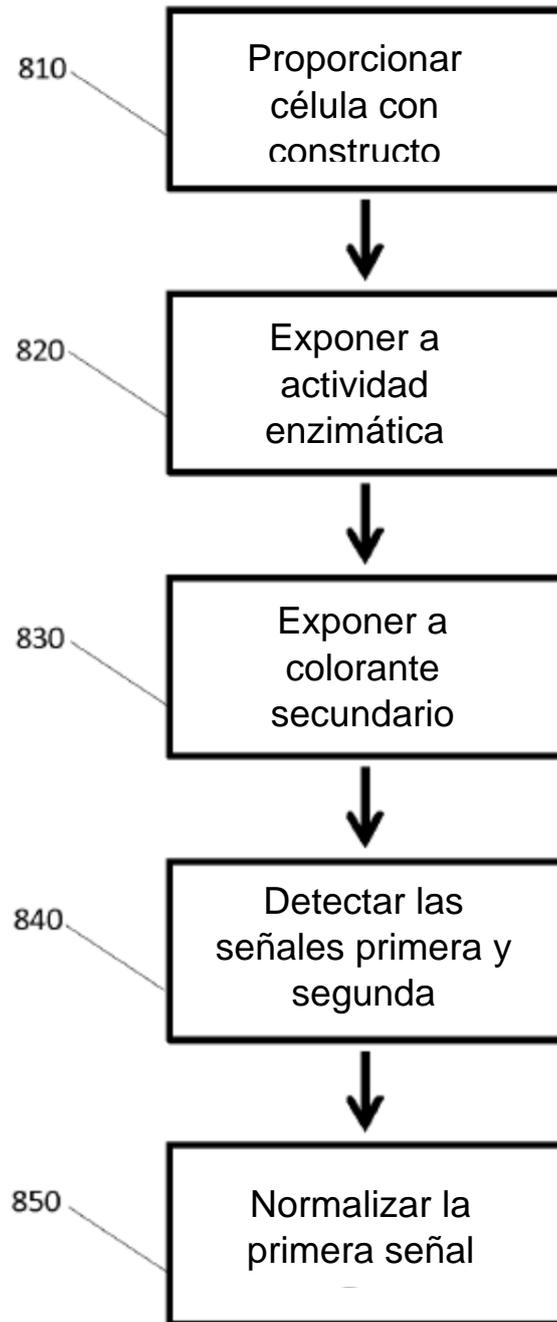


Figura 8

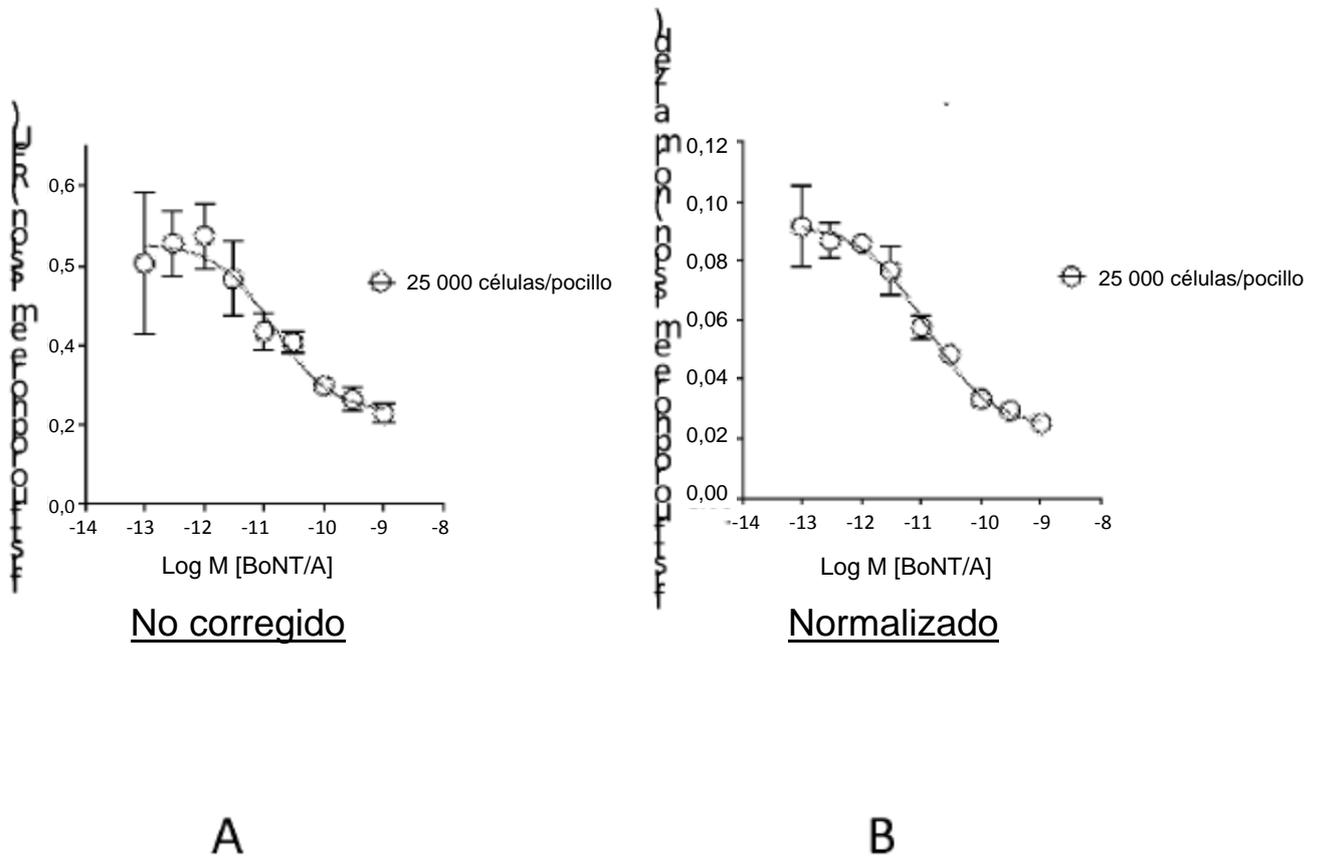
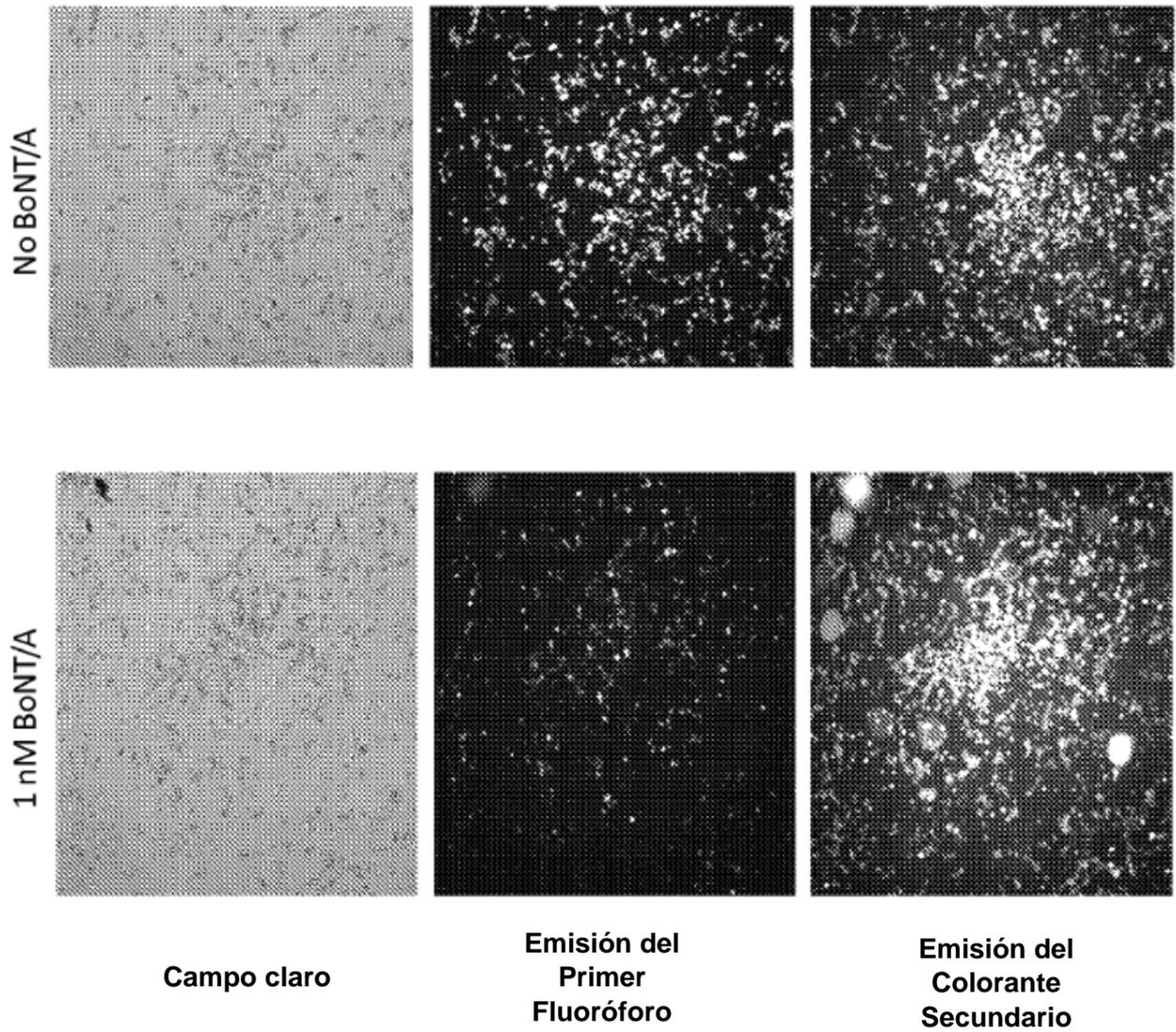


Figura 9A y 9B



C

Figura 9C