



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 322 726**

(51) Int. Cl.:

C12N 15/12 (2006.01)	C12N 15/55 (2006.01)
C12N 15/10 (2006.01)	C12N 15/62 (2006.01)
C12N 15/81 (2006.01)	C12N 9/16 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)	C07K 14/72 (2006.01)
C07K 14/82 (2006.01)	G01N 33/566 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)	

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **99967990 .5**

(96) Fecha de presentación : **29.12.1999**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1141291**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **10.10.2001**

(54) Título: **Procedimiento para la detección celular de alto rendimiento de interacciones entre receptores nucleares y ligandos.**

(30) Prioridad: **30.12.1998 DE 198 60 834**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
25.06.2009

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
25.06.2009

(73) Titular/es: **Hansjörg Forster**
Bismarckstr. 10
37269 Eschwege, DE
André Zimmermann

(72) Inventor/es: **Sippel, Albrecht E. y**
Zimmermann, André

(74) Agente: **Lehmann Novo, María Isabel**

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

Procedimiento para la detección celular de alto rendimiento de interacciones entre receptores nucleares y ligandos.

5 La invención se refiere al campo de la biología molecular. Trata en particular de procedimientos de ensayo que sirven para detectar interacciones específicas entre un ligando y un receptor nuclear, y se dirige, entre otras cosas, a descubrir nuevos ligandos funcionales para receptores nucleares, así como a demostrar, dado el caso, una función de unión a ligando característica de receptores nucleares en polipéptidos o proteínas que se sospecha presentan tal función. En este contexto, la invención también se refiere a proteínas de fusión, a ácidos nucleicos que codifican estas proteínas de fusión, a vectores que contienen estos ácidos nucleicos, a células que contienen estas proteínas de fusión, a kits que pueden usarse todos ellos para los procedimientos de ensayo de acuerdo con la invención o en relación con éstos, así como a ligandos para un segmento de unión de un receptor, a compuestos que son capaces de modificar la actividad de unión de un segmento de unión a ligando de un receptor frente a un ligando y a polipéptidos o proteínas que presentan una función de unión a ligando de un receptor, pudiéndose obtener y/o identificar todos ellos mediante los procedimientos de acuerdo con la invención y, en particular, mediante los procedimientos de ensayo de acuerdo con la invención.

La familia de los receptores nucleares difiere de las demás familias de receptores (por ejemplo, la familia de receptores con 7 dominios transmembrana o la familia de receptores tirosina quinasa) en que no posee un dominio transmembrana ni ninguna otra señal de localización o anclaje a la membrana. En ausencia de un ligando unido, se encuentran en forma inactiva en el citoplasma y/o en el núcleo celular. Todos los miembros de esta familia de receptores tienen en común que cuando se une su ligando, sufren un cambio conformacional y pasan así a una denominada forma “activa” o de otro modo efectiva. A la familia de los receptores nucleares pertenecen, entre otros, los receptores de esteroides (Evans, Science, 240:889-95, 1988), los receptores huérfanos (Bargmann, Cell, 90:585-587, 1997), el receptor de la vitamina D, el receptor de tiroxina, el receptor de dioxina, los receptores de ácido retinoico y muchos otros receptores (Kastner y col., Cell, 83:859-869, 1995). Los receptores nucleares desempeñan un papel importante en un gran número de procesos biológicos muy diversos, como, por ejemplo, en el desarrollo de los organismos, la diferenciación celular, la división celular, la regulación génica y, sobre todo, también en la carcinogénesis (Seed, Nature Medicine, 4:1004-1005, 1998).

Muchas terapias médicas aprovechan la posibilidad de intervenir con la ayuda de determinados fármacos en procesos que son regulados por receptores nucleares. Los fármacos usados actúan de agonistas o antagonistas de un ligando natural específico de un determinado receptor nuclear.

Por este y otros motivos, es de gran interés poder detectar y estudiar las interacciones entre receptores y ligandos a nivel molecular.

Existen ya varios procedimientos para la detección de interacciones entre receptores nucleares y ligandos. Para la detección de una interacción de este tipo la mayoría de estos procedimientos aprovechan el hecho de que el receptor complejo con el ligando es capaz de unirse específicamente al ADN y de activar o inactivar un denominado gen reportero en las células (patentes de Estados Unidos 4,981,784 y 5,643,720). El inconveniente de estos procedimientos reside, entre otras cosas, en la detección, en parte costosa, de la actividad del gen reportero o en lo complicado que resulta la manipulación de las células de vertebrados usadas.

En otro planteamiento, la interacción receptor/ligando se detecta *ex vivo*, es decir, fuera de un sistema vivo, en el que bien el receptor o bien el ligando se aplica sobre una matriz y se baña en una solución que contiene el ligando o el receptor. También en este caso el coste para la obtención y aplicación de cada uno de los receptores o ligandos sobre la superficie de la matriz correspondiente resulta sumamente elevado. Además surgen problemas a la hora de extrapolar los resultados obtenidos a las condiciones presentes en la célula, pues las condiciones celulares pueden divergir considerablemente de las condiciones *ex vivo*. Otro problema agravante reside sobre todo en la imposibilidad de acceder a la información genética de las nuevas variantes de receptores detectadas en cribados o ensayos de alto rendimiento.

El objetivo que se propone la invención consiste en proporcionar ensayos alternativos adecuados para detectar *in vivo* interacciones específicas entre un ligando y un receptor nuclear que ofrezcan, entre otras, las ventajas de poder detectar las interacciones ligando/receptor con mayor rapidez de lo que es posible en el estado de la técnica y que se puedan realizar también con células fáciles de manipular, tales como células procarióticas o células de levadura. Además, gracias a la configuración del ensayo, existe siempre la posibilidad directa de acceder a la información genética en la que se basa una variante de receptor.

Otros objetivos de la invención consisten en proporcionar proteínas de fusión, ácidos nucleicos, vectores, células y kits que puedan usarse todos ellos para los procedimientos de ensayo de acuerdo con la invención o en relación con éstos, así como ligandos para un segmento de unión de un receptor, compuestos que son capaces de modificar la actividad de unión de un segmento de unión a ligando de un receptor frente a un ligando y polipéptidos o proteínas que presentan una función de unión a ligando de un receptor, que se puedan obtener y/o identificar todos ellos mediante los procedimientos de acuerdo con la invención y, en particular, mediante los procedimientos de ensayo de acuerdo con la invención.

Los objetivos que se propone la invención se logran mediante los procedimientos, en particular los procedimientos de ensayo, las proteínas de fusión, los ácidos nucleicos, los vectores, las células, los kits, los ligandos, los compuestos, los polipéptidos y las proteínas definidos, entre otras cosas, en las reivindicaciones.

5 La presente invención se basa en los siguientes conocimientos:

1. La actividad de una proteína que es capaz de activar una ruta de señalización posterior a una proteína Ras en una célula puede regularse por fusión con un receptor nuclear y/o con partes de éste en función de la unión de un ligando al receptor o a la parte del receptor.
- 10 2. Para la activación de diferentes rutas de transducción de señales ras es necesaria la localización de determinados componentes de las rutas de señalización en la membrana (Schlessinger, TIBS, 18:273-275, 1993). Si estos componentes están fusionados con un receptor nuclear y/o con partes de éste como se ha descrito en el punto 1., se puede crear en una célula, por asociación adicional de otro dominio que media la localización del producto de fusión en la membrana, un sistema en el que la actividad del componente que activa la ruta de transducción de señales ras puede desplegarse selectivamente en el punto de acción, es decir, en la membrana, sólo en presencia o, alternativamente, sólo en ausencia de un ligando para el receptor nuclear.
- 20 3. En el estado de la técnica se conocen células en las que se puede inactivar, al menos en determinadas condiciones, una ruta de transducción de señales ras a nivel de la proteína Ras específica de ésta o de un factor de intercambio de nucleótidos de guanina específico para la proteína Ras. Si en una célula de este tipo se introduce la proteína de fusión indicada anteriormente en el punto 2., que presenta una actividad ras que puede activar la ruta de transducción de señales ras mencionada, se obtiene una célula en la que la ruta de transducción de señales ras propia de la célula, inactiva al menos en determinadas condiciones, puede ser activada por la actividad del componente activo correspondiente de la proteína de fusión - aunque sólo en presencia o, alternativamente, en ausencia de un ligando para el segmento del receptor nuclear.

De este modo se obtiene una célula en la que la o una determinada ruta de transducción de señales ras sólo se puede activar en función de la unión del ligando, es decir, una vez efectuada la unión del ligando o, alternativamente, en ausencia de unión del ligando al segmento del receptor nuclear de la proteína de fusión antes indicada. Esta célula permite establecer un procedimiento de ensayo *in vivo* que permite detectar, dado el caso indirectamente a través de los efectos específicos demostrables en la célula tales como crecimiento celular, interacciones entre un receptor nuclear y un ligando específico de éste por detección de la activación, dado el caso efectuada, de la ruta de transducción de señales ras específica.

Para una mejor comprensión de la enseñanza de este documento cabe añadir que en el presente contexto deben entenderse por el término “ligando” sólo aquellas parejas de unión para receptores y, en especial, para receptores nucleares que, cuando se unen al segmento de unión a ligando o de receptor de un receptor de este tipo, provocan un cambio conformacional que capacita al tercer dominio o, alternativamente, le impide a éste desarrollar su actividad de activación de una ruta de señalización posterior a una proteína Ras en una célula. Cuando el ligando se disocia del segmento de unión a ligando o de receptor, es decir, en ausencia de unión de ligando, en la variante mencionada anteriormente en primer lugar el tercer dominio es, por consiguiente, incapaz de desarrollar su actividad de activación de una ruta de señalización posterior a una proteína Ras en una célula. En la segunda variante, el tercer dominio presenta únicamente en este caso la capacidad de activar la ruta de señalización posterior a una proteína Ras en una célula. Esto puede comprender en particular cambios conformacionales como los que se producen *in vivo* cuando se une un ligando natural. En el caso de los receptores nucleares descritos ya con anterioridad, el cambio conformacional causado por la unión del ligando provoca, como se ha mencionado, una activación, probablemente, como lo hacen suponer datos convincentes, por la disociación causada por el cambio conformacional de un complejo multiproteico que en ausencia de unión del ligando se encuentra firmemente asociado con el receptor.

No obstante, también se consideran casos en los que los cambios conformacionales no corresponden, o sólo lo hacen parcialmente, a los cambios conformacionales producidos cuando se une un ligando presente *in vivo* en la célula.

En el presente contexto, el significado de la expresión “receptor nuclear” también debe abarcar adicionalmente, por ejemplo, receptores víricos (incluidos los retrovíricos) no asociados a la membrana que igualmente presentan las propiedades de encontrarse en la forma inactiva en ausencia de ligando unido pero de sufrir un cambio conformacional cuando se une su ligando y pasar de este modo a una denominada forma “activa”. En relación con esta variante de la invención resulta además esencial que cuando el dominio de unión a ligando de un receptor vírico de este tipo se integra en una proteína de fusión de acuerdo con la invención y en ausencia de unión de ligando, el tercer dominio no pueda desarrollar, pese a su localización en la membrana, su actividad de activación de una ruta de señalización posterior a una proteína Ras en una célula; es decir que en esta variante, la actividad del tercer dominio, consistente en activar una ruta de señalización posterior a una proteína Ras, requiere forzosamente la unión de un ligando al segmento de unión a ligando procedente del receptor vírico.

De forma alternativa se prevé también en el caso de los receptores víricos la posibilidad de que estos receptores estén presentes en forma inactiva en ausencia de ligando unido pero sufran un cambio conformacional cuando se une

su ligando y pasen de este modo a una denominada forma “activa”. En esta variante, y en el contexto de la invención, cuando se integra el dominio de unión a ligando de un receptor vírico correspondiente en una proteína de fusión de acuerdo con la invención y cuando se une el ligando, el tercer dominio no puede desarrollar, pese a su localización en la membrana, su actividad de activación de una ruta de señalización posterior a una proteína Ras en una célula; esta actividad requiere la disociación del ligando, esto es, una forma de la proteína de fusión sin ligando unido.

En el marco de la invención, y especialmente en el caso de los receptores víricos, también son imaginables, además del mecanismo antes explicado para la “activación” del tercer dominio en forma de un cambio conformacional que conduce a la disociación de un complejo multiproteico, otros mecanismos de activación que, sin embargo, siempre supondrán un cambio conformacional dentro de la proteína de fusión provocado por la unión de ligando o, alternativamente, por la disociación de ligando.

Las expresiones “ruta de señalización ras” o “ruta de señalización posterior a una proteína Ras”, usadas indistintamente en la presente memoria, también abarcan las denominadas rutas de señalización similares a ras, que son reguladas por diversos otros miembros de la familia Ras. Entre los miembros de la familia Ras se cuentan aquéllos que, pese a proceder de diferentes organismos, pueden activar una misma ruta de transducción de señales en una célula diana seleccionada. Un ejemplo de ello es la Ha-Ras humana (L61), que es capaz de activar también una ruta de señalización ras en *Saccharomyces cerevisiae* que actúa sobre el ciclo celular y cuya activación es esencial para la proliferación de las células de levadura. Otros miembros de la familia Ras sólo son capaces de activar una única ruta de señalización específica para ellos.

Una serie de miembros de la familia Ras, como la Ha-Ras (L61) antes mencionada, activa rutas de señalización que actúan sobre el ciclo celular y cuya activación a través de la activación de factores de transcripción especiales es esencial para la proliferación celular. Otras proteínas Ras de este tipo activan rutas de señalización que conducen en cada caso específicamente a la activación de uno de los múltiples factores de transcripción que son específicos de genes distintos de los del ciclo celular. En el presente contexto, todas las rutas de señalización ras tienen en común que para su activación requieren una proteína Ras activa presente en la membrana celular, precisando la proteína Ras para su activación dado el caso la presencia simultánea de un factor de intercambio de nucleótidos de guanina en la membrana celular.

Cuando en este documento se hace referencia a una inactivación de una ruta de señalización ras o de una ruta de señalización similar a ras, siempre se entiende por ella una inactivación a nivel de la proteína Ras y/o de un factor de intercambio de nucleótidos de guanina específico de ella. En el presente contexto, la inactivación mencionada de la ruta de señalización se produce en una célula preferentemente sólo en determinadas condiciones ambientales, tales como temperatura, de modo que se puede inducir y volver a suprimir ajustando selectivamente las condiciones ambientales.

Una condición previa esencial de los sistemas de ensayo de acuerdo con la invención es, como se ha explicado, la expresión de una proteína de fusión con determinadas propiedades en un sistema celular adecuado. Como se muestra también esquemáticamente en las figuras 1 y 3, esta proteína de fusión, que igualmente constituye una parte de la invención, comprende dominios o segmentos que confieren o, en el caso de la segunda función mencionada a continuación, deben conferir a la proteína de fusión las tres funciones siguientes:

1. Localización en la membrana, por ejemplo por medio de una señal de localización en la membrana, un dominio transmembrana y/o cualquier otra parte proteica que medie la localización en la membrana,
2. función de unión a ligando de un receptor nuclear, por ejemplo proporcionando la secuencia de un receptor nuclear completo y/o partes de éste,
3. capacidad de activación de una ruta de transducción de señales ras o similar a ras.

Otra característica esencial reside en que en ausencia de unión o, alternativamente, en caso de unión del ligando al segundo dominio con función de unión a ligando, el tercer dominio no puede desarrollar su actividad de activación de una ruta de señalización posterior a una proteína Ras en una célula pese a su localización en la membrana celular. En la variante mencionada anteriormente esta actividad requiere en primer lugar la presencia de un ligando unido al segundo dominio, y en la variante mencionada en último lugar, la disociación del ligando unido al segundo dominio.

En base a los datos mencionados brevemente con anterioridad y explicados con más detalle a continuación, procedimientos de diversos experimentos con receptores nucleares, se supone que, según una forma de realización preferida, en ausencia de unión de ligando al segundo dominio, el tercer dominio con la función de activación se puede complejar mediante un complejo multiproteico asociado con la proteína de fusión de tal manera que este último no sea capaz de desarrollar su actividad de activación de una ruta de transducción de señales ras o similar a ras en una célula. Un mecanismo análogo también es imaginable como una posibilidad en la otra variante, es decir, complejamiento y, con ello, inactivación del tercer dominio cuando se une el ligando, conduciendo en este caso la disociación del ligando a la disociación del complejo multiproteico y confiriendo ésta al tercer dominio la capacidad de desarrollar su actividad de activación de una ruta de señalización posterior a una proteína Ras.

En base a diversos experimentos realizados con receptores nucleares se supone que éstos están presentes en la célula en forma de un complejo multiproteico inactivo sin ligando unido (Pratt, Endocr. Rev., 18:306-60, 1997) que

puede constar de las denominadas proteínas de “choque térmico” (HSP) que se expresan en la célula. Se supone que en un receptor nuclear presente en la naturaleza la asociación del complejo multiproteico se produce en proximidad, dado el caso en proximidad directa, del sitio de unión al ligando o, dado el caso, también en una zona solapante con éste. Sin embargo, si mediante los ensayos de acuerdo con la invención debe comprobarse la función de unión a ligando de un segmento de unión a ligando mutado o generado artificialmente, puede ser dado el caso necesario prever adicionalmente uno o varios segmentos de receptores nucleares de los cuales se sepa o se pueda demostrar que median la unión del complejo multiproteico pero que ya no presentan la función de unión a ligando. En este caso puede preverse el segundo dominio como secuencia química de secuencias de aminoácidos de distintos orígenes. De forma alternativa, este segmento de secuencia adicional también puede preverse como cuarto dominio adicional en una disposición adecuada dentro de la proteína de fusión.

La posibilidad de prever adicionalmente otro segmento de secuencia de este tipo también puede considerarse en el caso de segmentos de unión a ligando procedentes de receptores víricos, siempre que la unión del ligando al segmento de unión a ligando pueda provocar un cambio conformacional tal que se disocie un complejo multiproteico (co)unido previamente a través del segmento de secuencia adicional.

No obstante, el marco de la invención también incluye expresamente mecanismos alternativos para la activación del tercer dominio por un cambio conformacional producido como consecuencia de la unión de un ligando o, alternativamente, por ausencia de unión de ligando.

La función mencionada anteriormente en primer lugar hace que la proteína de fusión llegue a la membrana y, por lo tanto, al lugar de acción de aquella parte de la proteína de fusión que es responsable de la tercera función. El desempeño de la tercera función depende directamente de la función de unión a ligando, mencionada en segundo lugar, de la proteína de fusión, a saber, de la presencia de un ligando que interactúe con este dominio.

Como se ha mencionado, se supone que en ausencia de ligando los receptores nucleares están presentes en la célula en forma de complejos multiproteicos inactivos. Lo mismo debe ser válido en una forma de realización preferida para la proteína de fusión de acuerdo con la invención que en su segundo dominio contiene la secuencia de un receptor nuclear de este tipo o de segmentos de éste. El complejo multiproteico puede comprender en especial proteínas de choque térmico (hsp) propias de la célula. En esta forma de realización, la unión del complejo multiproteico en el contexto celular en ausencia de ligando también constituye una característica esencial en una proteína de fusión de acuerdo con la invención con un segundo dominio que contiene un segmento de unión a ligando mutado o artificial, por ejemplo configurado por modelado molecular, en el que tan sólo se sospecha una función de unión a ligando. Como se ha explicado, ha de preverse para ello dado el caso un segmento proteico adicional en la proteína de fusión, por ejemplo de un receptor nuclear, que medie la unión del complejo multiproteico en ausencia de ligando. En ambos casos, este complejo multiproteico inhibe la actividad del tercer dominio o, lo que es lo mismo, del componente de transducción de señales ras o similar a ras. Sin embargo, cuando se une un ligando específico al segmento de receptor nuclear correspondiente, el complejo multiproteico se disocia del dominio de receptor como en el caso de los receptores nucleares encontrados *in vivo*, y el componente de transducción de señales ras o similar a ras se activa (véanse la fig. 1 y la fig. 3).

En el contexto celular se activa ahora, por acción del componente activo de transducción de señales, una ruta de transducción de señales ras o similar a ras. Si se usa una célula en la que en ausencia de la proteína de fusión esta ruta de señalización ras o similar a ras no está activada, al menos en determinadas condiciones, a causa de mutaciones, ésta se puede detectar en la célula sólo a través de alteraciones fenotípicas, por ejemplo crecimiento o actividad génica o del gen reportero, provocadas por la activación mediada por la proteína de fusión.

En formas de realización preferidas de esta invención el dominio de localización en la membrana comprende la secuencia de aminoácidos de una señal de farnesilación, una señal de miristilación o una señal de prenilación o deriva de ésta, por ejemplo, por sustitución, modificación, inserción o delección de aminoácidos.

En la región del dominio de localización en la membrana o como segmento de secuencia adicional, dispuesto en especial en posición N-terminal, puede preverse asimismo una secuencia señal que si bien no sirve en sí para anclar la proteína de fusión a la membrana, sí aumenta la eficacia con la que la proteína de fusión es transportada hacia la membrana celular tras su expresión. En consecuencia, la mayor concentración resultante de proteína de fusión en la proximidad directa de la membrana conduce, gracias al dominio de localización en la membrana, a una mayor tasa de incorporación de la proteína de fusión en la membrana celular. Tales secuencias señal con preferencia se usan de forma especialmente adaptada al tipo celular en el que se ha de expresar la proteína de fusión, puesto que, por ejemplo, las secuencias señal eficaces en levaduras actúan sólo con una eficacia reducida en las células de mamífero y viceversa. Ejemplos de tales secuencias señal son secuencias señal de RPCR (receptores acoplados a proteína G) propios de levaduras o de la invertasa (SUC2) propia de levaduras para el uso preferido en proteínas de fusión que han de expresarse en células de levadura.

La secuencia de aminoácidos del segundo dominio con la función de unión a ligando de un receptor nuclear puede comprender la secuencia de aminoácidos de un receptor nuclear presente en la naturaleza, como la de un receptor de esteroides, un receptor huérfano, un receptor de vitaminas, por ejemplo el receptor de la vitamina D, un receptor de tiroxina o un receptor de ácido retinoico, o derivar de éste, por ejemplo, por adición, sustitución, modificación, inserción o delección de aminoácidos. De forma alternativa, el segundo dominio puede comprender un segmento de

receptor sintético no presente en la naturaleza, generado, por ejemplo, por modelado molecular, en el que en principio dado el caso sólo se sospecha una función de unión a ligando.

El tercer dominio es capaz de activar con preferencia las rutas de transducción de señales ras que actúan sobre el ciclo celular y cuya activación es esencial para la proliferación celular. De forma alternativa e igualmente preferida actúa sobre una de las rutas de señalización ras que sirven para activar factores de transcripción para genes que no tienen que ser esenciales para la proliferación celular.

El tercer dominio puede presentar la actividad de una proteína Ras activa o, en particular, activa de forma constitutiva. Las proteínas Ras activas de forma constitutiva muestran actividad independientemente de la presencia de moléculas de factor de intercambio de nucleótidos de guanina, que son requeridas por diversas otras proteínas Ras para su actividad. Con este fin, el tercer dominio puede comprender, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de una proteína Ras activa o activa de forma constitutiva presente en la naturaleza, por ejemplo de la Ha-Ras humana (L61), o de partes de ella. Igualmente puede comprender secuencias de aminoácidos que derivan de este tipo de secuencias, por ejemplo por adición, sustitución, modificación, inserción o delección de aminoácidos.

De forma alternativa, el tercer dominio puede presentar la actividad de un factor de intercambio de nucleótidos de guanina funcional. En este aspecto, la secuencia de aminoácidos del tercer dominio también puede comprender, por ejemplo, secuencias de factores de intercambio de nucleótidos de guanina presentes en la naturaleza o secuencias parciales de éstos, o puede derivar de éstas, por ejemplo, por adición, sustitución, modificación, inserción o delección de aminoácidos. En una forma de realización preferida, la secuencia de aminoácidos del tercer dominio deriva de la secuencia de aminoácidos de la proteína CDC25 de *Saccharomyces cerevisiae*, de una proteína SOS de un mamífero o de una proteína similar a SOS derivada de un organismo cualquiera.

En una forma de realización preferida de esta invención, que se ilustra esquemáticamente en las figuras 1 y 3, los dominios individuales están dispuestos en la proteína de fusión desde el extremo N-terminal hacia el extremo C-terminal en la secuencia primer dominio (dominio de localización en la membrana), segundo dominio (dominio con función de unión a ligando), tercer dominio (componente de transducción de señales ras o similar a ras). No obstante, la disposición de los dominios individuales también puede ser otra. A modo de ejemplo se indica aquí una secuencia que va desde el extremo N-terminal en dirección al extremo C-terminal en el orden tercer dominio, segundo dominio, primer dominio.

La proteína de fusión de acuerdo con la invención también puede comprender, dado el caso, dominios o segmentos proteicos adicionales con o sin función, siempre que las funciones antes descritas permanezcan inalteradas o esencialmente inalteradas.

La invención comprende asimismo moléculas de ADN que codifican las proteínas de fusión de acuerdo con la invención, así como vectores, en especial plásmidos, cósmidos, genomas de virus o de fagos, que comprenden al menos una de estas moléculas de ADN. Estos vectores especiales de acuerdo con la invención son adecuados para la transformación o transfección de células huésped o para la expresión de al menos una proteína de fusión de acuerdo con la invención. Para este último propósito, la molécula de ADN de acuerdo con la invención se encuentra en el vector bajo el control de un promotor que es funcional en una célula huésped y que permite y regula la expresión.

La preparación de las proteínas de fusión, las moléculas de ADN y los vectores de acuerdo con la invención puede llevarse a cabo según protocolos conocidos en el estado de la técnica (véanse, por ejemplo, Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989), *Molecular Cloning. A Laboratory Handbook*, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York; *Current Protocols in Molecular Biology* (1991)). Aunque las proteínas de fusión se pueden preparar en principio de forma completamente sintética a partir de derivados de aminoácidos individuales, para lo cual se dispone de diversos procedimientos en el estado de la técnica, habitualmente se producen por expresión de los genes correspondientes en células. En este caso el gen para la proteína de fusión puede estar presente de forma extracromosómica o integrado en el genoma de la célula huésped. La clonación de los genes para las proteínas de fusión a partir de segmentos génicos conocidos que codifican segmentos proteicos con las funciones necesarias o, en el caso del segmento de unión a ligando o de receptor, por el momento sólo sospechadas, así como la construcción de vectores, tales como vectores de transcripción o de transfección o también vectores de expresión, en los que el gen está presente en unión funcional con un promotor eficaz en la célula de producción, la transformación o transfección de células huésped y el cultivo de las células huésped transformadas o transfectadas, respectivamente, para la producción de la proteína forman parte de las habilidades normales de un experto. El aislamiento y la purificación de las proteínas de fusión de acuerdo con la invención pueden realizarse mediante el uso de procedimientos convencionales, tales como precipitación, el uso de diversos procedimientos cromatográficos tales como filtración en gel, cromatografía de afinidad, etc. Sobre todo la cromatografía de afinidad permite que únicamente se una selectivamente la proteína de fusión, por ejemplo usando anticuerpos específicos unidos a la matriz que están dirigidos contra un determinante de un segmento de la proteína de fusión heterólogo con respecto a la célula huésped. De forma alternativa, la proteína de fusión también se puede expresar, por ejemplo, como proteína precursora que presenta un dominio adicional con una propiedad de unión específica a una columna de afinidad determinada. Tras la unión y la elución siguiente de la columna de afinidad, el dominio adicional se puede disociar selectivamente de la proteína precursora, presente ahora de forma esencialmente pura, obteniéndose la proteína de fusión de acuerdo con la invención. Si el dominio adicional no influye en la adecuación de la proteína de fusión para los ensayos de acuerdo con la invención, también existe alternativamente la posibilidad de prescindir del paso de disociación. Un ejemplo de un dominio de este tipo consta de varios, por ejemplo 10, restos

histidina ("His-tag") añadidos adicionalmente en el extremo N-terminal que se unen específicamente a una columna de cromatografía de afinidad de quelato metálico. Respecto a todas las técnicas mencionadas y los reactivos necesarios para ellas, incluidas las moléculas de vector, puede remitirse a la bibliografía convencional (por ejemplo Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989), en el lugar citado; Current Protocols in Molecular Biology (1991)) y a un enorme

5 número de protocolos individuales.

Otro objeto central de la invención son células que contienen una o varias de las proteínas de fusión de acuerdo con la invención. En el marco de esta invención pueden ser heterólogos respecto a la célula huésped o de partida algunos, varios o también todos los dominios de la proteína de fusión y/o, dado el caso, también partes de uno o varios

10 dominios.

La proteína de fusión está presente en las células unida a la membrana debido al dominio de localización en la membrana contenido en la proteína de fusión. De este modo, el segundo y tercer dominios de la proteína de fusión se encuentran intracelularmente en proximidad directa de la membrana celular.

15

Para la preparación de las células de acuerdo con la invención se puede efectuar, por ejemplo, una transformación o transfección de las células de partida con un vector de expresión que contiene un gen para la proteína de fusión de acuerdo con la invención bajo el control de un promotor que es funcional en la célula de partida. Como células de partida se consideran células procarióticas y eucarióticas. Ejemplos de células de partida son, entre otras, células bacterianas, tales como las del género *Escherichia* o *Bacillus*, por ejemplo determinadas cepas de *Escherichia coli* o de *Bacillus subtilis*, células de levadura, como determinadas cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, células de insecto, células animales, tales como COS-7, Vero, células CHO, células de mieloma murino, células FL humanas, etc.

20

Tras la transformación o transfección de una célula de partida, el gen para la proteína de fusión de acuerdo con la invención puede estar presente en la célula transformada o transfectada en forma cromosómica, es decir, integrado en el cromosoma, o como componente de un episoma, en especial de un plásmido, es decir, en forma extracromosómica. Lo mismo es válido para la transformación o transfección adicional de las células con otros genes, en especial con genes o constructos reporteros, la cual, como se explicará con más detalle a continuación, se realiza en el marco de formas de realización especiales de la invención.

30

Una característica esencial de las células de acuerdo con la invención reside en que en ausencia de unión o, alternativamente, cuando se une un ligando al segundo dominio de la proteína de fusión, el tercer dominio no es capaz de provocar la activación de la ruta de señalización posterior a una proteína Ras en las células.

35

En una forma de realización preferida, el tercer dominio está complejoado, en ausencia de unión de ligando, con el segundo dominio mediante un complejo multiproteico, preferentemente propio de la célula, asociado con la proteína de fusión, de tal manera que el tercer dominio no es capaz de provocar la activación de la ruta de señalización posterior a una proteína Ras en las células. Sin embargo, cuando se une un ligando al segundo dominio, se produce un cambio conformacional que repercute en el tercer dominio de manera que a continuación el complejo multiproteico se disocia, al menos parcialmente, de la proteína de fusión y el tercer dominio puede desarrollar su actividad de activación de una ruta de señalización posterior a una proteína Ras en las células.

40

En una forma de realización preferida de esta invención, la célula de acuerdo con la invención se caracteriza porque en ausencia de la proteína de fusión no se puede activar, al menos en determinadas condiciones, una ruta de señalización posterior a una proteína Ras en la célula, en especial la ruta de señalización que puede ser activada por el tercer dominio. En el estado de la técnica se conocen células en las que una determinada ruta de transducción de señales ras es activa o inactiva en función de la temperatura. Este tipo de células se pueden usar como células de partida para la expresión de la proteína de fusión de acuerdo con la invención.

45

La inactivación, presente al menos en determinadas condiciones, de una ruta de transducción de señales ras es el resultado de una proteína Ras y/o un factor de intercambio de nucleótidos de guanina que al menos en las determinadas condiciones no es funcional. La inactivación puede basarse en una mutación génica o en una delección génica total o parcial. Por ejemplo, una proteína Ras propia de la célula se puede inactivar delecionando su señal de localización en la membrana, generalmente una señal de farnesilación. El mismo efecto tendría una mutación en esta señal de localización en la membrana que hace que ya no se pueda producir una unión de la proteína Ras a las membranas celulares. Un ejemplo de una célula con un factor de intercambio de nucleótidos de guanina defectuoso de forma dependiente de la temperatura es la cepa cdc25-2 de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. En esta cepa, el factor de intercambio de nucleótidos de guanina ya no es activo a una temperatura restrictiva de 33 a 37°C, típicamente de 36°C, pero es completamente funcional a una temperatura de, por ejemplo, 25°C. Puesto que en esta cepa de levadura el factor de intercambio de nucleótidos de guanina coopera con una proteína Ras que regula una ruta de transducción de señales ras que actúa sobre el ciclo celular y, por lo tanto, es esencial para el crecimiento celular, ya no se puede detectar proliferación alguna de las células de la cepa de levadura a una temperatura restrictiva.

50

55

60

De forma análoga a las cepas de levadura con una mutación termosensible en una proteína SOS propia de la levadura (CDC25-2), también se puede usar una cepa de levadura con una mutación termosensible en una proteína Ras propia de la levadura.

65

De forma alternativa también se puede usar para la preparación de las células de acuerdo con la invención una célula, por ejemplo una célula de levadura o una célula de mamífero, que sea capaz de expresar una proteína CDC25/SOS o proteína Ras de tipo silvestre o mutada pero activa y en la que, sin embargo, el gen que codifica esta proteína CDC25/SOS o proteína Ras activa se encuentre bajo el control de un promotor inducible por medio del cual se puede inducir o inhibir selectivamente la expresión del gen por elección de determinadas condiciones de cultivo. Ejemplos de promotores inducibles que se pueden usar en este contexto son el promotor de galactosa o partes de él procedente de levadura o de otros organismos. El experto conoce numerosos promotores inducibles adecuados para ello de los más diversos organismos. También se pueden usar promotores híbridos con una inductibilidad adecuada.

Si la célula de acuerdo con la invención expresa una proteína CDC25/SOS activa o una proteína Ras activa, la proteína CDC25/SOS o Ras puede contener adicionalmente, según otra forma de realización preferida de la invención, una modificación que acelera la degradación de la proteína en la célula. Esta modificación puede ser, por ejemplo, una señal de ubiquitina o cualquier otra señal que se haga cargo de la degradación preferente de una proteína modificada de esta manera en la célula. La ventaja de la expresión de una proteína modificada de esta manera mientras está inducido el promotor reside en que tras “desconectar” el promotor, es decir, tras prever condiciones de cultivo en las que el promotor no está inducido y, en consecuencia, ya no se produce ninguna transcripción del gen CDC25/SOS o Ras, se degrada con mayor rapidez la proteína CDC25/SOS o Ras producida todavía durante la inducción del promotor. Por consiguiente, poco después de “desconectar” el promotor ya no se podrá detectar en la célula ninguna proteína CDC25/SOS o Ras activa de este tipo. En la situación preferida en la que el tercer dominio de la proteína de fusión de acuerdo con la invención es capaz de activar precisamente la ruta de señalización activada por la proteína CDC25/SOS o Ras activa antes señalada, resulta posible, pues, medir ya poco después de cambiar las condiciones de cultivo al estado de desconexión del promotor la activación de esta ruta de señalización exclusivamente por los efectos de la proteína de fusión de acuerdo con la invención, lo que puede significar un considerable ahorro de tiempo. De este modo también se puede reducir significativamente la señal de fondo debida a una activación de la ruta de señalización posiblemente presente todavía o siempre en poca extensión que no se debe a la proteína de fusión de acuerdo con la invención.

Si la inactivación o inactivabilidad de la ruta de transducción de señales ras propia de la célula se basa en un defecto o en la ausencia de un factor de intercambio de nucleótidos de guanina, en el caso preferido en el que la proteína de fusión presenta un tercer dominio que puede activar precisamente esta ruta de transducción de señales ras, este tercer dominio puede presentar la actividad de un factor de intercambio de nucleótidos de guanina funcional o de una proteína Ras activa, en especial activa de forma constitutiva, que puede activar la ruta de transducción de señales ras inactiva. Si se usa un tercer dominio con una actividad de una proteína Ras no activa de forma constitutiva, éste presentará convenientemente las siguientes propiedades:

- necesita ser activado por un factor de intercambio de nucleótidos de guanina de otro tipo que no pueda interactuar funcionalmente con la proteína Ras propia de la célula responsable de la ruta de transducción de señales ras inactiva. Dado el caso, este factor de intercambio de nucleótidos de guanina adecuado específicamente se puede coexpresar en la célula de acuerdo con la invención como factor heterólogo.

Si la inactivación o inactivabilidad de la ruta de señalización ras propia de la célula se basa en un defecto o en la ausencia de una proteína Ras propia de la célula, en el caso preferido en el que la proteína de fusión presenta un tercer dominio que puede activar precisamente esta ruta de señalización ras, este tercer dominio presentará la actividad de una proteína Ras activa, en especial activa de forma constitutiva. Si el tercer dominio presenta la actividad de una proteína Ras no activa de forma constitutiva, su activación se produce preferentemente mediante un factor de intercambio de nucleótidos de guanina propio de la célula, aunque también puede requerir alternativamente un factor de intercambio de nucleótidos de guanina heterólogo que se ha de coexpresar en la célula.

Las técnicas de biología molecular necesarias para la preparación de las células de acuerdo con la invención, por ejemplo clonación, construcción de vectores, transformación o transfección, selección de células transformadas o transfectadas y cultivo de las células transformadas o transfectadas etc., son conocidas para el experto, y existen muchos protocolos generales para ellas que en todo caso precisarán una ligera adaptación; véanse, por ejemplo, Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989), en el lugar citado; Current Protocols in Molecular Biology (1991), así como numerosos protocolos elaborados especialmente para un tipo celular concreto. Como se ha mencionado, la expresión de la proteína de fusión puede llevarse a cabo tanto a partir de un gen contenido en un episoma, por ejemplo en un plásmido, presente en forma extracromosómica como a partir de un gen integrado en el genoma de la célula de partida. Para la generación de células en las que está inactivada una ruta de transducción de señales ras determinada a nivel de la proteína Ras o de un factor de intercambio de nucleótidos de guanina, el experto dispone de diversas técnicas para la inactivación selectiva de genes, por ejemplo por estrategias antisentido, o para la introducción selectiva de mutaciones o deleciones en los genes correspondientes o los segmentos genómicos relacionados. En particular existen diversas posibilidades conocidas para la preparación de mutantes celulares en los que en determinadas condiciones, por ejemplo de forma dependiente de la temperatura, se puede inactivar selectivamente la transcripción de los genes para, por ejemplo, la proteína Ras o un factor de intercambio de nucleótidos de guanina. Para ello, estas células contienen estos genes en particular unidos a promotores que se inactivan en determinadas condiciones, por ejemplo a partir de una temperatura determinada.

En una forma de realización especial de la invención, las células de acuerdo con la invención están aplicadas sobre un soporte sólido. Como sustancias de soporte adecuadas se conocen en el estado de la técnica especialmente polisacá-

ridos, por ejemplo agarosa, plásticos especiales tales como poliacrilamidas, poliestireno, poli(alcohol vinílico), siliconas o también ciertas calidades de vidrio. El soporte puede estar presente en forma de partículas discretas, por ejemplo esferas, o de sustrato esencialmente plano, por ejemplo en forma de una placa de microvaloración. La cubrición del soporte con las células puede ser completa, como es generalmente el caso de, por ejemplo, las esferas de soporte, o también estar presente sólo en partes o segmentos del mismo, por ejemplo sólo en las depresiones de una placa de microvaloración. En una forma de realización preferida, las células de acuerdo con la invención están inmovilizadas en los denominados biochips. El experto conoce procedimientos para la inmovilización de las células sobre estos soportes. Dependiendo del tipo de soporte seleccionado es posible que las células se unan al soporte sin medidas adicionales. En este caso se incubaba la fase de soporte sólida con una población esencialmente homogénea de células, adhiriéndose éstas a continuación a la fase sólida. De forma alternativa, la inmovilización también se puede realizar, por ejemplo, mediante agentes químicos, tales como glutaraldehído, formalina, etc. Estas medidas son conocidas para el experto.

Las proteínas de fusión de acuerdo con la invención y las células que comprenden estas proteínas de fusión constituyen la base para varios procedimientos de ensayo *in vivo* que igualmente son objeto de esta invención. Los procedimientos de ensayo descritos con más detalle a continuación se pueden usar, cuando se aplica la primera variante, es decir, cuando el tercer dominio es activo únicamente en caso de unión del ligando al segmento de unión a ligando (segundo dominio) de la proteína de fusión de acuerdo con la invención, entre otras cosas para

1. determinar la adecuación de una sustancia de ensayo como ligando para un receptor nuclear y realizar en este caso especialmente cribados en masa con derivados del ligando para analizar qué derivados son capaces de unirse a un segmento de unión a ligando de un receptor nuclear de tipo silvestre,
2. detectar la presencia de un ligando determinado en una muestra,
3. determinar la concentración de un ligando de este tipo en una muestra,
4. determinar si un compuesto es capaz de modificar la actividad de unión de un segmento de unión a ligando de un receptor nuclear frente a un ligando, es decir, de actuar como agonista, antagonista o inhibidor, y realizar en este caso especialmente cribados en masa para encontrar tales compuestos agonistas o antagonistas;
5. demostrar la función de unión a ligando de un polipéptido o de una proteína que se sospecha presenta una función de este tipo para ligandos de receptores nucleares; en el caso de los polipéptidos o proteínas también se puede tratar, en particular, de nuevos receptores nucleares derivados de receptores naturales por mutación cuya función de unión a ligando todavía está por confirmar; en este contexto se pueden realizar en especial cribados en masa con estos nuevos segmentos de unión a ligando mutados que, por ejemplo, están presentes en forma de una librería de mutantes de receptores que contiene especialmente mutantes de receptores con mutaciones localizadas al azar en el segmento de unión a ligando, para encontrar nuevas parejas ligando/receptor funcionales artificiales.

Un primer ensayo sirve para determinar la adecuación de una sustancia de ensayo como ligando para un segmento de receptor o, lo que es lo mismo, de unión a ligando de un receptor nuclear y comprende los siguientes pasos:

- (a) Poner en contacto la sustancia de ensayo con las células de acuerdo con la invención en unas condiciones en las que, en ausencia de la proteína de fusión, no se pueda activar una ruta de señalización posterior a una proteína Ras en las células, comprendiendo la proteína de fusión contenida en las células un segundo dominio que comprende el segmento de receptor mencionado y un tercer dominio que es capaz de activar la ruta de señalización inactiva posterior a una proteína Ras en las células,
- (b) analizar si se ha producido una activación de la ruta de señalización posterior a una proteína Ras.

La detección de una activación de la ruta de señalización posterior a una proteína Ras indica la capacidad de unión de la sustancia de ensayo al segundo dominio de la proteína de fusión y, por consiguiente, al segmento de receptor.

Otro ensayo *in vivo* permite detectar la presencia de un ligando para un segmento de receptor de un receptor nuclear en una muestra que posiblemente lo contenga, y se caracteriza por los siguientes pasos:

- (a) Poner en contacto la muestra con las células de acuerdo con la invención en unas condiciones en las que, en ausencia de la proteína de fusión, no se pueda activar una ruta de señalización posterior a una proteína Ras en las células, comprendiendo la proteína de fusión contenida en las células un segundo dominio que comprende el segmento de receptor mencionado y un tercer dominio que es capaz de activar la ruta de señalización inactiva posterior a una proteína Ras en las células,
- (b) analizar si se ha producido una activación de la ruta de señalización posterior a una proteína Ras.

De forma análoga al ensayo mencionado en primer lugar, la detección de una activación de la ruta de señalización posterior a una proteína Ras muestra la presencia de un ligando para el segundo dominio de la proteína de fusión y, por consiguiente, para el segmento de receptor de un receptor nuclear en la muestra.

ES 2 322 726 T3

Como rutas de señalización ras preferidas se consideran en este contexto, como se ha descrito, las rutas de señalización que actúan sobre el ciclo celular y cuya activación es esencial para la proliferación celular. Otras rutas de señalización ras alternativas e igualmente preferidas sirven para activar factores de transcripción para genes que no tienen que ser esenciales para la proliferación celular.

En los ensayos de acuerdo con la invención la detección de la activación de la ruta de señalización ras se lleva a cabo preferentemente de forma indirecta, es decir, a través de alteraciones fenotípicas en las células, en este caso especialmente a través de la proliferación celular o la actividad génica o del gen reportero.

Si por consiguiente se usan para los ensayos células en las que la ruta de señalización inactiva posterior a una proteína Ras es una ruta de señalización que actúa sobre el ciclo celular y cuya activación es esencial para la proliferación celular, los pasos (b) antes descritos comprenden analizar si las células son capaces de proliferar en las condiciones mencionadas, indicando la detección de una capacidad de proliferación de las células la capacidad de unión de la sustancia de ensayo a o la presencia de un ligando para el segundo dominio de la proteína de fusión y, por consiguiente, para el segmento de receptor de un receptor nuclear en la muestra.

Si para los ensayos se usan alternativamente células en las que la ruta de señalización inactiva posterior a una proteína Ras es una ruta de señalización que actúa sobre la actividad de un factor de transcripción para un gen que no es necesariamente esencial para la proliferación celular, se puede usar, en presencia simultánea de un constructo que comprende un sitio de unión para el factor de transcripción, un promotor mínimo que coopera con él y un gen reportero heterólogo respecto a la célula de ensayo que se encuentra bajo el control del promotor mínimo, la detección de la expresión del gen reportero heterólogo para comprobar la activación de la ruta de transducción de señales ras y, con ello, el establecimiento de la unión de ligando al segundo dominio. Pues únicamente la activación de la ruta de transducción de señales ras puede producir la activación del factor de transcripción mencionado, el cual puede activar a continuación el promotor mínimo a través de la unión a su sitio de unión permitiendo de este modo la expresión del gen reportero.

En esta forma de realización es esencial que en el caso del gen reportero y/o de la proteína reportera codificada por él se trate de un gen o proteína, respectivamente, heterólogo respecto a la célula de ensayo cuya presencia sólo se pueda detectar específicamente cuando se produce la expresión del constructo sintético promotor/gen reportero a causa de la activación de la ruta de señalización ras específica y de la activación consecuente del factor de transcripción específico. Si la detección no se produce a través de una detección directa del producto de transcripción o de traducción mediante sondas de ácido nucleico o anticuerpos específicos de él sino, por ejemplo, a través de la actividad enzimática de un producto de traducción, debe asegurarse previamente, cuando se usan genes que codifican enzimas, que la célula de ensayo usada no contiene antes de la transformación o transfección con el constructo sintético promotor/gen reportero una actividad enzimática como la que ejerce la enzima heteróloga expresada en caso de unión de ligando. Lo mismo es válido para los demás tipos de proteínas reporteras.

De forma alternativa también se puede usar como gen reportero un gen homólogo respecto a la célula de ensayo. La expresión del gen reportero como consecuencia de la activación de un factor de transcripción que sólo se produce en las células por la activación de una ruta de señalización posterior a una proteína Ras que se ha de detectar en el ensayo, conducirá en este caso a un aumento de las cantidades de producto de transcripción del gen reportero presentes en las células y, dado el caso, también a una mayor cantidad de producto de traducción del gen reportero, las cuales se pueden hallar mediante ensayos comparativos sin el uso de ligando, por ejemplo mediante transferencia Northern o transferencia Western.

Si se eligen estas dos alternativas mencionadas en último lugar, es necesario conocer el factor de transcripción correspondiente activado por la ruta de transducción de señales ras seleccionada, así como el segmento del promotor que coopera con este factor de transcripción y/o su secuencia. Para poder realizar esta variante de ensayo, la célula de ensayo se transforma o transfecta con un constructo que comprende el promotor en unión funcional con el gen reportero, lo cual puede efectuarse dado el caso a modo de cotransformación o cotransfección junto con el constructo que contiene el gen que codifica la proteína de fusión. Como se ha mencionado, estos constructos pueden estar presentes en la célula de ensayo tras la transformación o transfección de una célula de partida en forma cromosómica o extracromosómica, es decir, como componente de un episoma, por ejemplo de un plásmido.

En la actualidad se han realizado ya investigaciones completas, por ejemplo en diferentes organismos eucarióticos, de una serie de rutas de transducción de señales ras que incluyen también los factores de transcripción activados por ellas y las regiones promotoras que cooperan con éstos. Por lo tanto, el experto dispone de una serie de posibilidades de elección a este respecto.

En una forma de realización preferida de la invención, la proteína reportera comprende una modificación por medio de la cual la proteína se descompone o degrada aceleradamente en la célula. Esta modificación puede ser, por ejemplo, una señal de ubiquitina u otra señal que se haga cargo de la descomposición de una proteína modificada de esta manera. La ventaja del uso de una proteína reportera que se degrada aceleradamente en una célula de ensayo es obvia en vista del hecho de que en las condiciones de ensayo prácticamente siempre se detectará en la célula de ensayo una ligera expresión de fondo del constructo del gen reportero, incluso sin la activación de la ruta de señalización posterior a una proteína Ras por la proteína de fusión: por la degradación acelerada de la proteína reportera, la señal resultante de esta expresión de fondo se reduce significativamente en el caso de la detección a nivel de proteína, es decir, de

la proteína reportera, puesto que no se produce una acumulación de la proteína reportera a lo largo del tiempo. Sin embargo, cuando la expresión de la proteína reportera se activa selectivamente por la unión de ligando a la proteína de fusión y por la activación resultante de una ruta de señalización posterior a una proteína Ras, puede realizarse una detección inequívoca gracias a la reducida señal de fondo. Puesto que la semivida de la proteína reportera en la célula de ensayo siempre será suficientemente larga, la detección de la proteína reportera generada como consecuencia de la unión de ligando a la proteína de fusión no se verá afectada en ningún sentido debido a la degradación acelerada de la misma.

Las técnicas de biología molecular, por ejemplo la clonación, la construcción de vectores, etc., necesarias para la preparación de los vectores de transformación o de expresión que contienen el gen reportero en unión funcional con un promotor específico adecuado, así como para la transformación o transfección de células son conocidas para el experto, y existen numerosos protocolos generales para ellas que en todo caso precisarán una ligera adaptación (véanse, por ejemplo, Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989), en el lugar citado; *Current Protocols in Molecular Biology* (1991)). La adición y/o fusión de un gen reportero con un segmento de secuencia que codifica un segmento señal que provoca una degradación acelerada de la proteína reportera expresada, por ejemplo una señal de ubiquitina, tampoco constituye ningún problema para un experto.

Como genes reporteros que se pueden usar en este caso el experto conoce numerosos genes que codifican proteínas accesibles a una detección fácil y rápida. Ejemplos de ellos son genes que codifican proteínas con actividad enzimática, por ejemplo β -galactosidasa, proteínas fluorescentes, por ejemplo GFP (proteína verde fluorescente), o proteínas quimoluminiscentes. Otra posibilidad reside en los genes que codifican proteínas que se pueden detectar mediante anticuerpos específicos. En este caso el anticuerpo lleva una marca detectable o se puede detectar a su vez mediante un anticuerpo secundario marcado. Estas posibilidades son conocidas en el estado de la técnica. Como ya se ha explicado anteriormente, únicamente es esencial, además del requisito de la detectabilidad, que el acontecimiento que se ha de detectar en la célula, por ejemplo actividad enzimática, unión de anticuerpo, fluorescencia, quimoluminiscencia, no se pueda detectar en ausencia del constructo con el gen para la proteína reportera.

De forma alternativa, la transcripción del gen reportero se puede detectar por transferencia Northern detectando el ARNm formado mediante sondas específicas de éste.

Otro ensayo *in vivo* permite la determinación cuantitativa de la concentración de un ligando para el segmento de receptor de un receptor nuclear en una muestra que lo contiene, y comprende los siguientes pasos:

- (a) Poner en contacto una alícuota de la muestra con las células de acuerdo con la invención en unas condiciones en las que, en ausencia de la proteína de fusión, no se pueda activar una ruta de señalización posterior a una proteína Ras en las células, comprendiendo la proteína de fusión contenida en las células un segundo dominio que comprende el segmento de receptor mencionado y un tercer dominio que es capaz de activar la ruta de señalización inactiva posterior a una proteína Ras en las células,
- (b) detección cuantitativa de la magnitud de la activación de la ruta de señalización posterior a una proteína Ras de manera directa o indirecta y
- (c) determinación de la concentración del ligando en la muestra por comparación de la magnitud de activación hallada con los valores correspondientes determinados para concentraciones de referencia conocidas del ligando.

Si para la detección cuantitativa del paso (b) se usan células en las que la ruta de transducción de señales ras inactiva al menos en determinadas condiciones es una ruta de señalización que actúa sobre el ciclo celular y cuya activación es esencial para la proliferación celular, ésta se realiza de manera sencilla determinando la proliferación de las células en un momento establecido o la tasa de proliferación de las células en las condiciones mencionadas. Los datos obtenidos se comparan después con los datos obtenidos a partir de preparaciones de referencia de concentración conocida y se calcula la concentración de la muestra.

De forma alternativa, la detección cuantitativa de la magnitud de la activación de la ruta de señalización ras se puede realizar también en este caso por medio de la magnitud de la expresión de un gen reportero en la célula. Como se ha explicado anteriormente, su expresión sólo se puede producir por activación de un factor de transcripción específico como consecuencia de la activación de la ruta de señalización posterior a una proteína Ras. En esta variante de detección, el ensayo se lleva a cabo preferentemente en unas condiciones que excluyan la proliferación celular, por ejemplo usando el mutante de levadura *cdc25-2* a temperaturas restrictivas, de manera que se pueda determinar la cantidad de producto de transcripción del gen reportero o la cantidad expresada de proteína reportera en un momento determinado o, alternativamente, la tasa de expresión de este gen reportero respecto al producto de transcripción o de traducción de éste permaneciendo el número de células esencialmente constante. No obstante, la determinación cuantitativa también puede llevarse a cabo en condiciones de proliferación si simultáneamente se determina de forma continua o en determinados intervalos de tiempo el número de células y los valores hallados para la expresión del gen reportero se convierten en valores por valor unitario del número de células.

De forma alternativa, también en este caso se puede usar una detección a través de la expresión de un gen reportero homólogo respecto a la célula huésped, en la que para hallar el resultado se usa el incremento que se puede observar

ES 2 322 726 T3

en cada caso en la expresión del gen reportero frente al nivel de expresión presente en las células sin activación de la ruta de señalización ras.

Otro ensayo *in vivo* alternativo permite detectar si un compuesto es capaz de modificar la actividad de unión de un segmento de receptor de un receptor nuclear frente a un ligando, es decir, de actuar de agonista, antagonista o inhibidor. Este ensayo se caracteriza por los siguientes pasos:

- (a) Poner en contacto el ligando con las células de acuerdo con la invención en presencia del compuesto, en unas condiciones en las que el compuesto puede difundir hacia el interior de las células o es producido por las células y en las que, en ausencia de la proteína de fusión, no se puede activar una ruta de señalización posterior a una proteína Ras en las células, comprendiendo la proteína de fusión contenida en las células un segundo dominio que comprende el segmento de receptor mencionado y un tercer dominio que es capaz de activar la ruta de señalización inactiva posterior a una proteína Ras,
- (b) analizar si y, dado el caso, en qué medida se ha efectuado una activación de la ruta de señalización posterior a una proteína Ras,
- (c) comparar el resultado del análisis del paso (b) con el resultado de análisis que se obtiene cuando el ensayo se realiza en ausencia del compuesto.

Una activación intensificada de la ruta de transducción de señales ras en presencia del compuesto muestra una función agonista para este compuesto, una activación reducida o, dado el caso, completamente ausente, en cambio, una función antagonista o inhibidora para el compuesto.

El paso (a) puede comprender añadir el compuesto a las células antes que el ligando, pudiéndose efectuar, dado el caso, una incubación previa del compuesto con las células, añadir el compuesto por separado pero simultáneamente con el ligando a las células de ensayo o mezclar el compuesto primero con el ligando, realizar, dado el caso, una incubación previa de ambos compuestos y añadir sólo entonces la mezcla a las células de ensayo.

Si el compuesto se añade a las células, debe asegurarse que el compuesto también puede difundir hacia el interior de las células para interactuar allí con la proteína de fusión. Si en el caso del compuesto se trata de un péptido, polipéptido o proteína, el compuesto también se puede producir en la célula misma por expresión de un gen que lo codifica. Para este propósito las células se pueden transformar o transfectar con un vector de expresión que contiene un gen de este tipo. El experto conoce los medios y procedimientos necesarios para ello.

Si el compuesto que se ha de ensayar respecto a su efecto agonista o antagonista se expresa en la célula de ensayo, la expresión del gen que lo codifica se lleva a cabo preferentemente bajo el control de un promotor activo de forma constitutiva, así como usando células en las que la ruta de transducción de señales ras únicamente se inactiva en las condiciones de ensayo especiales. Un sistema de este tipo permite excluir que la sola expresión del compuesto en la célula provoque alteraciones que puedan falsear el resultado del ensayo. Para esta exclusión es necesario detectar en condiciones no restrictivas y en ausencia de ligando la actividad de la ruta de transducción de señales ras propia de la célula inactivada en condiciones restrictivas. Si se trabaja en condiciones no restrictivas y en ausencia de ligando, la proteína de fusión es inactiva, de modo que la activación detectable de la ruta de transducción de señales ras indica que el producto de expresión no interfiere con ningún componente de la ruta de transducción de señales ras ni, en particular, con la proteína Ras o el factor de intercambio de nucleótidos de guanina específicos de ella. De este modo se puede excluir o minimizar la probabilidad de que el producto de expresión interactúe con el tercer dominio en lugar de con el segundo dominio, de manera que se elimina su capacidad de activación de la ruta de transducción de señales ras.

Un ensayo correspondiente para detectar la activación de la ruta de transducción de señales ras correspondiente en condiciones no restrictivas y en presencia del compuesto y ausencia de ligando se lleva a cabo de forma análoga en el caso de un compuesto que se añade a las células de ensayo desde el exterior.

Si en el caso de la ruta de transducción de señales ras inactivable en las condiciones de ensayo se trata de una cuya activación es esencial para la proliferación celular, se asegura simplemente la proliferabilidad normal de las células en condiciones no restrictivas. Si la detección se realiza usando la actividad de un gen reportero, es necesario detectar esta actividad del gen reportero en condiciones no restrictivas.

Para la detección en las condiciones restrictivas del ensayo según el paso (b) también existe, por ejemplo, la posibilidad de detectar la activación de la ruta de señalización posterior a una proteína Ras a través de la expresión, dado el caso producida, de un gen reportero heterólogo respecto a las células que sólo se produce por la activación de un factor de transcripción específico como consecuencia de la activación de la ruta de señalización posterior a una proteína Ras. La detección de la magnitud de esta activación, que se realiza en caso de detección de una activación de la ruta de señalización posterior a una proteína Ras, puede comprender una determinación cuantitativa en la que se determina la cantidad de producto de transcripción o de traducción (proteína reportera) del gen reportero presente en las células en un momento determinado o la tasa de transcripción del gen reportero o la tasa de expresión de la proteína reportera en las condiciones mencionadas.

De forma alternativa, también se puede efectuar sólo un análisis de alícuotas, es decir, de volúmenes iguales de las soluciones de ensayo generadas y tratadas de forma idéntica salvo por la adición del compuesto, asegurando preferentemente un número igual o esencialmente igual de células en estas alícuotas. En este caso no se realiza una cuantificación absoluta del nivel de expresión del gen reportero, sino que sólo se permite una comparación relativa del nivel de expresión en los dos ensayos.

En el caso en el que la comparación en el paso (c) da como resultado que en presencia del compuesto se produce una mayor expresión del gen reportero, cabe suponer un efecto agonista del compuesto, y en el caso en el que la comparación en el paso (c) da como resultado que en presencia del compuesto se produce una menor expresión del gen reportero, un efecto antagonista del compuesto. Igual que el ensayo cuantitativo antes descrito, este ensayo también se realiza preferentemente en unas condiciones en las que no se produce proliferación celular.

De forma alternativa, también en este caso el gen reportero usado para la detección puede ser homólogo respecto a la célula de ensayo, usándose para la obtención del resultado el incremento de la expresión, es decir, de la transcripción y/o traducción, del gen reportero que se puede observar en cada caso respecto al nivel de expresión presente en las células sin activación de la ruta de señalización ras.

Si para el ensayo se usan células en las que la ruta de señalización inactiva posterior a una proteína Ras es una ruta de señalización que actúa sobre el ciclo celular y cuya activación es esencial para la proliferación celular, el paso (b) comprende analizar si y, dado el caso, en qué medida las células son capaces de proliferar en las condiciones mencionadas. En el caso en el que la comparación en el paso (c) da como resultado un aumento de la proliferación celular en presencia del compuesto, puede deducirse un efecto agonista del compuesto, y en el caso en el que la comparación en el paso (c) da como resultado una disminución de la proliferación celular en presencia del compuesto, un efecto antagonista del compuesto.

Al igual que todos los ensayos incluidos en el marco de esta invención, este ensayo también es especialmente adecuado para un cribado en masa, en este caso respecto a compuestos agonistas y antagonistas para receptores nucleares.

De forma alternativa, este ensayo también se puede usar como ensayo adicional para confirmar la propiedad de unión a ligando de un nuevo segmento de unión a ligando, en especial sintético, o para confirmar la adecuación de una sustancia de ensayo como ligando para el segmento de unión a ligando. Si existe una propiedad de unión a ligando en el segmento de unión a ligando o existe una adecuación como ligando para el segmento de unión a ligando, respectivamente, debería observarse, en el caso de usar un agonista conocido para el ligando usado para la primera detección de la propiedad de ligando o para el segmento de unión a ligando, una mayor activación de la ruta de señalización ras o similar a ras, y en el caso de usar un antagonista conocido para el ligando o para el segmento de unión a ligando, en cambio, una menor activación de la ruta de señalización ras o similar a ras.

Otro ensayo *in vivo* alternativo permite detectar si un polipéptido o una proteína que se sospecha presenta una función de unión a ligando de un receptor nuclear realmente la presenta. Este ensayo comprende los siguientes pasos:

(a) Poner en contacto las células de acuerdo con la invención con el ligando en unas condiciones en las que, en ausencia de la proteína de fusión, no se pueda activar una ruta de señalización posterior a una proteína Ras en las células, comprendiendo la proteína de fusión contenida en las células un segundo dominio que comprende el polipéptido o la proteína que se ha de analizar y un tercer dominio que es capaz de activar la ruta de señalización inactiva posterior a una proteína ras en las células,

(b) analizar si se ha producido una activación de la ruta de señalización posterior a una proteína Ras.

La detección de una activación de la ruta de señalización posterior a una proteína Ras indica que el segundo dominio de la proteína de fusión y, por consiguiente, el polipéptido o la proteína que se ha de analizar presenta una función de unión a ligando de un receptor nuclear.

La proteína de fusión contenida en las células puede comprender, por ejemplo, un segundo dominio que contiene un segmento de receptor derivado de un segmento de receptor natural de un receptor nuclear por mutación.

De nuevo, en el caso de usar células en las que la ruta de transducción de señales ras inactiva al menos en determinadas condiciones es una ruta de señalización que actúa sobre el ciclo celular y cuya activación es esencial para la proliferación celular, la activación de la ruta de transducción de señales ras puede detectarse mediante la proliferación celular que se produce dado el caso.

De forma alternativa, la detección de la activación de la ruta de transducción de señales ras también se puede efectuar mediante la expresión de un gen reportero, dado el caso observable, en las células. Como se ha explicado, cuando se trata de un gen reportero heterólogo, su expresión sólo se produce por la activación de un factor de transcripción específico como consecuencia de la activación de la ruta de señalización posterior a una proteína Ras. En el caso de un gen reportero homólogo se detecta el incremento de la expresión del gen reportero, por ejemplo en base a mayores cantidades de producto de transcripción o de traducción, en comparación con el nivel de expresión sin activación de la ruta de transducción de señales ras específica.

ES 2 322 726 T3

Cuando se aplica la segunda variante, es decir, cuando sólo hay actividad del tercer dominio en *ausencia* de unión de ligando al segmento de unión a ligando (segundo dominio) de la proteína de fusión de acuerdo con la invención, los procedimientos de ensayo de acuerdo con la invención se pueden usar, entre otras cosas, para

1. determinar la adecuación de una sustancia de ensayo como ligando para un receptor nuclear y realizar en este caso especialmente cribados en masa con derivados del ligando para analizar qué derivados son capaces de unirse al segmento de unión a ligando de un receptor nuclear de tipo silvestre,
2. detectar la presencia de un ligando determinado en una muestra,
3. determinar si un compuesto es capaz de modificar la actividad de unión de un segmento de unión a ligando de un receptor nuclear frente a un ligando, es decir, de actuar de agonista, antagonista o inhibidor, y realizar en este caso especialmente cribados en masa para encontrar tales compuestos agonistas o antagonistas;
4. demostrar la función de unión a ligando de un polipéptido o de una proteína que se sospecha presenta tal función para ligandos de determinados receptores nucleares; en el caso de los polipéptidos o proteínas también se puede tratar en particular de nuevos segmentos de receptor de unión a ligando derivados de receptores naturales por mutación cuya función de unión a ligando todavía está por confirmar; en este contexto se pueden realizar en especial cribados en masa con estos nuevos segmentos de unión a ligando mutados que, por ejemplo, están presentes en forma de una librería de mutantes de receptores que contiene especialmente mutantes de receptores con mutaciones localizadas al azar en el segmento de unión a ligando, para encontrar nuevas parejas ligando/receptor funcionales artificiales.

Los ensayos antes mencionados se pueden llevar a cabo de forma esencialmente análoga a las variantes de ensayo descritas previamente aplicando la primera variante, en cuyo caso, sin embargo, la detección de la activación de la ruta de señalización ras o similar a ras indica la ausencia de un ligando para el segmento de unión a ligando de la proteína de fusión estudiada en la célula de ensayo. Por consiguiente, los ensayos mencionados en último lugar comprenderán generalmente dos detecciones, a saber, una detección en presencia de un ligando (potencial), en cuyo caso no se detectará ninguna activación de la ruta de señalización ras o similar a ras si el ligando (potencial) presenta una propiedad de unión de ligando para el segmento de unión a ligando (segundo dominio) de la proteína de fusión, así como otra detección en ausencia del ligando (potencial), en cuyo caso normalmente se detectará una activación de este tipo.

En el caso de determinar si un compuesto es capaz de modificar una actividad de unión de un segmento de unión a ligando de un receptor nuclear frente a un ligando, es decir, de actuar de agonista, antagonista o inhibidor, la detección se lleva a cabo en presencia simultánea de ligando y compuesto, especialmente a través de

- a) la activación de la ruta de señalización ras o similar a ras, que posiblemente sí se pueda detectar en el caso de que el compuesto presente un efecto antagonista o inhibidor, por ejemplo con la determinación siguiente de la concentración de ligando necesaria para la inactividad total de la ruta de señalización ras o similar a ras a una concentración determinada del compuesto, o la determinación de la dependencia de la activación de la ruta de señalización de la concentración del compuesto a una concentración determinada del ligando;
- b) la inactividad total de la ruta de señalización ras o similar a ras ya a una concentración reducida de ligando en el caso de que el compuesto presente un efecto agonista; también en este caso se puede determinar en detalle la dependencia de la inactividad total de la ruta de señalización ras o similar a ras de la concentración del compuesto y/o del ligando.

En el caso de la detección de una función de unión a ligando en un polipéptido o una proteína que se sospecha presenta tal función para ligandos de receptores determinados, la detección de la función de unión a ligando se realiza de forma análoga a través de la inactividad de la ruta de señalización ras o similar a ras en presencia de ligando cuando esta ruta de señalización es activa en ausencia de ligando.

La detección de las interacciones receptor nuclear/ligando mediante los procedimientos de ensayo, las células y las proteínas de fusión de acuerdo con la invención no está limitada a células eucarióticas como sistema de ensayo *in vivo*, sino que también se puede realizar opcionalmente en células procarióticas.

Respecto a las condiciones de ensayo no se requieren especificaciones generales determinadas. En el caso de una detección de la proliferación celular, dado el caso producida, debe tenerse en cuenta, sin embargo, que el medio usado permita en principio tal proliferación. Si en las células se pueden inactivar, como se ha explicado, genes y/o promotores por elección de determinadas condiciones de ensayo y éstos también deben inactivarse durante el ensayo, estas condiciones, por ejemplo una determinada temperatura de ensayo restrictiva, que en las células cdc25-2 es, por ejemplo, de 33 a 37°C, deben mantenerse durante el ensayo. El medio de reacción seleccionado no debería interactuar con el compuesto de ensayo ni con el ligando que se añaden a éste de manera que se altere el ensayo.

En todos los procedimientos de ensayo antes descritos se pueden analizar y/o determinar como ligandos sustancias presentes en la naturaleza, tales como hormonas, en particular hormonas esteroideas, vitaminas, por ejemplo vitami-

na D, tiroxina o ácido retinoico, así como sustancias que no están presentes en la naturaleza, por ejemplo derivados sintéticos de ligandos naturales o sustancias tóxicas, tales como dioxina. Puesto que los ligandos de receptores nucleares constituyen predominantemente moléculas pequeñas con una masa molecular relativa baja y de naturaleza predominantemente hidrófoba, éstos difunden sin medidas adicionales al interior de las células de ensayo de acuerdo con la invención para efectuar allí una unión con el segmento de unión a ligando de la proteína de fusión localizado intracelularmente y directamente junto a la membrana celular. No obstante, si se desea y/o se requiere, las células también se pueden tratar previamente, antes del ensayo, de manera adecuada para aumentar la permeabilidad de la membrana celular exterior para el paso del compuesto de ensayo o del ligando. Un ejemplo de ello es la preparación de células “fantasma” sin pared celular, por ejemplo de células de levadura sin pared celular, mediante, por ejemplo, tratamiento enzimático de las células. En el presente contexto, el término “células” también abarca tanto estas células “fantasma” como las preparadas de otra manera, así como las células con una pared celular modificada de otra manera para aumentar la permeabilidad.

Si en el caso de los ligandos que se han de analizar se trata de péptidos, polipéptidos o proteínas, éstos también se pueden expresar en la célula de ensayo a partir de constructos de ácido nucleico que los codifican introducidos en la célula de ensayo, en una variante especial también no de forma constitutiva sino bajo el control de un promotor inducible; una vez introducidos en la célula de ensayo, los constructos pueden encontrarse en ésta en forma cromosómica o extracromosómica, es decir, como componente de un episoma, por ejemplo de un plásmido. Por lo tanto, en el caso de una expresión no constitutiva, la puesta en contacto de la célula de ensayo con el ligando se realiza en las condiciones en las que se induce en la célula la expresión del ligando que se ha de ensayar. El experto conoce para este fin numerosos promotores inducibles que, por ejemplo, se pueden inducir por determinadas temperaturas o compuestos químicos.

Cabe señalar en general que cuando se añade el ligando que se ha de ensayar a la célula de ensayo desde el exterior, todos los componentes que cooperan en el sistema de ensayo de acuerdo con la invención, en particular la proteína de fusión así como todos los componentes de la ruta de señalización posterior a una proteína Ras activada específicamente por el tercer dominio de la proteína de fusión que sólo intervienen en esta ruta de señalización específica, pueden expresarse de forma constitutiva en la célula de ensayo. Cuando el ligando que se ha de ensayar se expresa en la célula de ensayo, en la primera variante, en la que el tercer dominio sólo puede desarrollar su actividad de activación de una ruta de señalización posterior a una proteína Ras cuando el ligando se une al segmento de unión a ligando de la proteína de fusión analizada, todos los componentes del sistema de ensayo excepto uno, incluido ahora el ligando, se pueden expresar de forma constitutiva en la célula de ensayo. El (los) componente(s) del sistema de ensayo cuyo(s) gen(es) se prevé(n) bajo el control de un promotor inducible en particular sólo se expresa(n) en las condiciones de ensayo, es decir, cuando se analiza la activación, posiblemente producida, de la ruta de transducción de señales ras o similar a ras, debido a la inducción selectiva del/los promotor(es) inducible(s) usado(s) en cada caso. En la segunda variante, en la que el tercer dominio de la proteína de fusión sólo puede desarrollar su actividad en ausencia de unión de ligando al segundo dominio de la proteína de fusión, el gen siempre se preverá, en el caso de la expresión del ligando en la célula de ensayo, bajo el control de un promotor inducible para permitir la detección también en ausencia del ligando.

La detección de la activación de la ruta de transducción de señales ras se realiza, dependiendo de la estrategia de detección, de manera habitual para el experto. Si durante el ensayo las células se encuentran inmovilizadas sobre un soporte sólido, puede resultar necesario o útil, especialmente en el caso de la detección de la actividad o transcripción de un gen reportero o de una proteína reportera, solubilizar las células antes de la reacción de detección, es decir, desprenderlas del soporte y, dado el caso, también romperlas. Las medidas y los reactivos necesarios para ello también son conocidos para el experto.

La invención proporciona asimismo kits para el uso en los ensayos de acuerdo con la invención que permiten, por ejemplo, determinar rápida y eficazmente si un ligando específico es capaz de unirse a un receptor nuclear determinado o a partes de éste.

Un primer kit de la invención para el uso en los procedimientos de ensayo para la determinación de la adecuación de una sustancia de ensayo como ligando para un segmento de receptor de un receptor nuclear, para la determinación de la presencia de un ligando para un segmento de receptor de un receptor nuclear en una muestra, para la determinación de la concentración de un ligando de este tipo, así como para la caracterización de compuestos como posibles agonistas o antagonistas respecto a las interacciones receptor nuclear/ligando, comprende en cada caso las células de acuerdo con la invención con las propiedades descritas anteriormente en detalle en relación con los procedimientos de ensayo. Así, por ejemplo, en el caso de preverse la detección de la actividad de un gen reportero, las células del kit contienen adicionalmente un constructo con un sitio de unión para el factor de transcripción que es activado específicamente por la ruta de señalización ras cuya activación debe detectarse mediante los ensayos, un promotor mínimo y el gen reportero. De forma alternativa, este kit, al igual que todos los siguientes, puede comprender un vector de transformación o de transfección que contiene el constructo. De este modo, el usuario del kit, en caso de elegir esta vía de detección, puede dotar las células de ensayo contenidas en el kit de este constructo por transformación o transfección. En otra forma de realización de este y todos los demás kits, el vector de transformación o de transfección facilitado por separado en el kit contiene únicamente el sitio de unión para el factor de transcripción y el promotor mínimo en unión funcional con éste, así como un sitio de inserción previsto adecuadamente para la inserción de un gen reportero que el usuario puede elegir libremente.

ES 2 322 726 T3

Este kit, al igual que todos los siguientes, también puede contener, dado el caso, un tampón de ensayo, reactivos para la detección de la activación fenotípica de la ruta de transducción de señales posterior a una proteína Ras en estas células y/o unas instrucciones de uso, entre otras cosas.

Un kit alternativo para los procedimientos de ensayo antes mencionados comprende los siguientes componentes:

- a) Células en las que al menos en determinadas condiciones no se puede activar la ruta de señalización posterior a una proteína Ras,
- b) uno o varios vectores de transformación o de transfección que contienen al menos una secuencia de ADN que codifica una proteína de fusión como se ha definido anteriormente, comprendiendo la proteína de fusión un tercer dominio que es capaz de activar la ruta de señalización inactiva o inactivable posterior a una proteína Ras en las células,
- c) dado el caso reactivos para la transformación o transfección de las células con el vector de transformación o de transfección,
- d) dado el caso reactivos para la detección de la activación fenotípica de la ruta de transducción de señales posterior a una proteína Ras en estas células.

Otro kit alternativo permite la preparación de la célula de ensayo con una proteína de fusión que contiene un segundo dominio según el deseo individual. Comprende los siguientes componentes:

- a) Células en las que al menos en determinadas condiciones no se puede activar una ruta de señalización posterior a una proteína Ras,
- b) un vector de transformación o de transfección que presenta en una disposición adecuada
 - una secuencia de ADN que codifica un primer dominio de una proteína de fusión como se ha definido anteriormente,
 - una secuencia de ADN que codifica un tercer dominio de una proteína de fusión como se ha definido anteriormente que es capaz de activar la ruta de señalización inactiva o inactivable posterior a una proteína Ras en las células y
 - un sitio de inserción dispuesto adecuadamente para la inserción funcional de una secuencia de ADN que codifica un segundo dominio como se ha definido anteriormente, comprendiendo el vector tras la inserción de una secuencia de ADN para el segundo dominio un gen completo para una proteína de fusión como se ha definido anteriormente,
- c) dado el caso reactivos para la transformación o transfección de las células con el vector de transformación o de transfección,
- d) dado el caso reactivos para la detección de la activación fenotípica de la ruta de transducción de señales posterior a una proteína Ras en estas células.

Para los dos ensayos mencionados en último lugar también es válido que en el caso de preverse la detección de la actividad de un gen reportero, las células contenidas en el kit adicionalmente puedan contener, entre otras cosas, un constructo que comprende un sitio de unión para un factor de transcripción cuya activación se produce como consecuencia de la activación de la ruta de señalización ras especial cuya activación ha de detectarse mediante el ensayo, un promotor mínimo y el gen reportero como se ha descrito anteriormente, o, alternativamente, pueda preverse, por separado de las células, un vector de transformación o de transfección con el constructo formado por el sitio de unión al factor de transcripción/promotor mínimo/gen reportero o con un constructo de otro tipo que comprende el sitio de unión al factor de transcripción y el promotor mínimo y, además, un sitio de inserción dispuesto adecuadamente para un gen reportero que puede elegirse libremente.

La invención también proporciona kits para los procedimientos de ensayo de acuerdo con la invención para determinar si un polipéptido o una proteína presenta una función de unión a ligando de un receptor nuclear. Un kit adecuado para esto comprende las células de acuerdo con la invención, en el que la proteína de fusión contenida en ellas comprende un segundo dominio que comprende un polipéptido o una proteína que se sospecha presenta una función de unión a ligando de un receptor nuclear.

Un kit alternativo comprende los siguientes componentes:

- a) Células en las que al menos en determinadas condiciones no se puede activar una ruta de señalización posterior a una proteína Ras,

b) uno o varios vectores de transformación o de transfección que comprenden al menos una secuencia de ADN que codifica una proteína de fusión como se ha definido anteriormente cuyo segundo dominio comprende un polipéptido o una proteína que se sospecha presenta una función de unión a ligando de un receptor nuclear y cuyo tercer dominio es capaz de activar la ruta de señalización inactiva o inactivable posterior a una proteína Ras,

c) dado el caso reactivos para la transformación o transfección de las células con el vector de transformación o de transfección,

d) dado el caso reactivos para la detección de la activación fenotípica de la ruta de transducción de señales posterior a una proteína Ras en estas células.

Un kit alternativo para el uso en el ensayo mencionado permite proporcionar selectivamente una célula de ensayo con una proteína de fusión que como segundo dominio comprende un polipéptido o una proteína deseado cuya función de unión a ligando se ha de analizar. Un kit de este tipo comprende

a) células en las que al menos en determinadas condiciones no se puede activar una ruta de señalización posterior a una proteína Ras,

b) un vector de transformación o de transfección que presenta en una disposición adecuada

-- una secuencia de ADN que codifica un primer dominio de una proteína de fusión como se ha definido anteriormente y

-- una secuencia de ADN que codifica un tercer dominio de una proteína de fusión como se ha definido anteriormente que es capaz de activar la ruta de señalización inactiva o inactivable posterior a una proteína Ras en las células y

-- un sitio de inserción dispuesto adecuadamente para la inserción funcional de una secuencia de ADN que codifica un segundo dominio que contiene un polipéptido o una proteína que se sospecha contiene una función de unión a ligando de un receptor nuclear,

comprendiendo el vector tras la inserción de una secuencia de ADN para el segundo dominio un gen completo para una proteína de fusión como se ha definido anteriormente, en la que el segundo dominio contiene un polipéptido o una proteína que se sospecha contiene una función de unión a ligando de un receptor nuclear,

c) dado el caso reactivos para la transformación o transfección de las células con el vector de transformación o de transfección,

d) dado el caso reactivos para la detección de la activación fenotípica de la ruta de transducción de señales posterior a una proteína Ras en estas células.

En una forma de realización, las células presentes en los kits antes mencionados contienen adicionalmente, en el caso de preverse la detección de la actividad de un gen reportero, un constructo que comprende un sitio de unión para un factor de transcripción cuya activación se produce como consecuencia de una activación de la ruta de señalización ras especial cuya activación debe detectarse mediante el ensayo, un promotor mínimo y el gen reportero como se ha explicado anteriormente, o, alternativamente, puede preverse por separado de las células un vector de transformación o de transfección con el constructo formado por el sitio de unión al factor de transcripción/promotor mínimo/gen reportero o con un constructo de otro tipo que comprende el sitio de unión al factor de transcripción y el promotor mínimo y, además, un sitio de inserción dispuesto adecuadamente para un gen reportero que se puede elegir libremente.

En una forma de realización preferida de la invención, los kits de acuerdo con la invención comprenden las células inmovilizadas sobre un soporte sólido como se ha descrito anteriormente, en particular sobre biochips. Para los cribados en masa resulta especialmente adecuada la inmovilización de las células en las depresiones individuales de placas de microvaloración, de manera que se pueden realizar múltiples procedimientos de ensayo separados en una placa de este tipo. Asimismo es posible prever diferentes células de acuerdo con la invención, es decir, especialmente células con diferentes segundos dominios, sobre una misma placa de microvaloración en las depresiones de determinados segmentos.

Si las células se encuentran en el kit inmovilizadas sobre un soporte sólido, puede resultar necesario o útil, especialmente en el caso de la detección de la actividad de un gen reportero o de una proteína reportera, solubilizar las células antes de la reacción de detección, es decir, desprenderlas del soporte y, dado el caso, romperlas. En este caso, los reactivos mencionados en el punto d) para la detección de la activación fenotípica de la ruta de transducción de señales ras también pueden comprender reactivos de solubilización adecuados que contienen, en especial, uno o varios agentes humectores o tensioactivos.

La invención abarca además

- ligandos para un segmento de unión de un receptor
- compuestos que son capaces de modificar la actividad de unión de un segmento de unión a ligando de un receptor frente a un ligando (denominados en lo sucesivo “compuestos de modificación”), así como
- polipéptidos o proteínas que presentan una función de unión a ligando de un receptor, que se han determinado o hallado mediante uno de los procedimientos de ensayo de la invención, así como composiciones que contienen estos ligandos, compuestos y/o polipéptidos o proteínas.

Respecto a los polipéptidos o proteínas que presentan una función de unión a ligando de un receptor y que se han derivado de una molécula de origen natural o sintético para la generación de la proteína de fusión como se define en la reivindicación 1, la invención comprende tanto el fragmento con función de unión a ligando contenido en las proteínas de fusión usadas de acuerdo con la invención como la molécula o el fragmento de partida. Con el único fin de aclaración cabe señalar a este respecto que la generación de la proteína de fusión generalmente se realiza por expresión de una secuencia de ácido nucleico que codifica esta proteína de fusión en una célula. Por consiguiente, la derivación de un polipéptido o proteína con una función de unión a ligando de un receptor de una molécula de partida más grande generalmente se produce de forma análoga a nivel de ácido nucleico, aprovechando para la expresión de la proteína de fusión únicamente uno o varios segmentos de la secuencia de ácido nucleico que codifica la molécula de partida y realizando, dado el caso, una clonación siguiente para añadir segmentos que codifican componentes o segmentos adicionales de la proteína de fusión. En el marco de la derivación también se pueden efectuar una o varias modificaciones pequeñas de la secuencia de ácido nucleico en la secuencia de partida o en el o los segmento(s) de ácido nucleico, preferentemente de forma que la molécula de ácido nucleico resultante todavía hibride en condiciones restrictivas con la correspondiente molécula de ácido nucleico de partida.

Por lo tanto, la invención también comprende un procedimiento para la identificación de polipéptidos o proteínas, especialmente de receptores, que presentan una función de unión a ligando de un receptor, que comprende:

- la preparación de una célula de acuerdo con la invención con una proteína de fusión que presenta las características descritas en la reivindicación 1 y que comprende este polipéptido o proteína en su totalidad o una parte de este polipéptido o proteína que supuestamente contiene los segmentos de secuencia esenciales para la función de unión a ligando, y
- la realización del procedimiento de ensayo *in vivo* de acuerdo con la invención mediante esta célula para detectar si un polipéptido o una proteína presenta una función de unión a ligando de un receptor nuclear, así como las moléculas identificadas mediante este procedimiento.

La invención abarca igualmente

- el uso de los ligandos, compuestos de modificación y polipéptidos o proteínas antes mencionados, identificados mediante los procedimientos de ensayo de acuerdo con la invención, como medicamentos, dado el caso tras formularlos con coadyuvantes y/o vehículos habituales en este campo, así como
- el uso de los ligandos, compuestos de modificación y polipéptidos o proteínas como sustancias de referencia para el desarrollo de ligandos, compuestos de modificación y polipéptidos o proteínas derivados de ellos, especialmente por derivatización, en particular de aquéllos que presentan una actividad equivalente o mejorada respecto a la sustancia de referencia correspondiente.

Por lo tanto, la invención comprende también un procedimiento para la preparación de ligandos, compuestos de modificación, polipéptidos o proteínas mediante una derivatización única o múltiple, partiendo de los ligandos, compuestos de modificación, polipéptidos o proteínas identificados mediante los procedimientos de ensayo de acuerdo con la invención. Dado el caso, este procedimiento puede comprender adicionalmente los pasos

- ensayar también los ligandos, compuestos de modificación, polipéptidos o proteínas obtenidos por derivatización respecto a la función de ligando o la función de unión a ligando mediante los procedimientos de ensayo de acuerdo con la invención, y/o
- formular los ligandos, compuestos de modificación, polipéptidos o proteínas obtenidos por derivatización de manera habitual como medicamentos.

La invención abraza asimismo los ligandos, compuestos de modificación, polipéptidos o proteínas obtenidos mediante este procedimiento, es decir, los derivados funcionales obtenidos mediante este procedimiento.

Para el uso como agentes para la terapia génica que deben provocar, en especial en células humanas o animales, la expresión de un polipéptido o de una proteína que presenta una función de unión a ligando de un receptor, en particular de un receptor nuclear, la invención comprende asimismo moléculas de ácido nucleico que se obtienen a partir de un polipéptido o una proteína, en especial de un receptor, identificado mediante los procedimientos de

ensayo, de identificación, de cribado o de preparación de acuerdo con la invención, mediante un procedimiento que comprende proporcionar el gen que codifica el polipéptido o la proteína, o una parte de éste que comprende al menos los segmentos de secuencia de ácido nucleico esenciales para la actividad del polipéptido o proteína codificado, en forma esencialmente pura, es decir, en particular esencialmente exenta de otros ácidos nucleicos innecesarios o incluso

- 5 perjudiciales para el uso como agente para la terapia génica. Este procedimiento puede requerir, en caso de desconocerse, la identificación previa del gen que codifica este polipéptido o proteína. En particular, el procedimiento puede comprender adicionalmente los siguientes pasos:
 - 10 - determinar, en caso de desconocerse, la secuencia de aminoácidos del polipéptido o de la proteína, especialmente del receptor, y/o
 - identificar, en caso de desconocerse, el gen que codifica este polipéptido o proteína y determinar al menos la secuencia de los segmentos codificantes de este gen,
 - 15 - efectuar, dado el caso, modificaciones en la secuencia de ácido nucleico obtenida, por ejemplo para adaptar el uso de codones al del organismo receptor deseado, introducir mutaciones o eliminar secuencias intrónicas, y
 - 20 - formular la secuencia de ácido nucleico, dado el caso modificada, en forma de un agente para la terapia génica.

En un sistema experimental de la invención usado actualmente con preferencia, una proteína Ras mutada (Ha-Ras (61L)) que forma parte de la proteína de fusión codificada por la secuencia de ácido nucleico carece de la secuencia de farnesilación, que es responsable de la localización de la proteína en la membrana. Como sistema celular que es

- 25 inactivo en una ruta de transducción de señales ras o similar a ras se usa la cepa de levadura cdc25-2. Como se ha explicado, la proteína Ras no es funcional en estas células a una temperatura restrictiva de 33 a 37°C, típicamente de 36°C, como consecuencia de la ausencia de un factor de intercambio de nucleótidos de guanina funcional (GEF; “guanyl nucleotide exchange factor”). La expresión de una proteína Ras funcional asociada a la membrana en fusión con un receptor nuclear y/o con partes de éste se puede detectar porque las células de levadura pueden crecer a las
- 30 temperaturas restrictivas mencionadas independientemente de la presencia de una proteína GEF funcional siempre que esté presente un ligando apropiado para el receptor nuclear expresado.

Para explicar con más detalle la invención sigue ahora la descripción de un ejemplo.

35 *Material y métodos*

Como vector básico sirve un vector con un gen marcador (Ura) y un promotor inducible por galactosa (GALI) para el gen de fusión que se ha de expresar. Como se muestra esquemáticamente en la fig. 2, la secuencia de ADN que se ha de expresar codifica:

- 40 1. una señal de miristilación,
2. el dominio de unión a ligando del receptor de estrógenos humano (aminoácidos 282 a 595),
- 45 3. la Ha-Ras humana (L61), que es activa de forma constitutiva y carece de la denominada caja CAAX, la señal de farnesilación para la localización en la membrana.

Crecimiento y manipulación de la levadura

Se usaron protocolos de transformación y manipulación de levadura convencionales (véase, por ejemplo, Hill y col. (1991), NAR 19, 5791). Las células se sembraron en placas con un medio mínimo de glucosa que contiene los aminoácidos y nucleótidos necesarios (20 mg/l de histidina, 100 mg/l de leucina, 20 mg/l de triptófano, 20 mg/l de uracilo, 10 mg/l de sulfato de adenina, 2% de glucosa, 0,5% de NH₄SO₄, 0,17% de extracto de levadura y 4% de agar, o con un medio de galactosa (1,7 g/l de nitrógeno asimilable por levaduras sin aminoácidos, 5 g/l de sulfato de amonio, 30 g/l de galactosa (> 99%), 20 g/l de D-rafinosa, 20 g/l de glicerina (100%), 30 g/l de agar bacteriológico).

Como control se sembraron clones en placas con medio YPD (1% de extracto de levadura, 2% de bactotripton y 2% de glucosa). El medio YPD no contiene galactosa, de modo que no debería producirse la expresión de la proteína de fusión. Como era de esperar, los clones transformados con éxito no mostraban proliferación celular en cultivo sobre este medio cuando se añadía el ligando estrógeno.

Se realizaron réplicas en placa con un plaqueador de réplicas de terciopelo. Después de la transformación con el vector de ácido nucleico antes descrito, las células se sembraron en placas con glucosa y se incubaron entre tres y cuatro días a una temperatura no restrictiva de 25°C. A continuación se inocularon diferentes medios líquidos (con y sin estrógeno) con 3 clones independientes, respectivamente, se incubaron entre 12 y 16 h a 37°C y a continuación se detectó el crecimiento de las levaduras en los diferentes medios líquidos por medición fotométrica de la densidad óptica a 600 nm. La tabla siguiente muestra un resumen de los medios seleccionados y los resultados obtenidos.

TABLA 1

Detección del crecimiento de las células de levadura cdc25-2 en función de diferentes concentraciones de estrógeno en el medio

	Medio Glu - E	Medio Glu + E (10 ⁻⁵ M)	Medio Gal - E	Medio Gal + E (10 ⁻⁶ M)	Medio Gal + E (10 ⁻⁷ M)	Medio Gal + E (10 ⁻⁸ M)	Medio Gal + E (10 ⁻⁹ M)	Medio Gal + E (10 ⁻¹⁰ M)
25 ^º C	+	+	+	+	+	+	+	+
37 ^º C	-	-	-	+	+	+	+/-	-

Medio Glu: medio con glucosa

Medio Gal: medio con galactosa

E: estrógeno

-: ausencia de crecimiento de las levaduras

+: crecimiento de las levaduras

+/-: crecimiento débil de las levaduras

Bibliografía

Bargmann, *Cell*, 90:585-587, 1997;

Current Protocols in Molecular Biology, 1991;

Evans, *Science*, 240:889-895, 1988;

Hill, *NAR*, 19:5791, 1991;

Kastner y col., *Cell*, 83:859-869, 1995;

Pratt, *Endocr. Rev.*, 18:306-360, 1997;

Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989), *Molecular Cloning. A Laboratory Handbook*, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York;

Schlessinger, *TIBS*, 18: 273-275, 1993;

Seed, *Nature Medicine*, 4:1004-1005, 1998.

REIVINDICACIONES

1. Proteína de fusión que comprende al menos tres dominios, en la que

- un primer dominio media la localización de la proteína de fusión en la membrana en un contexto celular y presenta o deriva de una secuencia de aminoácidos de una señal de localización en la membrana o de un dominio transmembrana,
- un segundo dominio presenta, o supuestamente presenta, una función de unión a ligando de un receptor nuclear y comprende o deriva de una secuencia de aminoácidos del segmento de receptor de un receptor de esteroides, un receptor huérfano, un receptor de vitaminas, un receptor de tiroxina, un receptor de dioxina o un receptor de ácido retinoico,
- un tercer dominio presenta una actividad capaz de activar una ruta de señalización posterior a una proteína Ras en una célula y comprende una secuencia de aminoácidos que deriva de la secuencia de aminoácidos de una proteína Ras presente en la naturaleza o de un factor de intercambio de nucleótidos de guanina presente en la naturaleza,

caracterizada porque en ausencia de unión de ligando al segundo dominio de la proteína de fusión, el tercer dominio no puede desarrollar, pese a su localización en la membrana, su actividad de activación de una ruta de señalización posterior a una proteína Ras en la célula, pero en el caso de unión de ligando al segundo dominio, se produce un cambio conformacional con efectos sobre el tercer dominio de manera que el tercer dominio puede desarrollar su actividad de activación de una ruta de señalización posterior a una proteína Ras en la célula.

2. Proteína de fusión según la reivindicación 1, **caracterizada** porque el primer dominio presenta o deriva de la secuencia de aminoácidos de una señal de farnesilación, una señal de miristilación o una señal de prenilación.

3. Molécula de ADN que codifica la proteína de fusión según la reivindicación 1 ó 2.

4. Vector, en especial plásmido, cósmido, genoma de virus o de fago, que comprende al menos una molécula de ADN según la reivindicación 3.

5. Célula eucariótica unicelular que comprende una proteína de fusión según la reivindicación 1 ó 2, **caracterizada** porque cuando se une un ligando al segundo dominio de la proteína de fusión, el tercer dominio no puede desarrollar, pese a su localización en la membrana, su actividad de activación de una ruta de señalización posterior a una proteína Ras en la célula, pero cuando el ligando se disocia del segundo dominio, se produce un cambio conformacional con efectos sobre el tercer dominio de manera que el tercer dominio puede desarrollar su actividad de activación de una ruta de señalización posterior a una proteína Ras en la célula, y porque en ausencia de la proteína de fusión no se puede activar, al menos en determinadas condiciones, una ruta de señalización posterior a una proteína Ras en la célula.

6. Célula según la reivindicación 5, **caracterizada** porque la célula es una célula de levadura.

7. Célula según la reivindicación 6, **caracterizada** porque la célula es una célula de levadura sin pared celular.

8. Uso de una célula según la reivindicación 5 en un ensayo *in vivo* para detectar si un compuesto es capaz de modificar la actividad de unión de un segmento de receptor de un receptor nuclear frente a un ligando, **caracterizado** por los siguientes pasos:

- (a) Poner en contacto el ligando con las células según la reivindicación 5 en presencia del compuesto, en unas condiciones en las que el compuesto puede difundir hacia el interior de las células o es producido por las células y en las que, en ausencia de la proteína de fusión, no se puede activar una ruta de señalización posterior a una proteína Ras en las células,
- (b) analizar si y, dado el caso, en qué medida se ha efectuado una activación de la ruta de señalización posterior a una proteína Ras,
- (c) comparar el resultado del análisis del paso (b) con el resultado de análisis que se obtiene cuando el ensayo se realiza en ausencia del compuesto.

9. Uso según la reivindicación 8, en el que en el paso (a) se usan células en las que la ruta de señalización inactiva posterior a una proteína Ras es una ruta de señalización que actúa sobre el ciclo celular y cuya activación es esencial para la proliferación celular y el paso (b) comprende analizar si y, dado el caso, en qué medida las células son capaces de proliferar en las condiciones mencionadas, indicando el caso en el que la comparación en el paso (c) da como resultado un aumento de la proliferación celular en presencia del compuesto un efecto agonista para el compuesto e indicando el caso en el que la comparación en el paso (c) da como resultado una reducción de la proliferación celular un efecto antagonista del compuesto.

10. Uso de una célula según la reivindicación 5 en un ensayo *in vivo* para detectar si un polipéptido o una proteína presenta una función de unión a ligando de un receptor nuclear, **caracterizado** por los siguientes pasos:

- (a) Poner en contacto las células según la reivindicación 5 con el ligando en unas condiciones en las que, en ausencia de la proteína de fusión, no se pueda activar una ruta de señalización posterior a una proteína Ras en las células, comprendiendo la proteína de fusión contenida en las células un segundo dominio que comprende el polipéptido o la proteína que se ha de analizar y un tercer dominio que es capaz de activar la ruta de señalización inactiva posterior a una proteína Ras en las células cuando se une el ligando al segundo dominio,
- (b) analizar si se ha producido una activación de la ruta de señalización posterior a una proteína Ras, indicando la detección de una activación de la ruta de señalización posterior a una proteína Ras que el segundo dominio de la proteína de fusión y, por consiguiente, el polipéptido o la proteína que se ha de analizar presenta una función de unión a ligando de un receptor nuclear.

11. Kit para el uso en un ensayo o en un procedimiento de cribado según una de las reivindicaciones 8 a 10, **caracterizado** porque comprende

- (a) las células según la reivindicación 5, así como
- (b) dado el caso uno o varios vectores de transformación o de transfección que contienen al menos una secuencia de ADN que codifica una proteína de fusión según la reivindicación 1 ó 2,
- (c) dado el caso reactivos para la transformación o transfección de las células con el vector de transformación o de transfección,
- (d) dado el caso reactivos para la detección de la activación fenotípica de la ruta de transducción de señales posterior a una proteína Ras en estas células.

12. Kit para el uso en un ensayo según una de las reivindicaciones 8 a 10, **caracterizado** porque comprende los siguientes componentes:

- (a) las células según la reivindicación 5,
- (b) un vector de transformación o de transfección que presenta en una disposición adecuada
 - una secuencia de ADN que codifica un primer dominio de una proteína de fusión como se ha definido en la reivindicación 1 ó 2,
 - una secuencia de ADN que codifica un tercer dominio de una proteína de fusión como se ha definido en la reivindicación 1 ó 2 y
 - un sitio de inserción dispuesto adecuadamente para la inserción funcional de una secuencia de ADN que codifica un segundo dominio como se ha definido en la reivindicación 1 ó 2,

comprendiendo el vector tras la inserción de una secuencia de ADN para el segundo dominio un gen completo para una proteína de fusión según la reivindicación 1,

- (c) dado el caso reactivos para la transformación o transfección de las células con el vector de transformación o de transfección,
- (d) dado el caso reactivos para la detección de la activación fenotípica de la ruta de transducción de señales posterior a una proteína Ras en estas células.

13. Kit para el uso en un ensayo según la reivindicación 10, **caracterizado** porque comprende los siguientes componentes:

- (a) las células según la reivindicación 5,
- (b) un vector de transformación o de transfección que presenta en una disposición adecuada
 - una secuencia de ADN que codifica un primer dominio de una proteína de fusión tal y como se define en la reivindicación 1 ó 2, y
 - una secuencia de ADN que codifica un tercer dominio de una proteína de fusión como se ha definido en la reivindicación 1 ó 2 y

- un sitio de inserción dispuesto adecuadamente para la inserción funcional de una secuencia de ADN que codifica un segundo dominio la proteína de fusión según la reivindicación 1 ó 2,

caracterizado porque tras la inserción de una secuencia de ADN para el segundo dominio el vector comprende un gen completo para una proteína de fusión según la reivindicación 1 ó 2 que se sospecha presenta una función de unión a ligando de un receptor nuclear,

- (c) dado el caso reactivos para la transformación o transfección de las células con el vector de transformación o de transfección,

- d) dado el caso reactivos para la detección de la activación fenotípica de la ruta de transducción de señales posterior a una proteína Ras en estas células.

14. Kit según la reivindicación 13, que comprende adicionalmente:

un vector de transformación o de transfección con un constructo que comprende

- un sitio de unión para un factor de transcripción cuya activación se produce como consecuencia de la activación de una ruta de señalización ras especial cuya activación se ha de detectar mediante el ensayo,
- un promotor mínimo y
- un sitio de inserción dispuesto adecuadamente para una expresión regulada por el promotor mínimo para la inserción de un gen para una proteína reportera,
- activándose el promotor mínimo como consecuencia de la unión del factor de transcripción activado a su sitio de unión.

Fig. 1

Activación de la ruta de transducción de señales ras
o similar a ras en función de la interacción entre
el receptor nuclear y su ligando

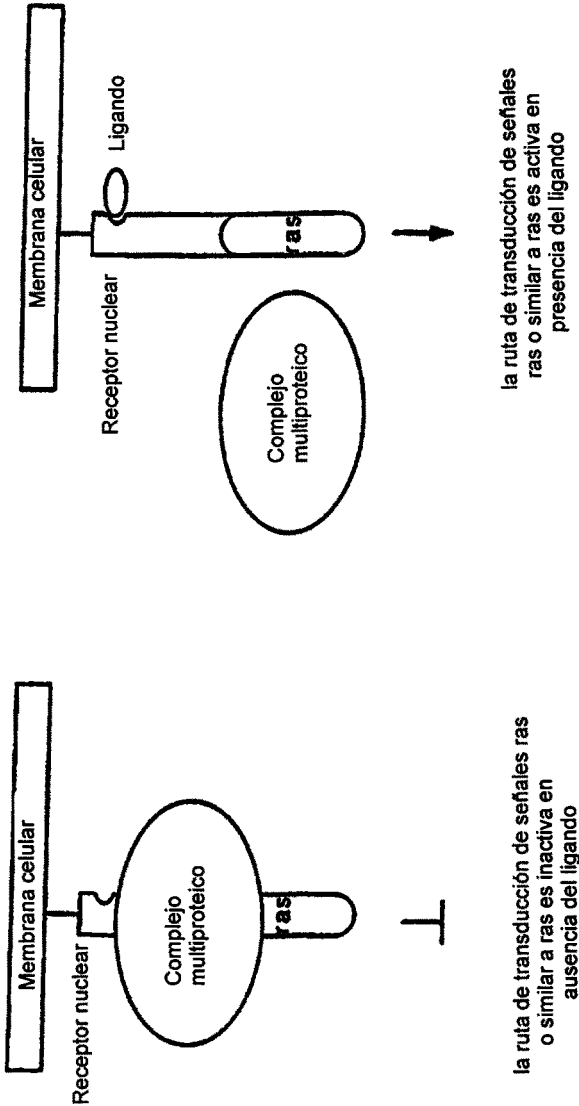


Fig. 2

**Representación esquemática de la estructura de la proteína de fusión
receptor de estrógenos/Ras localizada en la membrana**



M: Señal de miristilación

LBD: Dominio de unión a ligando del receptor de estrógenos

Ras: Ha-Ras humana (L61) sin

Fig. 3

Activación de la ruta de transducción de señales ras o similar a ras en función de la interacción entre el receptor nuclear y su ligando

