



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 318 908**

51 Int. Cl.:
G01N 33/566 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
C12Q 1/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **99965576 .4**
96 Fecha de presentación : **29.12.1999**
97 Número de publicación de la solicitud: **1141716**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **10.10.2001**

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

30 Prioridad: **30.12.1998 DE 198 60 833**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.05.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.05.2009

73 Titular/es: **Hansjörg Forster**
Bergackerweg 6
79856 Hinterzarten, 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 y ligandos.

La solicitud se refiere al campo de la biología molecular. Trata, especialmente, procedimientos de ensayo que sirven para detectar interacciones específicas entre un ligando extracelular y un receptor, en especial, de membrana, y se dirige, entre otras cosas, a descubrir nuevos ligandos funcionales para receptores, así como a demostrar, dado el caso, una función de unión a ligando característica, en particular, de receptores de membrana en polipéptidos o proteínas que se sospecha presentan tal función. En este contexto, la solicitud se refiere a receptores de membrana heterólogos, en particular a proteínas de fusión, a ácidos nucleicos que codifican estos receptores de membrana, especialmente estas proteínas de fusión, a vectores que contienen estos ácidos nucleicos, a células de levadura transformadas que contienen estos receptores de membrana, en especial estas proteínas de fusión, así como a kits que pueden usarse todos ellos para los procedimientos de ensayo de acuerdo con la invención o en relación con éstos. En el caso de las células mencionadas en lo sucesivo que se usan o aprovechan para los ensayos de esta solicitud se trata exclusivamente de células de levadura. Todos los receptores de membrana y proteínas de fusión mencionados son heterólogos.

Las células, sobre todo las células de organismos pluricelulares, necesitan reaccionar adecuadamente frente a señales extracelulares procedentes de su entorno. Las células a las que se dirigen las señales usan proteínas receptoras asociadas a la membrana para la captación específica de las señales. La unión de moléculas de ligando extracelulares a los segmentos extracelulares del receptor (segmento de unión a ligando) produce una transmisión de señales mediada por conformación a través de la región transmembrana del receptor hacia el segmento citoplasmático del receptor en el interior celular (segmento mediador). En el lado citoplasmático del receptor, el cambio molecular dependiente de la unión de ligando puede ser reconocido por moléculas adaptadoras que lo transmiten a rutas de transducción de señales intracelulares (figura 1). Los efectos de la transducción de señales mediada por receptor son cambios rápidos en las estructuras citoplasmáticas y procesos de modificación de la actividad génica y de proliferación o de degradación de material genético en el núcleo celular.

Así pues, los receptores de membrana median su transmisión intracelular de señales a través del segmento mediador citoplasmático del receptor. Dependiendo de la naturaleza de este segmento mediador, los receptores de membrana se dividen en aquéllos en los que la transmisión de señales del mediador se efectúa a través de una reacción enzimática de la proteína quinasa (inglés: *enzyme-coupled receptors*, receptores acoplados a enzimas) o en los que ésta se realiza a través de las denominadas proteínas G (inglés: *G-protein-coupled receptors*, receptores acoplados a proteínas G).

Entre los receptores acoplados a enzimas se encuentran aquéllos en los que el segmento mediador activo enzimáticamente se localiza directamente en la misma molécula proteica del receptor que también lleva el segmento de unión a ligando. Un ejemplo clásico de este tipo de receptores es el receptor del factor de crecimiento epidérmico ("epidermal growth factor"; EGF) (Schlessinger y Ulrich, 1992). En los demás receptores acoplados a enzimas el segmento proteico activo enzimáticamente se encuentra en una segunda subunidad proteica. Ejemplos clásicos de este tipo son muchos receptores de citocinas (Stahl y Yancopoulos, 1993). Todos tienen en común que la actividad proteína quinasa del segmento mediador del receptor depende estrictamente de la unión del ligando al dominio de unión a ligando del receptor. Muchos de los receptores acoplados a enzimas transmiten su señal a través de proteínas y polipéptidos adaptadores a miembros de la familia Ras de GTPasas monoméricas, que entre otras cosas pueden activar una cascada de fosforilación de serina/treonina (Nishida y Gotoh, 1993).

En los receptores acoplados a proteínas G, la configuración citoplasmática del receptor es reconocida en función de la unión de ligando por un complejo de proteína G que consta de tres subunidades y que transmite la señal por disociación en una parte $\beta\gamma$ activada unida a la membrana y una subunidad proteica $G\alpha$ activada. La subunidad proteica $G\alpha$ sustituye su cofactor GDP, característico del estado inactivo, por el cofactor GTP, característico del estado activado, que tras la hidrólisis de GTP a GDP vuelve a inactivar la subunidad proteica $G\alpha$. A través de la subunidad $\beta\gamma$ activada y/o la subunidad α activada del complejo de proteína G como mediadores están acopladas a este ciclo las más diversas rutas de transducción de señales. Entre los receptores acoplados a proteínas G se encuentra la gran familia de los receptores de 7 segmentos transmembrana. Éstos comprenden, por ejemplo, los receptores de toxinas, los receptores olfativos, los receptores de neurotransmisores y muchos cientos más (Dohlman y col., 1991; Leurs y col., 1998). Las proteínas adaptadoras para los mediadores de proteína G son, por ejemplo, adenilato ciclasas, la fosfolipasa C y otras quinasas receptoras acopladas a proteínas G, así como determinados canales iónicos.

En el estado de la técnica se conocen proteínas de fusión que se componen de un segmento efector y una proteína adaptadora y que pueden activar rutas de transducción de señales mediadas por receptores de membrana en una célula. Así, Cheng y col. (Cell (1998), 95, 793-803) describen, en el marco de estudios sobre la función biológica de los adaptadores SH2/SH3 en el desarrollo embrionario y/o en la generación de tumores malignos, una proteína de fusión expresada en células troncales embrionarias de ratón que se compone de un segmento efector, en este caso la proteína Sos1 que actúa de activador de Ras, así como del dominio SH2 de Grb2, que actúa de proteína adaptadora.

Asimismo, Aronheim y col. (Cell (1994), 78, 949-961) dan a conocer, en el marco de estudios sobre la activación de la ruta de transducción de señales Ras mediante el factor de intercambio de nucleótidos Sos, proteínas de fusión formadas por un segmento efector Sos y una proteína adaptadora que se expresan en células HeLa usando vectores adecuados. Como proteína adaptadora se usa la señal de miristilación de v-Src o la señal de farnesilación y de palmitilación de c-Ha-Ras.

Las transducciones de señales mediadas por receptores de membrana regulan los procesos intracelulares cruciales para la supervivencia de las células, el crecimiento y la división celular, la diferenciación celular y la muerte celular (apoptosis). Defectos provocados por mutaciones en estas importantes vías de control contribuyen con frecuencia a la patogénesis y, en particular, a la carcinogénesis. Es comprensible que la interacción ligando/receptor suscite un gran interés científico, farmacéutico y comercial, ya que constituye el punto de conexión principal entre el entorno extracelular y los acontecimientos intracelulares en todas las células vivas. Con la ayuda de las moléculas de ligando se puede intervenir en o, en caso de desarrollos anormales, contrarrestar desde el exterior de forma natural casi todos los procesos intracelulares importantes. El efecto de muchos fármacos se basa en su función de ser agonistas o antagonistas de ligandos presentes en la naturaleza. Resulta comprensible que exista un gran interés por poder detectar y estudiar estas interacciones receptor/ligando a nivel molecular.

Existe ya una serie de procedimientos para la detección de la interacción entre receptores de membrana y ligandos. Uno de los procedimientos aprovecha el hecho de que muchos receptores, por su parentesco evolutivo, presentan una estructura muy similar y que las partes proteicas funcionales, los denominados dominios, son fáciles de intercambiar entre sí y/o se pueden fusionar entre sí en una composición nueva. De este modo se pueden enlazar los más diversos dominios extracelulares de unión a ligando con dominios reporteros citosólicos específicos para crear en las células ciertas normalizaciones en el sistema de detección (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos 4859609). El inconveniente de este procedimiento reside en la necesidad de construir proteínas de fusión receptoras recombinantes funcionales que en las células reaccionen selectivamente frente a la interacción receptor/ligando que se ha de analizar.

Otra estrategia para estudiar las interacciones entre receptores de membrana y ligandos parte de receptores de tipo silvestre no modificados, pero aprovecha anticuerpos dirigidos contra los estados de configuración específicos del dominio citosólico del receptor para medir la interacción con el ligando.

Otra estrategia detecta la interacción receptor/ligando *ex vivo*, es decir, fuera de la célula viva, aplicando los dominios extracelulares del receptor o la molécula de ligando sobre una matriz que después se baña con una solución que contiene el ligando o el receptor, respectivamente. 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 es enorme. Otro problema reside en la extrapolación de los resultados obtenidos a las condiciones presentes en la membrana de las células vivas, pues las condiciones celulares pueden divergir considerablemente de las condiciones *ex vivo*. Otro problema agravante reside también 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 solicitud consiste en proporcionar ensayos alternativos adecuados para detectar *in vivo* interacciones específicas entre un ligando y un receptor, en particular asociado a la membrana, 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, o también mediante formas fantasma sin pared celular de, en especial, levaduras. Además, gracias a la configuración del ensayo, existe siempre la posibilidad directa de acceder a la información genética en la que está basada una variante de receptor.

Otros objetivos de la solicitud consisten en proporcionar células de levadura transformadas, kits, receptores de membrana heterólogos, en especial proteínas de fusión, ácidos nucleicos y vectores que se puedan usar todos ellos para los procedimientos de ensayo y en relación con éstos.

La presente publicación se basa en los siguientes conocimientos:

1. En todo receptor de membrana la unión del ligando al dominio extracelular provoca un cambio en el estado de configuración y/o una modificación covalente en la región citosólica.

2. Para cada receptor de membrana existen proteínas adaptadoras citosólicas próximas a la membrana o asociadas a la membrana que pueden reconocer los cambios de configuración específicos de ligando o que se activan como consecuencia de ellos.

3. Para la activación de diferentes rutas de transducción de señales ras y similares a ras es necesaria la localización de determinados componentes de las rutas de señalización en la membrana (Schlessinger, TIBS, 18:273-275, 1993).

4.a) Si se prevé una proteína de la familia Ras o un factor de intercambio de nucleótidos de guanina ("guanine nucleotide exchange factor"; GEF) como proteína o polipéptido efector de tal manera que ésta o éste se pueda unir, como consecuencia de una unión de ligando al dominio extracelular de un receptor de membrana, a un componente de la membrana, por ejemplo al segmento intracelular (= segmento mediador) del receptor de membrana o a proteínas adaptadoras localizadas próximas a la membrana o asociadas a la membrana, para lo cual ésta o éste se prevé dado el caso en forma de proteína de fusión cuya parte proteica adicional, que también se puede denominar segmento adaptador, permite la unión a un componente de este tipo de la membrana, se logra en el caso de una unión de este tipo una localización de la proteína Ras o del GEF en la membrana, que es necesaria para la activación de una ruta de transducción de señales ras o similar a ras.

4.b) De forma alternativa se puede prever una proteína de la familia Ras o un factor de intercambio de nucleótidos de guanina ("guanine nucleotide exchange factor"; GEF) como proteína o polipéptido efector de tal manera que ésta o éste sólo se pueda unir a un componente de la membrana, por ejemplo al segmento intracelular (= segmento mediador) del receptor de membrana o a proteínas adaptadoras próximas a la membrana o asociadas a la membrana, en *ausencia* de una unión de ligando al dominio extracelular de un receptor de membrana, para lo cual ésta o éste se prevé dado el caso en forma de proteína de fusión cuya parte proteica adicional, que también se puede dominar segmento adaptador, permite la unión a un componente de este tipo de la membrana. Mediante una unión de este tipo, que en esta variante sólo es posible en *ausencia* de unión del ligando al dominio extracelular del receptor de membrana, se logra después la localización de la proteína Ras o del GEF en la membrana, que es necesaria para la activación de una ruta de transducción de señales ras o similar a ras.

5. La detección del resultado de esta interacción receptor de membrana/ligando puede efectuarse en células de levadura. En el estado de la técnica se conocen células en las que una ruta de transducción de señales ras o similar a ras se puede inactivar, al menos en determinadas condiciones, a nivel de la proteína Ras específica de ella o de un factor de intercambio de nucleótidos de guanina específico para la proteína Ras. Si en una célula de este tipo la proteína o el polipéptido efector descrito en el punto 4. es capaz de activar precisamente esta ruta de señalización inactivada, se obtiene una célula en la que la ruta de transducción de señales ras o similar a ras propia de la célula, inactiva al menos en determinadas condiciones, se puede activar mediante esta proteína Ras - en el caso de la variante 4.a), sin embargo, sólo en presencia de un ligando para el segmento extracelular de unión a ligando del receptor de membrana y en el caso de la variante 4.b) sólo en ausencia de un ligando para el segmento extracelular de unión a ligando del receptor de membrana.

De este modo se obtiene una célula en la que la o una determinada ruta de transducción de señales ras se puede activar sólo en función de la unión de ligando al segmento de unión a ligando de un receptor asociado a la membrana (variante 4.a)) o sólo en ausencia de unión de ligando al segmento de unión a ligando de un receptor asociado a la membrana (variante 4.b)). Esta célula permite establecer un procedimiento de ensayo *in vivo* que permite detectar interacciones entre un receptor de este tipo y un ligando específico para él mediante la detección de una activación, dado el caso producida, de la ruta de transducción de señales ras especial, dado el caso de forma indirecta a través de efectos específicos detectables en la célula, tales como crecimiento celular.

Por lo tanto, un primer objeto de esta publicación es una célula de levadura transformada que comprende un receptor de membrana heterólogo que comprende un segmento de unión a ligando, una señal de localización en la membrana y un segmento mediador, en la que sólo en caso de unión o, alternativamente, sólo en ausencia de unión de un ligando al segmento de unión a ligando se produce un cambio estructural con efectos sobre el segmento mediador de manera que a continuación se une una proteína o un polipéptido efector que es capaz de activar una ruta de señalización ras o similar a ras en la célula a un componente de la membrana, dado el caso a través de otras proteínas o polipéptidos adicionales (adaptadores), caracterizada porque la proteína o el polipéptido efector que es capaz de activar una ruta de señalización ras o similar a ras está presente en forma de una proteína de fusión heteróloga formada por un segmento efector y una proteína o polipéptido adaptador que permite la unión al componente de la membrana, dado el caso a través de otras proteínas o polipéptidos adicionales (adaptadores), comprendiendo el segmento efector de la proteína de fusión la secuencia de una proteína Ras activa de forma constitutiva.

El receptor de membrana puede ser un receptor presente en la naturaleza, como, por ejemplo, un receptor transmembrana, un receptor acoplado a enzimas, un receptor acoplado a proteínas G, un receptor con 7 dominios transmembrana o un receptor olfativo ("Odour Receptor" u "olfactorial Receptor"). El receptor de membrana puede estar presente de forma natural en la célula, o puede provenir de un sistema celular de otro tipo o también de un virus y haberse introducido en la célula por transformación o transfección.

De forma alternativa, el receptor de membrana también puede ser un receptor sintético no presente en la naturaleza. Este comprende preferentemente segmentos o dominios que a su vez están presentes en la naturaleza, como, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos del segmento de unión a ligando de un receptor transmembrana, un receptor acoplado a enzimas, un receptor acoplado a proteínas G, un receptor con 7 dominios transmembrana o un receptor olfativo ("Odour Receptor" u "Olfactorial Receptor"), pero también la de un receptor nuclear presente en la naturaleza, por ejemplo de un receptor de esteroides, un receptor huérfano, un receptor de vitaminas, por ejemplo el receptor de vitamina D, un receptor de tiroxina o un receptor de ácido retinoico, o la de un receptor vírico presente en la naturaleza, en especial un receptor de membrana, o secuencias derivadas de éstas por adición, sustitución, modificación, inserción o delección de aminoácidos, pero también puede comprender, por ejemplo, segmentos generados por modelado molecular. Un receptor de membrana de este tipo puede comprender, por ejemplo, un segmento de unión a ligando y una señal de localización en la membrana que provienen ambos de una proteína determinada de un organismo determinado y un segmento mediador que proviene de una proteína y, dado el caso, también de un organismo diferente. En particular, el segmento de unión a ligando y el segmento mediador provienen de proteínas y, dado el caso, también de organismos diferentes; también la señal de localización en la membrana puede provenir, por consiguiente, de una proteína y/u organismo diferente o ser también de origen sintético. El segmento de unión a ligando puede comprender además un segmento de unión a ligando no presente en la naturaleza, por ejemplo generado sintéticamente por modelado molecular, con, en particular, una función de unión a ligando en principio sólo sospechada.

En formas de realización preferidas de esta solicitud, la señal de localización en la membrana del receptor de membrana comprende la secuencia de aminoácidos de un dominio transmembrana como el que se encuentra especialmente

en receptores transmembrana, 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 zona del dominio de localización en la membrana o como segmento de secuencia adicional, dispuesto en especial en el extremo N-terminal, se puede prever asimismo una secuencia señal que si bien no sirve en sí para anclar el receptor de membrana a la membrana, sí aumenta la eficacia con la que el receptor de membrana es transportado hacia la membrana celular tras su expresión. En consecuencia, la mayor concentración resultante de receptor de membrana en la proximidad directa de la membrana conduce, gracias al dominio de localización en la membrana, a una mayor tasa de incorporación del receptor de membrana 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 el receptor de membrana, 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 GPCRs propios de levaduras o de la invertasa (SUC2) propia de levaduras para el uso preferido en receptores de membrana que han de expresarse en células de levadura.

Por consiguiente, dependiendo del tipo celular deseado, también puede resultar útil sustituir una secuencia señal propia del receptor por una secuencia señal más eficaz en el tipo celular deseado; por ejemplo, en el caso de trabajar en particular con células de levadura se puede sustituir una secuencia señal propia del receptor en el extremo N-terminal de una proteína receptora de membrana por la secuencia señal de uno de los receptores acoplados a proteínas G (GPCR) propios de levaduras o por una secuencia señal similar que se encargue de anclar la forma activa del receptor a la membrana celular. En el caso de las tirosina quinasas receptoras (RTK) o las fosfatasa receptoras cabe mencionar a modo de ejemplo, especialmente para el trabajo con levaduras, la sustitución de la secuencia señal propia del receptor, siempre que esté presente, por la secuencia señal de la invertasa propia de levaduras (SUC2) o por otra secuencia señal que optimice el anclaje de la forma activa del receptor a la membrana celular.

Como ya se ha señalado, la proteína o polipéptido efector que es capaz de activar una ruta de señalización ras o similar a ras es un factor de intercambio de nucleótidos de guanina (GEF), por ejemplo la proteína CDC25 de *Saccharomyces cerevisiae* o una proteína SOS de un mamífero o una proteína similar a SOS de cualquier otro organismo, o una proteína activa de la familia Ras, deriva de factores o proteínas de este tipo o presenta una función de este tipo en un segmento de éstos.

En una forma de realización especial, que se explicará con más detalle a continuación, la proteína o polipéptido efector que es capaz de activar una ruta de señalización ras o similar a ras se encuentra en forma de una proteína de fusión formada por un segmento efector y una proteína o polipéptido adaptador que permite la unión a un componente de la membrana en el caso de unión de ligando al segmento de unión a ligando del receptor de membrana o, alternativamente, sólo en el caso de *ausencia* de unión de ligando al segmento de unión a ligando del receptor de membrana, dado el caso a través de otras proteínas o polipéptidos adicionales.

En otra forma de realización especial, la proteína de fusión requiere una modificación enzimática antes de poderse unir al componente de la membrana, dado el caso a través de otras proteínas o polipéptidos adicionales. En este caso, la actividad enzimática necesaria para la modificación enzimática sólo se activa en el sistema celular de acuerdo con la invención cuando se une un ligando al segmento de unión a ligando o, alternativamente, sólo en *ausencia* de unión de ligando al segmento de unión a ligando.

En todos los casos se produce en las células de levadura, como consecuencia de la unión de ligando al segmento de unión a ligando del receptor de membrana o, alternativamente, como consecuencia de la *ausencia* de unión de ligando al segmento de unión a ligando del receptor de membrana, una translocación de la proteína o polipéptido efector a la membrana celular que permite la activación de la ruta de señalización ras o similar a ras. La translocación se produce por la unión de la proteína o polipéptido efector a un componente de la membrana y, en una forma preferida de las formas de realización posibles, al segmento mediador del receptor de membrana, dado el caso a través de otras proteínas o polipéptidos adicionales. La unión de la proteína o polipéptido efector al componente de la membrana es posible sólo cuando se une un ligando al segmento de unión a ligando de este receptor de membrana o, alternativamente, sólo en *ausencia* de unión de un ligando al segmento de unión a ligando de este receptor de membrana, puesto que de esta forma se produce un cambio estructural, en especial un cambio conformacional, con efectos sobre el segmento mediador de manera que a continuación la proteína o polipéptido efector se une, dado el caso a través de otras proteínas o polipéptidos adicionales, al componente de la membrana y, en una forma de realización preferida, precisamente a este segmento mediador.

Esta unión de la proteína o polipéptido efector a un componente de la membrana, dado el caso a través de otras proteínas o polipéptidos adicionales, puede realizarse de varias maneras dependiendo del receptor de membrana correspondiente y, en particular, del segmento mediador correspondiente del receptor de membrana:

1) En una primera variante, el segmento mediador corresponde a la región citoplasmática de un receptor acoplado a proteínas G. De forma alternativa comprende segmentos de estos receptores esenciales para las propiedades, descritas a continuación, de esta región de los receptores acoplados a proteínas G, o también secuencias derivadas de las regiones o segmentos mencionados, por ejemplo por adición, sustitución, delección, inserción y/o modificación de aminoácidos, que, sin embargo, todavía presentan las propiedades a explicar de las secuencias de partida.

El receptor de membrana que comprende el segmento mediador mencionado puede ser, por ejemplo, un receptor con 7 dominios transmembrana presente en la naturaleza. Estos receptores comprenden, por ejemplo, los receptores de toxinas, los receptores olfativos, los receptores de neurotransmisores y muchos más (Dohlman y col., 1991, Leurs y col., 1998).

El receptor de membrana puede ser asimismo un receptor sintético con, por ejemplo, la región citoplasmática de un determinado receptor acoplado a proteína G como segmento mediador y el dominio de unión a ligando de otro receptor acoplado a proteína G o también de un receptor de otro tipo. En una forma de realización especial de la solicitud, el segmento de unión a ligando provoca en los receptores sintéticos de este tipo, en caso de unión de ligando, el cambio estructural, en especial el cambio conformacional, que en este caso se produce de forma natural en los receptores acoplados a proteínas G, con efectos sobre el segmento mediador, la región citoplasmática del receptor. De forma alternativa, también son imaginables en caso de unión de ligando otros tipos de cambios estructurales con efectos detectables de acuerdo con la invención sobre el segmento mediador del receptor.

Como ya se ha explicado, en los receptores acoplados a proteínas G la configuración citoplasmática del receptor es reconocida, en función de la unión de ligando, por un complejo de proteína G que consta de tres subunidades y que transmite la señal por disociación en una parte $\beta\gamma$ activada unida a la membrana y una subunidad proteica $G\alpha$ activada e igualmente unida a la membrana. La activación de la subunidad proteica $G\alpha$ conlleva una sustitución del cofactor GDP, característico del estado inactivo, por el cofactor GTP, característico del estado activado, que vuelve a inactivar la subunidad proteica $G\alpha$ después de la hidrólisis de GTP a GDP.

La transmisión de la señal procedente de la activación, es decir, disociación, o de la inactivación, es decir, reasociación, de la proteína G hacia los mediadores de proteína G y las diversas rutas de transducción de señales, que a su vez actúan sobre el metabolismo, es mediada por las denominadas proteínas adaptadoras. Las proteínas adaptadoras para los mediadores de proteína G son, por ejemplo, las adenilato ciclasas, la fosfolipasa C y otras quinasas receptoras acopladas a proteínas G, así como determinados canales iónicos. Algunas de ellas se unen especialmente a la parte $\beta\gamma$ activa de la proteína G, que sigue asociada con el segmento mediador y, por lo tanto, sigue asociada a la membrana, otras, en cambio, a la subunidad proteica $G\alpha$ activada disociada pero igualmente todavía unida a la membrana.

La translocación de una proteína o polipéptido efector a la membrana puede realizarse ahora

- por mediación de la parte $\beta\gamma$ de la proteína G activada y asociada a la membrana (variante (a)),

- por mediación de la subunidad proteica $G\alpha$ activada y disociada de la parte $\beta\gamma$ de la proteína G pero todavía unida a la membrana (variante (b)) o

- a través del segmento mediador del receptor de membrana en su estructura especial presente después de la unión de un ligando al segmento de unión a ligando del receptor de membrana o, alternativamente, en *ausencia* de unión de un ligando al segmento de unión a ligando del receptor de membrana (variante (c)).

Variantes (a) y (b)

La translocación de una proteína o polipéptido efector a la membrana por mediación de la parte $\beta\gamma$ de la proteína G activada y asociada a la membrana (variante (a)) o por mediación de la subunidad proteica $G\alpha$ activada y disociada de la parte $\beta\gamma$ de la proteína G pero todavía unida a la membrana (variante (b)) puede realizarse

- directamente (alternativa (i)) por “unión” a la parte $\beta\gamma$ activada y asociada a la membrana (variante (a)) o a la subunidad proteica $G\alpha$ de la proteína G activada, disociada y unida a la membrana (variante (b)),

- a través de una de las proteínas adaptadoras mencionadas (alternativa (ii)) que están asociadas con la parte $\beta\gamma$ de la proteína G activada y asociada a la membrana (variante (a)) o con la subunidad proteica $G\alpha$ de la proteína G activada, disociada y unida a la membrana (variante (b)) o

- a través de una “unión” a una molécula asociada a la membrana que por mediación de la parte $\beta\gamma$ activada (variante (a)) o de la subunidad proteica $G\alpha$ activada (variante (b)) de la proteína G está presente en un estado modificado especial (alternativa (iii)).

Para la alternativa (i) la proteína o polipéptido efector se prevé en la célula, por ejemplo, en forma de una proteína de fusión formada por un segmento efector que puede provocar la activación de la ruta de señalización ras o similar a ras y una proteína adaptadora, en especial una quinasa o una fosfolipasa C, por ejemplo una quinasa GRK2 o GRK3 (GRK = “G-protein coupled receptor kinase”, quinasa de receptores acoplados a proteínas G) o una fosfolipasa C de fosfatidilcolina, que interactúa con la parte $\beta\gamma$ de la proteína G tras la disociación de la subunidad α (variante (a)) o con la subunidad proteica $G\alpha$ activada después de la disociación de la parte $\beta\gamma$ de la proteína G (variante (b)).

Como alternativa para la alternativa (i), la proteína o polipéptido efector también se puede proporcionar en forma de una proteína de fusión formada por el segmento efector y un anticuerpo que reconoce específicamente la parte $\beta\gamma$ de la proteína G sólo después de la disociación de la subunidad α (variante (a)) o específicamente la subunidad proteica $G\alpha$ activada tras la disociación de la parte $\beta\gamma$ de la proteína G (variante (b)).

Para la alternativa (ii) la proteína o polipéptido efector se puede proporcionar, entre otras cosas, en forma de proteína de fusión cuyo segmento adaptador se une a una proteína adaptadora con, generalmente, una actividad enzimática como la que se ha indicado antes a modo de ejemplo especialmente para la interacción con proteínas G, pudiendo asociarse o interactuar la proteína adaptadora específicamente con la parte $\beta\gamma$ de la proteína G sólo después de la disociación de la subunidad α (variante (a)) o con la subunidad proteica $G\alpha$ activada sólo después de la disociación de la parte $\beta\gamma$ de la proteína G (variante (b)). El segmento adaptador de la proteína de fusión puede constituir, en especial, un anticuerpo o una proteína de unión que reconoce específicamente la proteína adaptadora y se une a ella.

En otro caso, también la proteína adaptadora presenta una propiedad de anticuerpo o de proteína de unión, reconociendo la proteína adaptadora específicamente la parte $\beta\gamma$ de la proteína G sólo después de la disociación de la subunidad α (variante (a)) o la subunidad proteica $G\alpha$ activada sólo después de la disociación de la parte $\beta\gamma$ de la proteína G (variante (b)). En esta constelación, el segmento adaptador de la proteína de fusión presenta generalmente la función de un denominado “segundo anticuerpo” o anti-anticuerpo que reconoce el denominado anticuerpo “primario” asociado con el segmento mediador.

Para la alternativa (iii) se aprovecha el hecho de que una proteína G en estado activado puede activar una fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K) que a su vez genera, como consecuencia de la activación, los compuestos denominados “segundos mensajeros” por fosforilación de la posición D-3 del anillo de inositol de fosfoinosítidos (por ejemplo PtdIns(3,4)P₂ (AKT) o PtdIns(3,4,5)P₃ (BTK)). Estos fosfoinosítidos están asociados a la membrana y, en su estado fosforilado, se unen a los denominados dominios homólogos a Src (2) (SH2) y homólogos a plectrina (PH). Por lo tanto, en una forma de realización especial para la alternativa (iii) se proporciona la proteína o polipéptido efector en forma de una proteína de fusión formada por el segmento efector que puede provocar la activación de la ruta de señalización ras o similar a ras y un dominio homólogo a Src (2) (SH2) o un dominio homólogo a plectrina (PH). Por lo tanto, la translocación de la proteína o polipéptido efector en forma del segmento efector sólo se efectúa cuando se produce una fosforilación de los fosfoinosítidos descritos especialmente como consecuencia de la activación de la proteína G, a continuación de lo cual los dominios (SH2) o (PH) de la proteína de fusión se asocian con estos fosfoinosítidos.

Variante c

Como se ha explicado, la translocación de la proteína o polipéptido efector a la membrana también se puede realizar alternativamente a través del segmento mediador del receptor de membrana en su estructura especial presente después de la unión de un ligando al segmento de unión a ligando o, alternativamente, en *ausencia* de unión de un ligando al segmento de unión a ligando del receptor de membrana, a saber

-- por “unión” directa al segmento mediador en su estructura especial presente después de la unión o sólo en *ausencia* de unión de un ligando al segmento de unión a ligando del receptor de membrana (alternativa (i)) o

-- a través de una o varias proteínas adaptadoras que están asociadas con el segmento mediador en su estructura especial presente después de la unión o sólo en *ausencia* de unión de un ligando al segmento de unión a ligando del receptor de membrana (alternativa (ii)).

Para la alternativa (i) la proteína o polipéptido efector se prevé en la célula, por ejemplo, en forma de una proteína de fusión formada por un segmento efector que puede provocar la activación de la ruta de señalización ras o similar a ras y una proteína adaptadora, en especial un anticuerpo o una proteína de unión con una especificidad correspondiente, que interactúa con el segmento mediador del receptor de membrana sólo en su estructura especial presente después de la unión de un ligando al segmento de unión a ligando del receptor de membrana o, alternativamente, sólo en *ausencia* de unión de un ligando al segmento de unión a ligando del receptor de membrana.

Para la alternativa (ii) de esta variante la proteína o polipéptido efector se puede proporcionar, en especial, en forma de una proteína de fusión cuyo segmento adaptador se une a una proteína adaptadora que puede asociarse o interactuar específicamente con el segmento mediador del receptor de membrana sólo en su estructura especial presente después de la unión de un ligando al segmento de unión a ligando del receptor de membrana o, alternativamente, sólo en *ausencia* de unión de un ligando al segmento de unión a ligando del receptor de membrana. El segmento adaptador de la proteína de fusión puede constituir en especial un anticuerpo o una proteína de unión que reconoce específicamente la proteína adaptadora y se une a ella. En el caso especial en el que también la proteína adaptadora presenta la propiedad de anticuerpo y la proteína adaptadora reconoce específicamente el segmento mediador del receptor de membrana sólo en su estructura especial presente después de la unión o sólo en *ausencia* de unión de un ligando al segmento de unión a ligando del receptor de membrana, el segmento adaptador de la proteína de fusión presenta en esta constelación la función de un denominado “segundo anticuerpo” o anti-anticuerpo que reconoce el denominado anticuerpo “primario” asociado con el segmento mediador.

2) En una segunda variante se eligen para el receptor de membrana receptores con segmentos mediadores que en caso de unión de ligando al segmento de unión a ligando del receptor de membrana o, alternativamente, sólo en *ausencia* de unión de ligando al segmento de unión a ligando del receptor de membrana se pueden unir a proteínas adaptadoras que median la unión de la proteína o polipéptido efector.

Los receptores de membrana adecuados para ello, que dado el caso sólo proporcionan el segmento mediador, son en particular receptores acoplados a enzimas con una actividad enzimática propia, en particular con una actividad quinasa, por ejemplo una actividad tirosina quinasa, una actividad serina/treonina quinasa o una actividad fosfatasa, que se localiza en el segmento citoplasmático del receptor. La actividad enzimática del segmento mediador siempre se activa sólo en caso de unión o, alternativamente, sólo en *ausencia* de unión de ligando al dominio de unión a ligando del receptor de membrana como consecuencia del cambio estructural, en especial conformacional, provocado por la (ausencia de) unión de ligando. En determinadas formas de realización la actividad enzimática es necesaria para la unión, posible en caso de unión de ligando o, alternativamente, en *ausencia* de unión de ligando, de la o las proteína(s) adaptadora(s) al segmento mediador, por ejemplo a través de una fosforilación, en parte múltiple, del segmento mediador (véanse las figuras 2a y 3) y/o también a través de una fosforilación de la(s) proteína(s) adaptadora(s). Un ejemplo de un receptor acoplado a enzimas de este tipo presente en la naturaleza es el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), que presenta una actividad tirosina quinasa (véase la fig. 3).

Los receptores de membrana que se pueden usar en este caso pueden ser, como en el apartado 1), receptores presentes en la naturaleza, receptores derivados de estos receptores o también receptores sintéticos que comprenden, en especial, segmentos de diferentes orígenes con las funciones antes mencionadas, tales como localización en la membrana, unión a ligando y función mediadora. Estos segmentos pueden proceder a su vez de receptores presentes en la naturaleza o de otro tipo de proteínas o derivar de éstos según los procesos ya explicados. En una forma de realización especial de la invención, también en los receptores sintéticos de este tipo el segmento de unión a ligando provoca, en caso de unión de ligando, los cambios estructurales, en especial conformacionales, que en este caso se producen de forma natural en los receptores acoplados a enzimas, con efectos sobre el segmento mediador, especialmente sobre la actividad enzimática localizada en este segmento. De forma alternativa, también en este caso son imaginables en caso de unión de ligando otros tipos de cambios estructurales con efectos detectables sobre el segmento mediador del receptor y, especialmente, sobre la actividad enzimática localizada en este segmento.

La translocación de la proteína o polipéptido efector a la membrana se puede producir ahora mediante la unión de la proteína o polipéptido efector a la proteína adaptadora asociada a la membrana por unión al segmento mediador (alternativa (a)) o usando una proteína de fusión que contiene la proteína o polipéptido efector en fusión con la proteína adaptadora (alternativa (b)).

En una forma de realización especial se pueden elegir para la alternativa (a) segmentos mediadores de receptores de membrana que en el caso de unión de un ligando a su segmento de unión a ligando o, alternativamente, en *ausencia* de unión de ligando a su segmento de unión a ligando se unen a proteínas adaptadoras a las que se une de forma natural un factor de intercambio de nucleótidos de guanina (GEF). Ejemplos de un receptor de membrana de este tipo son el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y las proteínas adaptadoras Grb2 y Shc específicas de su segmento citoplasmático o mediador. A estas proteínas adaptadoras Grb2 y Shc, que sólo se unen al segmento mediador del EGFR en caso de producirse una unión de ligando al segmento de unión a ligando de éste, se une a su vez un factor de intercambio de nucleótidos de guanina que es capaz de activar una ruta de señalización ras o similar a ras en una célula.

En otra forma de realización de la alternativa (a), la proteína o polipéptido efector también se puede proporcionar en forma de una proteína de fusión formada por un segmento efector que es capaz de activar una ruta de señalización ras o similar a ras en una célula y un segmento con propiedad de anticuerpo o de proteína de unión, en la que el segmento con propiedad de anticuerpo o de proteína de unión reconoce y se une específicamente a la(s) proteína(s) adaptadora(s) que como consecuencia de una unión de ligando o, alternativamente, en *ausencia* de unión de ligando al segmento de unión a ligando del receptor de membrana se unen al segmento mediador de éste.

En una variante especial de esta forma de realización, la proteína adaptadora no constituye una proteína adaptadora presente en la naturaleza, como Grb2 o Shc, o una proteína adaptadora derivada de ella, sino que presenta igualmente una propiedad de anticuerpo, en la que, como se acaba de explicar, la proteína adaptadora-anticuerpo reconoce y se une al segmento mediador del receptor de membrana sólo como consecuencia de una unión de ligando al segmento de unión a ligando o, alternativamente, en *ausencia* de unión de ligando al segmento de unión a ligando del mismo. En este caso, el segmento adaptador de la proteína de fusión posee la función de un denominado "anticuerpo secundario" o de anti-anticuerpo que reconoce el denominado anticuerpo "primario" asociado con el segmento mediador.

En la alternativa (b) se prevé la proteína efectora en forma de una proteína de fusión que contiene el segmento efector en fusión con la proteína adaptadora. Mediante la unión del segmento de proteína adaptadora de la proteína de fusión al segmento mediador de un receptor de membrana como consecuencia de la unión de ligando o, alternativamente, la *ausencia* de unión de ligando al segmento de unión a ligando de éste, también se conduce a la membrana, a través del enlace covalente presente en la proteína de fusión, el segmento efector, que puede ejercer allí su efecto de activación de una ruta de señalización ras o similar a ras.

Un ejemplo de esta variante (b) es una proteína de fusión que comprende una proteína Grb2 o Shc como segmento adaptador fusionada con una proteína Ras preferentemente activa de forma constitutiva, por ejemplo la proteína Ras humana activa de forma constitutiva (Ha-Ras, L61), o con un GEF funcional como segmento efector. Una proteína de fusión de este tipo se usa de nuevo, por ejemplo, en combinación con un receptor de membrana EGFR o con un receptor que comprende la región citoplasmática de éste, en el que en caso de unión de ligando el segmento citoplasmático o

mediador del EGFR interactúa con la parte Grb2 o Shc de la proteína de fusión y conduce de este modo el segmento efector a la membrana (véanse también las figuras 2a, 3).

Otro ejemplo de esta variante (b) es una proteína de fusión que como segmento adaptador presenta un anticuerpo o una proteína de unión que sólo reconoce y se une específicamente a la estructura/conformación del segmento mediador del receptor de membrana presente tras la unión de un ligando al segmento de unión a ligando o, alternativamente, en *ausencia* de unión de un ligando al segmento de unión a ligando.

3) La tercera variante es similar a la segunda variante, pero en ella el receptor acoplado a enzimas usado como receptor de membrana o aprovechado para la configuración del segmento mediador del receptor de membrana no presenta una actividad enzimática propia que se activa en caso de unión de ligando o, alternativamente, en *ausencia* de unión de ligando, sino que más bien activa, en dependencia estricta de una activación propia por unión de ligando o *ausencia* de unión de ligando, una enzima separada específica del receptor que se encuentra, por ejemplo, en una subunidad separada. Como ejemplos de este tipo de receptores se pueden mencionar diversos receptores de citocinas.

En una forma de realización especial, esta enzima separada específica del receptor también puede ser heteróloga respecto a la célula. Preferentemente, la enzima separada específica del receptor es igualmente una quinasa y, especialmente, una tirosina quinasa. De nuevo, la actividad de la quinasa conduce preferentemente a la fosforilación del segmento mediador, es decir, del segmento citoplasmático del receptor de membrana, actuando así adicionalmente sobre la unión de una proteína adaptadora específica del segmento mediador.

Por lo demás es válido lo mismo que para el receptor de membrana de la variante 2), es decir que éste puede ser un receptor de membrana presente en la naturaleza, un receptor de membrana derivado de un receptor de membrana de este tipo o un receptor de membrana sintético cuyos diferentes dominios o segmentos provienen de diferentes fuentes que, dado el caso, también pueden derivar de secuencias presentes en la naturaleza.

Como en la variante 2), la translocación de la proteína o polipéptido efector a la membrana se puede producir también en este caso por unión de la proteína o polipéptido efector a una proteína adaptadora asociada a la membrana por unión al segmento mediador (alternativa (a)) o usando una proteína de fusión que contiene la proteína o polipéptido efector en fusión con la proteína adaptadora (alternativa (b)).

También en este caso se pueden mencionar como ejemplos para las proteínas adaptadoras posibles Grb2 y Shc, que dado el caso también se pueden usar en forma de proteínas de fusión con un segmento efector que es capaz de activar una ruta de señalización ras o similar a ras, pero también anticuerpos o proteínas de unión de otro tipo que sólo reconocen y se unen específicamente a la estructura/conformación del segmento mediador del receptor de membrana presente tras la unión de un ligando al segmento de unión a ligando o, alternativamente, en *ausencia* de unión de un ligando al segmento de unión a ligando y que se pueden usar en forma de proteínas de fusión con un segmento efector. De forma alternativa, la proteína adaptadora en forma de anticuerpo o la proteína adaptadora en forma de proteína de unión no comprende una función efectora sino que es reconocida y unida a su vez, a través del segmento adaptador, por una proteína de fusión con un segmento efector y un segmento adaptador con la función de, en especial, un denominado “segundo anticuerpo” o anti-anticuerpo que reconoce el denominado anticuerpo “primario” (proteína adaptadora en forma de anticuerpo) asociado con el segmento mediador.

4) En una cuarta variante adicional se usa como receptor de membrana una proteína de fusión que dentro de su secuencia, en especial dentro o en la región C-terminal, presenta un denominado “Tag” o epítipo que se vuelve accesible al reconocimiento por un anticuerpo específico de éste o por una proteína de unión específica de éste sólo en caso de unión de ligando al segmento de unión a ligando o, alternativamente, sólo en *ausencia* de unión de ligando al segmento de unión a ligando. Como ejemplos de “Tags” o epítipos adecuados son de mencionar un Myc-Tag, un His-Tag, un epítipo de hemaglutinina y similares.

El “Tag” o el epítipo puede formar parte del segmento mediador, aunque también puede ser adyacente a él o estar separado de él por un segmento de secuencia de aminoácidos. Sin embargo, éste sólo se vuelve accesible a un anticuerpo específico o a una proteína de unión específica por cambios conformacionales, dado el caso en combinación con una actividad enzimática, producidos como consecuencia de una unión de ligando al segmento de unión a ligando del receptor de membrana o, alternativamente, por disociación del ligando del segmento de unión a ligando del receptor de membrana, es decir, en esta última variante en caso de *ausencia* de unión de ligando. Por lo tanto, puede añadirse un “Tag” o epítipo a cualquiera de los tipos de receptores mencionados, es decir, tanto a un receptor acoplado a proteína G (GPCR) como a tirosina quinasas receptoras o fosfatasa receptoras, siempre que se cumplan las condiciones antes indicadas respecto a la accesibilidad del “Tag” o del epítipo a un anticuerpo o a una proteína de unión específica.

La proteína efectora se prevé en este caso en forma de proteína de fusión que comprende el segmento efector y un anticuerpo específico para el “Tag” o el epítipo o una proteína de unión específica para el “Tag” o el epítipo. Si el “Tag” o epítipo se vuelve accesible para el anticuerpo contenido en la proteína de fusión o para la proteína de unión contenida en la proteína de fusión como consecuencia de una unión de ligando al segmento de unión a ligando o, alternativamente, en *ausencia* de unión de ligando y por los efectos resultantes sobre el segmento mediador, se produce una translocación de la proteína o polipéptido efector a la membrana por medio de la reacción “Tag”/epítipo-anticuerpo/proteína de unión. Por lo tanto, si se dan las condiciones conformacionales indicadas, esta cuarta variante es la que más ampliamente se puede usar puesto que por lo demás no necesita tener en cuenta los requisitos especiales de

los segmentos mediadores presentes en la naturaleza, como los de los receptores acoplados a proteínas G, las tirosina quinasas receptoras o las fosfatasa receptoras, ni de los segmentos mediadores sintéticos derivados de ellos. Además, la necesidad de proporcionar como proteína efectora únicamente una proteína de fusión con un segmento efector y un segmento de anticuerpo o de proteína de unión específico para el “Tag” o el epítipo supone una simplificación considerable tanto del procedimiento para la preparación de las células de acuerdo con la invención como de los procedimientos de ensayo, descritos con más detalle a continuación, que se sirven de estas células.

Si con la ayuda de las células de levadura descritas se han de realizar ensayos que, como se explicará con más detalle a continuación, detectan específicamente la interacción de ligandos con el segmento de unión a ligando de receptores de membrana, se entiende que el acontecimiento de translocación de la proteína o polipéptido efector a la membrana celular sólo debe producirse en caso de existir una interacción entre el ligando y el segmento de unión a ligando o, alternativamente, en *ausencia* de una interacción entre el ligando y el segmento de unión a ligando en el receptor de membrana que se ha de estudiar especialmente. Es decir, la asociación de la proteína o polipéptido efector con los componentes celulares asociados a la membrana que (en ausencia del receptor de membrana y de los componentes celulares que cooperan específica y exclusivamente con éste en la transducción de señales) existen de forma natural en estas células debe quedar excluida, independientemente del estado de activación o de modificación de los componentes celulares, de forma general o al elegir determinadas condiciones de cultivo especiales. Esto presupone que todos los componentes que participan directa e indirectamente en la translocación de la proteína o polipéptido efector a la membrana celular serán capaces de mediar o causar la unión de la proteína o polipéptido efector a un componente de la membrana celular de forma general o al elegir estas condiciones de cultivo especiales sólo como consecuencia de la activación del receptor de membrana que se ha de analizar especialmente producida por la unión de un ligando al segmento de unión a ligando o, alternativamente, por *ausencia* de unión de ligando al segmento de unión a ligando, y, más exactamente, sólo como consecuencia del cambio estructural del segmento mediador condicionado por esta activación.

Si en un ensayo alternativo se ha de analizar un receptor de membrana presente de forma natural en una célula, debe asegurarse que el segmento mediador de este receptor de membrana sólo está presente en la célula en combinación con éste y que las proteínas adaptadoras y mediadoras que cooperan con él sólo pueden interactuar con este segmento mediador o sólo como consecuencia de una activación de este segmento mediador de tal manera que finalmente se produzca una translocación de la proteína o polipéptido efector a la membrana celular.

De forma alternativa se puede elegir como célula de ensayo una célula en la que ninguno de estos componentes está presente de forma natural antes de introducir la información genética para el receptor de membrana y las proteínas o polipéptidos adaptadores, mediadores y/o efectores dado el caso necesarios, es decir que todos ellos son heterólogos respecto a esta célula de partida, y en la que tampoco están presentes componentes propios de la célula con la misma especificidad y, dado el caso, actividad que pudieran sustituirlos; respecto al receptor de membrana, esto también puede ser válido sólo para el segmento mediador. En caso contrario, debe asegurarse que una célula de partida que contenía anteriormente estos componentes o, dado el caso, respecto al receptor de membrana, sólo el segmento mediador especial en un estado original ya no contiene estos componentes a causa de modificaciones genéticas u otras modificaciones antes de la introducción de la información genética para el receptor de membrana y las proteínas o polipéptidos adaptadores, mediadores y/o efectores dado el caso necesarios. Resumiendo, esto afecta al menos a los siguientes componentes:

- el segmento mediador,
- dado el caso las proteínas adaptadoras o los segmentos de proteínas adaptadoras que cooperan con él en caso de que se produzca una unión de la proteína o polipéptido efector con éstas o a través de estas, así como

- por ejemplo, en el caso de la alternativa 1)c) descrita, dado el caso un componente mediador que no tiene que estar asociado directa y espacialmente con el segmento mediador del receptor de membrana pero que es activado o modificado por éste en el caso de unión de ligando o, alternativamente, en *ausencia* de unión de ligando al segmento de unión a ligando y, por consiguiente, media un acontecimiento secundario en un componente adicional de la membrana celular como consecuencia de lo cual la proteína o polipéptido efector se une específicamente a este componente de la membrana celular que no está asociado con el segmento mediador del receptor de membrana; de forma alternativa, el acontecimiento secundario mencionado sólo debe ser mediado en la célula en caso de unión de ligando o, alternativamente en *ausencia* de unión de ligando al segmento de unión a ligando del receptor de membrana. Por lo tanto, en este último caso no deben estar presentes en la célula parejas de interacción para estos mediadores que puedan ejercer sobre el o los mediadores un efecto activador equivalente al del receptor de membrana.

Por lo tanto, en algunas formas de realización de la solicitud, la expresión de determinados tipos de proteínas y proteínas de fusión en un sistema celular adecuado que no contiene estas proteínas y proteínas de fusión de forma natural constituye un aspecto esencial. Dependiendo del receptor de membrana usado y, en especial, del mecanismo condicionado por el segmento mediador del receptor de membrana que conduce finalmente a una translocación de la proteína o polipéptido efector a la membrana, puede resultar necesario expresar una o varias de las proteínas antes mencionadas en una célula que no la(s) contiene de forma natural. Estas proteínas se pueden expresar en su forma natural, siempre que exista una tal, o en forma de proteínas de fusión.

ES 2 318 908 T3

Los constructos génicos que codifican estas proteínas o proteínas de fusión pueden estar presentes en la célula de forma cromosómica, es decir, integradas en el cromosoma, o de forma extracromosómica como componente de un episoma, en especial de un plásmido.

5 Una primera proteína de fusión de este tipo puede ser un receptor de membrana como el descrito con anterioridad en el que especialmente y, dado el caso, también exclusivamente el segmento mediador es heterólogo respecto a la célula.

10 Otra de estas proteínas de fusión proporciona la proteína o polipéptido efector en una forma especial y consta de dominios o regiones que reúnen las siguientes funciones:

15 i) la interacción específica asociada a la membrana de un segmento adaptador de la proteína de fusión con un componente de la membrana y, en una forma de realización especial, con el segmento mediador del receptor en función de la unión extracelular de ligando o, alternativamente, en *ausencia* de unión extracelular de ligando (función adaptadora);

20 ii) la posibilidad de activación de una ruta de transducción de señales ras o similar a ras en función de la localización en la membrana condicionada por el segmento adaptador gracias a un segmento efector fusionado con el segmento adaptador en la proteína de fusión (función efectora).

25 La función mencionada en primer lugar hace que la proteína de fusión adaptador/efector sólo llegue a la membrana y, con ello, al lugar de acción de aquella región de la proteína de fusión que es responsable de la segunda función cuando se haya unido un ligando a la región generalmente extracelular, es decir, al segmento de unión a ligando del receptor o, alternativamente, cuando no exista tal unión de ligando.

30 En el primer caso, el receptor está presente, sin ligando unido, en una configuración que no se puede unir directamente al segmento adaptador ni puede desencadenar un proceso subsiguiente asociado a la membrana a través de un mediador que pueda ser reconocido por el segmento adaptador. En caso de unión de ligando, la región citosólica del receptor adopta en esta variante una configuración que puede ser reconocida directamente por la región adaptadora o desencadena un proceso subsiguiente que hace que otras proteínas mediadoras que pueden ser reconocidas por el adaptador adopten una configuración proteica asociada a la membrana. Así pues, en ausencia de unión de ligando, la proteína de fusión adaptador/efector no está presente en el lugar de acción del segmento efector en el citosol. El segmento efector sólo puede ser activo como componente de transducción de señales en la ruta de transducción de señales ras o similar a ras si se asocia a la membrana (fig. 2a y b).

35 En el último caso, el receptor está presente, *en caso de unión de ligando*, en una configuración que no se puede unir directamente al segmento adaptador ni puede desencadenar un proceso subsiguiente asociado a la membrana a través de un mediador que pueda ser reconocido por el segmento adaptador. Cuando *el ligando se disocia o en ausencia* de unión de ligando, la región citosólica del receptor adopta en esta variante una configuración que puede ser reconocida directamente por la región adaptadora o desencadena un proceso subsiguiente que hace que otras proteínas mediadoras que pueden ser reconocidas por el adaptador adopten una configuración proteica asociada a la membrana. En esta variante, pues, la proteína de fusión adaptador/efector no está presente en el lugar de acción del segmento efector en el citosol en caso de unión de ligando. El segmento efector sólo puede ser activo como componente de transducción de señales en la ruta de transducción de señales ras o similar a ras si se asocia a la membrana.

45 Una activación de este tipo se puede detectar, como se explicará con más detalle más adelante, a través de cambios fenotípicos (por ejemplo, crecimiento o actividad génica o de un gen reportero) en la célula, debiendo ser las células en la primera variante inactivas respecto a la ruta de transducción de señales ras o similar a ras en las condiciones de ensayo y en ausencia del ligando y debiendo ser éstas en la última variante inactivas respecto a la ruta de transducción de señales ras o similar a ras en las condiciones de ensayo y en presencia del ligando.

50 En un sistema experimental de la invención usado con preferencia, la proteína de fusión comprende como segmento efector una proteína Ras humana mutada (Ha-Ras, L61) que carece de la secuencia de farnesilación, que es responsable de la localización de la proteína en la membrana.

55 También se pueden expresar en la célula otros componentes proteicos, dado el caso en forma de proteínas de fusión no presentes en la naturaleza, que participan directa o indirectamente en la translocación de la proteína o polipéptido efector además del receptor de membrana y, en especial, su segmento mediador y la proteína efectora misma.

60 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 de membrana que, cuando se unen al segmento de unión a ligando de un receptor de este tipo, provocan un cambio estructural, en especial un cambio conformacional, y/o una modificación enzimática, por ejemplo por fosforilación o desfosforilación, cuyos efectos sobre el segmento mediador hacen que a continuación se una una proteína o polipéptido efector que es capaz de activar una ruta de señalización ras o similar a ras en la célula a un componente de la membrana, dado el caso a través de otras proteínas o polipéptidos (adaptadores). Esto puede comprender en particular cambios estructurales y, en especial, conformacionales como los que se producen *in vivo* cuando se une un ligando natural y para los cuales se han descrito anteriormente ejemplos. No obstante, también se consideran casos en los que el

cambio estructural y, en especial, conformacional no corresponde, o sólo lo hace parcialmente, al cambio estructural o conformacional producido cuando se une un ligando presente *in vivo* en la célula. El término “ligando” no abarca las parejas de unión que no provocan un cambio estructural de este tipo.

Las expresiones “ruta de señalización ras y similar a 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 específicamente a la activación de uno solo 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.

En cada una de las formas de realización descritas se activa ahora en el contexto celular una ruta de transducción de señales ras o similar a ras por acción del componente de transducción de señales activo. Si se usa una célula de levadura en la que en ausencia del receptor de membrana estudiado de acuerdo con la invención 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 de un gen reportero, provocadas por la activación mediada por la translocación de la proteína o polipéptido efector a la membrana como consecuencia de la unión de ligando o, alternativamente, en *ausencia* de unión de ligando a precisamente este receptor de membrana.

La proteína o polipéptido efector activa con preferencia 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.

La proteína o polipéptido efector 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, la proteína o polipéptido efector 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, la proteína o polipéptido efector puede presentar la actividad de un factor de intercambio de nucleótidos de guanina (“guanine nucleotide exchange factor”) funcional. En este aspecto, la secuencia de aminoácidos de la proteína o polipéptido efector 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 de la proteína o polipéptido efector 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.

La solicitud comprende asimismo moléculas de ADN que codifican nuevas proteínas de fusión, que son igualmente objeto de la solicitud, 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 son adecuados para la transformación o transfección de células huésped o para la expresión de al menos una proteína de fusión heteróloga. Para este último propósito, la molécula de ADN 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 heterólogas, de las moléculas de ADN y de los vectores 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 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 o proteínas de unión 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. 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 número de protocolos individuales.

Otro objeto central de la solicitud también son, además de las células antes descritas, células que contienen uno o varios de los receptores de membrana descritos en la reivindicación 1, en particular una o varias de las proteínas de fusión/receptor de membrana de acuerdo con la invención. En el marco de esta solicitud, todos los dominios de la proteína de fusión/receptor de membrana y/o, dado el caso, también partes de uno o varios segmentos o dominios de éstos deben ser heterólogos respecto a la célula huésped o de partida.

Para la preparación de las células se puede efectuar, por ejemplo, una transformación o transfección de las células de partida con un vector de expresión que contiene un gen para el receptor de membrana con las características descritas en la reivindicación 1, en particular una proteína de fusión, bajo el control de un promotor que es funcional en la célula de partida. Como células de partida se consideran células de levadura. Ejemplos de células de partida son células de levadura, como determinadas cepas de *Saccharomyces cerevisiae*.

Las células también se pueden proporcionar como formas fantasma de las levaduras sin pared celular, que en el presente contexto se incluyen igualmente bajo el término "células".

Una característica esencial de las células reside en que la proteína o polipéptido efector no es capaz de activar la ruta de señalización ras o similar a ras especial en las células en ausencia de unión de ligando al segmento de unión a ligando del receptor de membrana o, alternativamente, la proteína o polipéptido efector no es capaz, en especial, de activar la ruta de señalización ras o similar a ras especial en las células en caso de unión de un ligando al segmento de unión a ligando del receptor de membrana.

En una forma de realización preferida de esta solicitud, la célula se caracteriza porque en ausencia del receptor de membrana descrito en la reivindicación 1 no se puede activar, al menos en determinadas condiciones, una ruta de señalización ras o similar a ras en la célula y, en especial, la ruta de señalización cuya activación es capaz de realizar la proteína o polipéptido efector. Así, en el estado de la técnica se conocen células en las que una ruta de transducción de señales ras determinada 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 o el receptor de membrana heterólogo.

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* (Broder y col., 1998). 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.

- 5 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.

- 10 De forma alternativa también se puede usar para la preparación de las células de acuerdo con la invención una célula de levadura 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
15 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 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 solicitud, una modificación que acelera
20 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
25 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 segmento mediador del receptor de membrana estudiado es capaz de activar, a través de su efecto sobre la proteína o polipéptido efector, 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
30 cultivo al estado de desconexión del promotor la activación de esta ruta de señalización exclusivamente por los efectos del receptor de membrana estudiado, 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 al receptor de membrana que se ha de estudiar de acuerdo con la invención.

- 35 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 o polipéptido efector puede activar precisamente esta ruta de transducción de señales ras, esta proteína o polipéptido efector puede presentar la actividad de un factor de intercambio de nucleótidos de guanina funcional o de una proteína
40 Ras activa, en especial activa de forma constitutiva, que puede activar la ruta de transducción de señales ras inactiva. Si se usa una proteína o polipéptido efector 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
45 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 o en la célula de ensayo 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
50 ausencia de una proteína Ras propia de la célula, en el caso preferido en el que la proteína o polipéptido efector puede activar precisamente esta ruta de señalización ras, ésta presentará la actividad de una proteína Ras activa, en especial activa de forma constitutiva. Si la proteína o polipéptido efector 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
55 de guanina heterólogo que se ha de coexpresar en la célula.

- Las técnicas de biología molecular necesarias para la preparación de las células, 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
60 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, por ejemplo, proteínas y proteínas de fusión heterólogas puede llevarse a cabo tanto a partir de un gen contenido en un episoma, en especial en un plásmido, presente en forma extracromosómica como a partir de un gen integrado en el genoma de la célula de
65 partida. El experto dispone de diversas técnicas, por ejemplo de estrategias antisentido, 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, y en especial para la inactivación génica selectiva, que puede ser necesaria también en otro contexto en determinadas constelaciones del ensayo, o para la introducción selectiva de mutaciones

o delecciones 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, las células y células de ensayo 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 polisacáridos, 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 están inmovilizadas en los denominados biochips (Wolf y col., 1997 y 1998). Inmovilizadas en soportes sólidos, especialmente en biochips, las células se usan en esta forma sobre todo en procedimientos de alto rendimiento para detectar y medir interacciones entre receptores de membrana y ligando. 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 células de levadura transformadas y las proteínas de fusión heterólogas constituyen la base para una serie de procedimientos de ensayo *in vivo* que son igualmente objeto de esta solicitud.

Los procedimientos de ensayo descritos con más detalle a continuación que se pueden realizar cuando se aplica la primera variante, es decir, cuando la translocación de la proteína o polipéptido efector a la membrana celular es posible sólo en caso de unión de ligando al segmento de unión a ligando del receptor de membrana estudiado, se pueden usar entre otras cosas para

1. determinar la adecuación de una sustancia de ensayo como ligando para un receptor 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 tipo silvestre del receptor,

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 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; y

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 determinados; en el caso de los polipéptidos o proteínas también se puede tratar, en particular, de nuevos segmentos de unión a ligando de receptores 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 y comprende los siguientes pasos:

(a) Poner en contacto la sustancia de ensayo con las células en unas condiciones en las que, en ausencia del receptor de membrana, no se pueda activar una ruta de señalización ras o similar a ras en las células, conteniendo el receptor de membrana contenido en las células el segmento de unión a ligando mencionado y siendo la proteína o polipéptido efector, cuya unión a un componente de membrana depende de la unión de un ligando al segmento de unión a ligando del receptor de membrana, capaz de activar la ruta de señalización ras o similar a ras inactiva,

(b) analizar si se ha producido una activación de la ruta de señalización ras o similar a ras.

La detección de una activación de la ruta de señalización ras o similar a ras indica la capacidad de unión de la sustancia de ensayo al segmento de unión a ligando.

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

- (a) Poner en contacto la muestra con las células en unas condiciones en las que, en ausencia del receptor de membrana, no se pueda activar una ruta de señalización ras o similar a ras en la célula, conteniendo el receptor de membrana contenido en las células el segmento de unión a ligando mencionado y siendo la proteína o polipéptido efector, cuya unión a un componente de membrana depende de la unión de un ligando al segmento de unión a ligando del receptor de membrana, capaz de activar la ruta de señalización ras o similar a ras inactiva,
- (b) analizar si se ha producido una activación de la ruta de señalización ras o similar a ras.

De forma análoga al ensayo mencionado en primer lugar, la detección de una activación de la ruta de señalización ras o similar a ras muestra la presencia de un ligando para el segmento de unión a ligando de un receptor en la muestra.

Como rutas de señalización ras o similares a ras preferidas, denominadas en lo sucesivo alternativamente también sólo rutas de señalización ras, 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, 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 de un gen reportero.

Si por consiguiente se usan para los ensayos células en las que la ruta de señalización ras o similar a ras inactiva 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 segmento de unión a ligando del receptor de membrana en la muestra.

Si para los ensayos se usan alternativamente células en las que la ruta de señalización ras o similar a ras inactiva 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 para una proteína reportera que se encuentra bajo el control del promotor mínimo, la detección de la expresión del gen reportero, realizada por detección del producto de transcripción o de traducción de éste, para comprobar la activación de la ruta de transducción de señales ras y, con ello, el establecimiento de la unión de ligando al segmento de unión a ligando del receptor de membrana. 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 una forma de realización preferida se trata en el caso del gen o proteína reportero de un gen o proteína heterólogo respecto a la célula de ensayo cuya presencia sólo se puede detectar específicamente cuando se produce la expresión del constructo sintético promotor/gen reportero como consecuencia de la activación de la ruta de señalización ras específica y de la activación ulterior del factor de transcripción específico. Si la detección no se produce como 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 del 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 ras o similar a 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 uno o varios constructos que contienen los genes para otros componentes adicionales del sistema de ensayo, por ejemplo el receptor de membrana.

ES 2 318 908 T3

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.

5 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 el estudio de 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.

10 En una forma de realización preferida, 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
15 de fondo del constructo del gen reportero, incluso sin la activación de la ruta de señalización ras o similar a ras por el receptor de membrana: 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 específicamente por la unión de ligando al receptor de membrana y por la
20 activación resultante de una ruta de señalización ras o similar a 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 al receptor de membrana no se verá afectada en ningún sentido debido a la degradación acelerada de la misma.

25 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
30 (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
35 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
40 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
45 ARNm formado mediante sondas específicas de éste.

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

50 (a) Poner en contacto el ligando con las células de levadura transformadas según la reivindicación 9 en presencia del compuesto y en unas condiciones en las que, en ausencia del receptor de membrana heterólogo, no se pueda activar una ruta de señalización ras o similar a ras en las células, conteniendo el receptor de membrana heterólogo el segmento de unión a ligando mencionado y siendo la proteína o polipéptido efector, cuya unión a un componente de membrana
55 depende de la unión de un ligando al segmento de unión a ligando del receptor de membrana heterólogo, capaz de activar la ruta de señalización ras o similar a ras inactiva,

(b) analizar si y, dado el caso, en qué medida se ha efectuado una activación de la ruta de señalización ras o similar a ras,
60

(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.

65 Una activación intensificada de la ruta de transducción de señales ras o similar a 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, en cuyo caso se puede 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 en el caso del compuesto se trata de un péptido, polipéptido o proteína, el compuesto también se puede preparar en la célula misma por expresión de un gen que lo codifica. Con este fin, las células se pueden transformar o transfectar con un vector de expresión que contiene un gen de este tipo. Los medios y procedimientos necesarios para ello son conocidos para el experto.

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 o similar a 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, el receptor de membrana se encuentra en un estado inactivo, 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 o similar a ras ni, en particular, con la proteína Ras o el factor de intercambio de nucleótidos de guanina específico de ella. De este modo se puede excluir o minimizar la probabilidad de que el producto de expresión interactúe con la proteína efectora o con una proteína adaptadora necesaria para la unión de la proteína efectora al componente de membrana en lugar de con el segmento de unión a ligando del receptor de membrana, de manera que se elimina su capacidad de activación de la ruta de transducción de señales ras o similar a ras.

Un ensayo correspondiente para detectar la activación de la ruta de transducción de señales ras o similar a 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 o similar a 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 ras o similar a 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. Este ensayo 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 o similar a 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.

ES 2 318 908 T3

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

De forma alternativa, el 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 realmente la presenta. Este ensayo comprende los siguientes pasos:

(a) Poner en contacto las células de levadura transformadas con el ligando en unas condiciones en las que, en ausencia del receptor de membrana heterólogo, no se pueda activar una ruta de señalización ras o similar a ras en las células, comprendiendo o constando el segmento de unión a ligando del receptor de membrana heterólogo del polipéptido o la proteína que se ha de analizar y siendo la proteína o polipéptido efector, cuya unión a un componente de membrana depende de la unión de un ligando al segmento de unión de ligando del receptor de membrana, capaz de activar la ruta de señalización ras o similar a ras inactiva,

(b) analizar si se ha producido una activación de la ruta de señalización ras o similar a ras.

La detección de una activación de la ruta de señalización ras o similar a ras indica que el segmento de unión a ligando del receptor de membrana y, por consiguiente, el polipéptido o la proteína que se ha de analizar presenta una función de unión a ligando de un receptor.

El receptor de membrana contenido en las células puede comprender, por ejemplo, un segmento de unión a ligando que contiene o consta de un segmento de unión a ligando derivado de un segmento de unión a ligando de un receptor natural por mutación.

De nuevo, en el caso de usar células en las que la ruta de transducción de señales ras o similar a 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 o similar a 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 o similar a 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 ras o similar a 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.

Los procedimientos de ensayo descritos con más detalle a continuación que se pueden realizar cuando se aplica la segunda variante, es decir, cuando la translocación de la proteína o polipéptido efector a la membrana celular sólo es posible en *ausencia* de unión de ligando al segmento de unión a ligando del receptor de membrana estudiado 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 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 tipo silvestre del receptor,

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 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; y

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; en el caso de los polipéptidos o proteínas también se puede tratar en particular de nuevos segmentos de unión a ligando de receptores 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 del receptor de membrana estudiado 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 del receptor de membrana estudiado, 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 la actividad de unión de un segmento de unión a ligando de un receptor 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; o

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 interacciones receptor/ligando mediante los procedimientos de ensayo, las células y las proteínas de fusión heterólogas está limitada a células de levadura como sistema de ensayo *in vivo*, por ejemplo a levaduras sin pared celular, las denominadas formas fantasma de las levaduras.

Dependiendo del receptor de membrana usado, y especialmente dependiendo del mecanismo condicionado por el segmento mediador del receptor de membrana que finalmente conduce a la translocación de la proteína o polipéptido efector a la membrana, en algunas formas de realización de la solicitud puede ser necesario adicionalmente, como ya se ha señalado con anterioridad, prever en la célula de ensayo condiciones previas adicionales que aseguren que el acontecimiento de translocación detectable se produce exclusivamente en caso de interacción de un ligando o, alternativamente, en ausencia de interacción de un ligando con el segmento de unión a ligando de este receptor de membrana. Debe quedar excluida la asociación de la proteína o polipéptido efector con componentes celulares asociados a la membrana que (en ausencia del receptor de membrana y de los componentes celulares que cooperan específica y exclusivamente con éste en la transducción de señales) existen de forma natural en estas células, independientemente del estado de activación o de modificación. Esto presupone que todos los componentes que participan directa e indirectamente en la translocación de la proteína o polipéptido efector a la membrana celular serán capaces de mediar o causar la unión de la proteína o polipéptido efector a un componente de la membrana celular sólo como consecuencia de la activación del receptor de membrana que se ha de analizar especialmente producida por la unión o, alternativamente, por ausencia de unión de ligando al segmento de unión a ligando, y, más exactamente, sólo como consecuencia del cambio estructural del segmento mediador condicionado por esta activación.

Como célula de ensayo debe elegirse una célula de levadura en la que no existe de forma natural ninguno de estos componentes antes de introducir la información genética para el receptor de membrana y las proteínas o polipéptidos adaptadores, mediadores y/o efectores dado el caso necesarios, es decir, que todos ellos son heterólogos respecto a esta célula de partida, y en la que tampoco están presentes componentes propios de la célula con la misma especificidad y, dado el caso, actividad que pudieran sustituirlos; respecto al receptor de membrana heterólogo, esto también puede ser válido sólo para el segmento mediador. Resumiendo, esto afecta al menos a los siguientes componentes:

- el segmento mediador,

- dado el caso las proteínas adaptadoras o los segmentos de proteínas adaptadoras que cooperan con él en caso de que se produzca una unión de la proteína o polipéptido efector con éstas o a través de estas, así como

- por ejemplo, en el caso de la alternativa 1)c) descrita, dado el caso un componente mediador que no tiene que estar asociado directa y espacialmente con el segmento mediador del receptor de membrana pero que es activado o modificado por éste en el caso de unión de ligando o, alternativamente, en ausencia de unión de ligando al segmento de unión a ligando y, por consiguiente, media un acontecimiento secundario en un componente adicional de la membrana celular como consecuencia de lo cual la proteína o polipéptido efector se une específicamente a este componente de la membrana celular que no está asociado con el segmento mediador del receptor de membrana; de forma alternativa, el acontecimiento secundario mencionado sólo debe ser mediado en la célula en caso de unión de ligando o, alternati-

vamente en *ausencia* de unión de ligando al segmento de unión a ligando del receptor de membrana. Por lo tanto, en este último caso no deben estar presentes en la célula parejas de interacción para estos mediadores que puedan ejercer sobre el o los mediadores un efecto activador equivalente al del receptor de membrana.

- 5 Si, por consiguiente, se usa un sistema celular en el que el receptor de membrana que se ha de analizar no existe de forma natural, puede ser necesario expresar en este sistema celular proteínas adicionales además del receptor de membrana, a saber, especialmente dado el caso proteínas o polipéptidos adaptadores y/o mediadores.

- 10 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
15 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 sustancias odoríferas, sustancias saporíferas, péptidos, hormonas peptídicas y proteínas, en especial citocinas, neurotransmisores, hormonas no proteicas ni peptídicas, en particular hormonas esteroides, vitaminas, por ejemplo vitamina D, tiroxina o ácido retinoico, así como sustancias que no están presentes en la naturaleza, por ejemplo derivados sintéticos de ligandos naturales o toxinas/sustancias tóxicas, tales como dioxina.

- En la mayoría de los casos el segmento de unión a ligando del receptor de membrana estará localizado extracelularmente. No obstante, cuando se usan segmentos de unión a ligando de, en especial, receptores nucleares también
25 existe la posibilidad de que éstos estén localizados intracelularmente. 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 para efectuar allí una unión con un segmento de unión a ligando del receptor de membrana localizado intracelularmente y directamente en la membrana celular. No obstante, si se desea y/o se requiere, las células también se pueden tratar previamente,
30 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” 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.

- 35 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 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. Cuando se usan receptores de membrana con un dominio de unión a ligando localizado extracelularmente
45 debe asegurarse que los ligandos expresados en la célula de ensayo también son secretados por las células de ensayo al espacio extracelular. El experto también conoce diversas posibilidades para este caso.

- Cabe señalar en general que cuando el ligando que se ha de ensayar se añade a la célula de ensayo desde el exterior, todos los componentes que cooperan en el sistema de ensayo, es decir en particular el receptor de membrana heterólogo
50 que se ha de estudiar como se define en la reivindicación 1, la proteína o polipéptido efector, las posibles proteínas o polipéptidos adaptadores y, dado el caso, mediadores, así como todos los componentes de la ruta de señalización posterior a una proteína Ras activada específicamente por la proteína o polipéptido efector en caso de su unión a un componente de la membrana 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 la translocación de la proteína o polipéptido efector a la membrana sólo se puede detectar en caso de unión de ligando al segmento de unión a ligando del receptor de membrana estudiado, 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,
60 posiblemente producida, de la ruta de transducción de señales ras, debido a la inducción selectiva del/los promotor(es) inducible(s) usado(s) en cada caso. En la segunda variante, en la que la translocación de la proteína o polipéptido efector a la membrana sólo se produce en ausencia de unión de ligando al receptor de membrana, 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.

- 65 La detección de la activación de la ruta de transducción de señales ras o similar a 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

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.

5 La solicitud proporciona asimismo kits para el uso en los ensayos que permiten, por ejemplo, determinar rápida y eficazmente si un ligando específico es capaz de unirse a un receptor determinado y, más exactamente, a su segmento de unión a ligando.

10 Un primer kit de la solicitud 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 unión a ligando de un receptor, para la determinación de la presencia de un ligando para un segmento de unión a ligando de un receptor en una muestra, así como para la caracterización de compuestos como posibles agonistas o antagonistas respecto a las interacciones receptor/ligando, comprende en cada caso células 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
15 de levadura 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 o similar a ras cuya activación debe detectarse mediante los ensayos, un promotor mínimo y el gen reportero. De forma alternativa, el 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
20 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.

25 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 ras o similar a ras en estas células y/o unas instrucciones de uso, entre otras cosas.

30 Un kit alternativo para los procedimientos de ensayo antes mencionados comprende los siguientes componentes a), b) y c):

(a) Células de levadura en las que al menos en determinadas condiciones no se puede activar una ruta de señalización ras o similar a ras;

35 (b) un vector de ácido nucleico en el que está insertada de forma que se pueda expresar una secuencia de ADN que codifica un receptor de membrana heterólogo como se ha definido anteriormente, siendo la proteína o polipéptido efector, cuya unión a un componente de membrana depende de la unión o, alternativamente, de la *ausencia* de unión de un ligando al segmento de unión a ligando del receptor de membrana, capaz de activar la ruta de señalización ras o similar a ras inactiva en las células mencionadas en el punto (a);
40

(c) un vector de ácido nucleico en el que está insertada de forma que se pueda expresar una secuencia de ADN que codifica la proteína o polipéptido efector que en el caso de una unión de ligando o, alternativamente, en *ausencia* de unión de ligando al segmento de unión a ligando del receptor de membrana se puede unir a un componente de la membrana, dado el caso a través de otras proteínas o polipéptidos adicionales;
45

(d) un vector de ácido nucleico en el que está insertada de forma que se pueda expresar una secuencia de ADN que codifica al menos una proteína adaptadora a través de la cual la proteína o polipéptido efector se puede unir a un componente de la membrana en caso de unión o, alternativamente, en *ausencia* de unión de un ligando al segmento de unión a ligando del receptor de membrana.
50

Otro kit alternativo para los ensayos antes mencionados permite en especial, realizando una selección determinada de los componentes expuestos a continuación, la preparación de la célula de ensayo con un receptor de membrana que contiene el segmento de unión a ligando deseado individualmente. El kit comprende al menos los siguientes componentes a), b) y c):
55

(a) Células de levadura en las que al menos en determinadas condiciones no se puede activar una ruta de señalización ras o similar a ras;

(b) un vector de ácido nucleico que comprende en una disposición adecuada:

- 60 - un segmento de ADN que codifica una señal de localización en la membrana de un receptor de membrana heterólogo como se ha definido anteriormente en relación con el receptor de membrana;
- un segmento de ADN que codifica un segmento mediador de un receptor de membrana heterólogo como se ha definido anteriormente en relación con el receptor de membrana; y
65
- un sitio de inserción dispuesto adecuadamente para la inserción funcional de una secuencia de ADN que codifica un segmento de unión a ligando de un receptor,

comprendiendo el vector de ácido nucleico, tras la inserción de una secuencia de ADN para el segmento de unión a ligando, un gen completo expresable para un receptor de membrana como se ha definido anteriormente y siendo la proteína o polipéptido efector, cuya unión a un componente de membrana depende de la unión o, alternativamente, de la *ausencia* de unión de un ligando al segmento de unión a ligando del receptor de membrana heterólogo, capaz de activar la ruta de señalización ras o similar a ras inactiva en las células mencionadas en el punto (a);

(c) un vector de ácido nucleico en el que está insertada de forma que se pueda expresar una secuencia de ADN que codifica la proteína o polipéptido efector que en el caso de una unión de ligando o, alternativamente, en *ausencia* de unión de ligando al segmento de unión a ligando del receptor de membrana se puede unir a un componente de la membrana, dado el caso a través de otras proteínas o polipéptidos adicionales;

(d) un vector de ácido nucleico en el que está insertada de forma que se pueda expresar una secuencia de ADN que codifica al menos una proteína adaptadora a través de la cual la proteína o polipéptido efector se puede unir a un componente de la membrana en caso de unión o, alternativamente, en *ausencia* de unión de un ligando al segmento de unión a ligando del receptor de membrana.

En otra forma de realización especial del componente (c) de los dos kits mencionados en último lugar, el vector de ácido nucleico contenido en ellos comprende una secuencia de ADN que codifica una proteína o polipéptido efector en forma de una proteína de fusión formada por un segmento efector y un segmento de anticuerpo o de proteína de unión con una afinidad de unión específica por una estructura "Tag" o de epítipo situada en el receptor de membrana que sólo se vuelve accesible para el anticuerpo o la proteína de unión por cambios conformacionales, dado el caso en combinación con una actividad enzimática, producidos como consecuencia de una unión de ligando o, alternativamente, en *ausencia* de unión de ligando al segmento de unión a ligando del receptor de membrana.

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 o similar a 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 solicitud también proporciona kits para los procedimientos de ensayo para determinar si un polipéptido o una proteína presenta una función de unión a ligando de un receptor.

Un kit adecuado para esto comprende células de levadura, en el que el receptor de membrana heterólogo contenido en ellas comprende un segmento de unión a ligando que comprende o consta de un polipéptido o una proteína que se sospecha presenta una función de unión a ligando de un receptor.

Un kit alternativo comprende al menos dos de los siguientes componentes:

(a) Células de levadura en las que al menos en determinadas condiciones no se puede activar una ruta de señalización ras o similar a ras;

(b) un vector de ácido nucleico en el que está integrada de forma que se pueda expresar una secuencia de ADN que codifica un receptor de membrana heterólogo como se ha definido anteriormente, en el que el segmento de unión a ligando del receptor de membrana heterólogo comprende o se compone de un polipéptido o una proteína que se sospecha presenta una función de unión a ligando de un receptor y la proteína o polipéptido efector, cuya unión a un componente de membrana depende de la unión o, alternativamente, de la *ausencia* de unión de un ligando al segmento de unión a ligando del receptor de membrana, es capaz de activar la ruta de señalización ras o similar a ras inactiva en las células mencionadas en el punto (a);

(c) un vector de ácido nucleico en el que está insertada de forma que se pueda expresar una secuencia de ADN que codifica la proteína o polipéptido efector que en el caso de una unión de ligando o, alternativamente, en *ausencia* de unión de ligando al segmento de unión a ligando del receptor de membrana se puede unir a un componente de la membrana, dado el caso a través de otras proteínas o polipéptidos adicionales;

(d) un vector de ácido nucleico en el que está insertada de forma que se pueda expresar una secuencia de ADN que codifica al menos una proteína adaptadora a través de la cual se puede unir la proteína o polipéptido efector a un componente de la membrana en caso de unión o, alternativamente, en *ausencia* de unión de un ligando al segmento de unión a ligando del receptor de membrana.

Un kit alternativo para el uso en el ensayo mencionado permite entre otras cosas, seleccionando especialmente los componentes indicados a continuación, dotar una célula de ensayo selectivamente de un receptor de membrana que como segmento de unión a ligando comprende un polipéptido o una proteína según el deseo del usuario del kit

cuya función de unión a ligando se ha de estudiar. Un kit de este tipo comprende al menos dos de los siguientes componentes:

(a) Células de levadura en las que al menos en determinadas condiciones no se puede activar una ruta de señalización ras o similar a ras;

(b) un vector de ácido nucleico que comprende en una disposición adecuada:

- un segmento de ADN que codifica una señal de localización en la membrana de un receptor de membrana heterólogo como se ha definido anteriormente en relación con el receptor de membrana;
- un segmento de ADN que codifica un segmento mediador de un receptor de membrana como se ha definido anteriormente en relación con el receptor de membrana; y
- un sitio de inserción dispuesto adecuadamente para la inserción funcional de una secuencia de ADN que codifica un polipéptido o una proteína que se sospecha presenta una función de unión a ligando de un receptor,

comprendiendo el vector de ácido nucleico, tras la inserción de una secuencia de ADN para el segmento de unión a ligando, un gen completo expresable para un receptor de membrana heterólogo y siendo la proteína o polipéptido efector, cuya unión a un componente de membrana depende de la unión o, alternativamente, de la *ausencia* de unión de un ligando al segmento de unión a ligando del receptor de membrana formado por el polipéptido o la proteína que se sospecha presenta una función de unión a ligando de un receptor, capaz de activar la ruta de señalización ras o similar a ras inactiva en las células mencionadas en el punto (a);

(c) un vector de ácido nucleico en el que está insertada de forma que se pueda expresar una secuencia de ADN que codifica la proteína o polipéptido efector que en el caso de una unión de ligando o, alternativamente, en *ausencia* de unión de ligando al segmento de unión a ligando del receptor de membrana se puede unir a un componente de la membrana, dado el caso a través de otras proteínas o polipéptidos adicionales;

(d) un vector de ácido nucleico en el que está insertada de forma que se pueda expresar una secuencia de ADN que codifica al menos una proteína adaptadora a través de la cual la proteína o polipéptido efector se puede unir a un componente de la membrana en caso de unión o, alternativamente, en *ausencia* de unión de un ligando al segmento de unión a ligando del receptor de membrana.

También para los dos kits mencionados en último lugar es válido que, en una forma de realización especial, el componente (c) del kit comprenda un vector de ácido nucleico cuya secuencia de ADN codifica una proteína o polipéptido efector en forma de una proteína de fusión formada por un segmento efector y una proteína o polipéptido adaptador que permite la unión a un componente de la membrana, dado el caso a través de otras proteínas o polipéptidos adicionales.

En otra forma de realización especial del componente (c) de los dos kits mencionados en último lugar, el vector de ácido nucleico contenido en ellos comprende igualmente una secuencia de ADN que codifica una proteína o polipéptido efector en forma de una proteína de fusión formada por un segmento efector y un segmento de anticuerpo o de proteína de unión con una afinidad de unión específica por una estructura "Tag" o de episoma situada en el receptor de membrana, que sólo se vuelve accesible para el anticuerpo o la proteína de unión por cambios conformacionales, dado el caso en combinación con una actividad enzimática, producidos como consecuencia de una unión de ligando al segmento de unión a ligando del receptor de membrana o, alternativamente, de una disociación del ligando del segmento de unión a ligando, es decir, en *ausencia* de unión de ligando al segmento de unión a ligando del receptor de membrana.

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 las formas de realización posibles, todos los kits de esta solicitud pueden comprender adicionalmente y entre otras cosas al menos uno de los siguientes componentes:

(b) dado el caso un vector de ácido nucleico en el que está insertada de forma que se pueda expresar una secuencia de ADN que codifica al menos una proteína mediadora que no tiene que estar asociada directa y espacialmente con el segmento mediador del receptor de membrana pero que es activada o modificada por este segmento mediador en el caso de una unión de ligando o, alternativamente, en *ausencia* de unión de ligando al segmento de unión a ligando del receptor de membrana y, por consiguiente, media un acontecimiento secundario en un componente adicional de

la membrana celular como consecuencia de lo cual la proteína o polipéptido efector se une específicamente a este componente de la membrana celular que no está asociado con el segmento mediador del receptor de membrana;

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

(g) 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 preferida de la invención, los kits comprenden las células inmovilizadas sobre un soporte sólido como se ha descrito anteriormente, en particular sobre biochips (véase Wolf y col., 1997 y 1998). Para los cribados en masa, y especialmente para los procedimientos de alto rendimiento para la detección y medición de interacciones entre receptores de membrana y ligandos, resulta especialmente adecuada la inmovilización de las células en biochips así como 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 levadura, es decir, especialmente células con diferentes segmentos de unión a ligando, 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 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. En este caso, los reactivos mencionados en el punto g) para la detección de la activación fenotípica de la ruta de transducción de señales ras o similar a ras también pueden comprender reactivos de solubilización adecuados que contienen, en especial, uno o varios agentes humectores o tensioactivos.

La solicitud 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 solicitud, 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 del receptor de membrana como se define en la reivindicación 1, la invención comprende tanto el fragmento con función de unión a ligando contenido en los receptores de membrana usados 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 del receptor de membrana heterólogo generalmente se realiza por expresión de una secuencia de ácido nucleico que codifica este receptor de membrana heterólogo 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 del receptor de membrana 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 del receptor de membrana. 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 solicitud 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 levadura con un receptor de membrana 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* mediante esta célula de levadura para detectar si un polipéptido o una proteína presenta una función de unión a ligando de un receptor.

En un sistema experimental de la solicitud usado actualmente con preferencia se usa como sistema celular que es inactivo en una ruta de transducción de señales ras o similar a ras 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”) (Broder y col., 1998). Una activación de la ruta de transducción de señales ras no funcional en este sistema, que en estas condiciones sólo puede ser provocada, como se ha descrito, a través de la translocación, realizable

a través de diferentes medidas, de una proteína o polipéptido efector que es capaz de activar esta ruta de transducción de señales ras a la membrana, se puede detectar porque las células de levadura pueden crecer a las temperaturas restrictivas (33 a 37°C, típicamente 36°C) independientemente de la presencia de una proteína GEF funcional. Como se ha explicado, la translocación de la proteína o polipéptido efector requiere la presencia de un ligando apropiado para el receptor de membrana previsto especialmente en la célula.

En este sistema se usa en especial una proteína de fusión que como segmento efector comprende una proteína Ras humana mutada (Ha-Ras, L61) que carece de la secuencia de farnesilación responsable de la localización de la proteína en la membrana.

Los ejemplos indicados a continuación a modo de ejemplo deben ilustrar con más detalle la invención.

1. Interacción del factor de crecimiento epidérmico (EGF) con el receptor de EGF (figura 3)

Material y métodos

Para la transformación de células cdc25-2 de *Saccharomyces cerevisiae* sirven los siguientes dos vectores:

1. Un vector de expresión para la expresión constitutiva de la proteína receptora de EGF humana.

2. Un vector de expresión inducible con un promotor inducible por galactosa (Gal 1) para la expresión de la proteína de fusión adaptador/efector formada por la región de la proteína Ras humana activa de forma constitutiva (Ha-ras, L61) que carece de la denominada caja CAAX (la señal de farnesilación para la localización en la membrana) (= segmento efector) y la región de la proteína Grb2 murina (= segmento adaptador).

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 NH_4SO_4 , 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).

Se realizan réplicas en placa con un plaqueador de réplicas de terciopelo. Después de la transformación con los vectores de expresión antes descritos, las células se siembran en placas con glucosa y se incuban entre 3 y 4 días a 25°C (temperatura no restrictiva). A continuación se inoculan diferentes medios de ensayo (con y sin EGF o con fragmentos proteicos sintéticos con actividad de ligando, véase Komoriya y col., 1984) con tres clones independientes, respectivamente, se incuban entre 2 y 3 días a 37°C y a continuación se detecta el crecimiento de las levaduras en los diferentes medios líquidos. Las levaduras que en el medio de galactosa crecen a 37°C sólo en presencia de EGF (cultivo de células fantasma de levadura sin pared celular) o sólo en presencia de [S-acetamidometil-Cys^{20,31}]-EGF-(20,31), un fragmento activo de EGF, indican una interacción ligando/receptor funcional.

2. Interacción de angiotensina con el receptor de angiotensina (figura 4)

Material y métodos

Para la transformación de células cdc25-2 de *Saccharomyces cerevisiae* sirven los siguientes vectores:

1. Un vector de expresión para la expresión constitutiva del receptor de angiotensina AT1A de rata (Condon y col., 1997).

2. Uno o varios vectores de expresión para la expresión constitutiva de las tres proteínas G $G\alpha_{13}$, $G\beta_1$ y $G\gamma_3$ de rata (Macrez-Leprêtre y col., 1997).

3. Un vector de expresión inducible (marcador de selección Ura) con un promotor inducible por galactosa (Gal1) para la expresión de la proteína de fusión adaptador/efector formada por la fosfolipasa C de fosfatidilcolina menos el dominio con la señal de localización en la membrana (= segmento adaptador) de miocitos vasculares de rata (Macrez-Leprêtre y col., 1996) y la región de la proteína Ras humana activa de forma constitutiva (Ha-ras, L61) que carece de la denominada caja CAAX (la señal de farnesilación para la localización en la membrana) (= segmento efector).

Crecimiento y manipulación de la levadura

Es válido lo mismo que en el ejemplo 1. Los medios de ensayo usados para los experimentos con el receptor de angiotensina se usaron más/menos angiotensina o más/menos L-162,313, un ligando funcional no proteico del receptor de angiotensina (Perlmann y col., 1995). Las levaduras que al cabo de 2 a 3 días crecen a 37°C en el medio de galactosa sólo en presencia de angiotensina (cultivo de células fantasma de levadura sin pared celular) o sólo en presencia del ligando no proteico L-162,313 indican una interacción ligando/receptor funcional.

Bibliografía

- Broder, Y.C., Katz, S. y Aronheim, A. (1998). *Curr. Biol.* 8, 1121-1124
- Conchon, S., Barrault, M.-B., Miserey, S., Corvol, P. y Clauser, E. (1997). *J. Biol. Chem.* 272, 25566-25572
- Current Protocols in Molecular Biology, 1991
- Dohlman, H.G., Thomer, J., Caron, M.G., Leifkowitz, R.J. (1991). *Ann. Rev. Biochem.* 60, 653-688
- Komoriya, A., Hortsch, M., Meyers, C., Smith, M., Kanety, H. y Schlessinger, J. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 1351-1355
- Leurs, R., Smit, M.J., Alewijnse, A.E. y Timmermann, H. (1998). *TIBS* 23, 418-422
- Macrez-Leprêtre, N., Morel, J.-L. y Mironneau, J. (1996) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 278, 468-475
- Macrez-Leprêtre, N., Kalkbrenner, F., Morel, J.-L., Schultz, G. y Mironneau, J. (1997). *J. Biol. Chem.* 272, 10095-10102
- Nishida, E. y Gotoh, Y. (1993). *Trends Biochem. Sci.* 18, 128-130
- Perlmann, S., Shambye, H.T., Rivero, R.A., Greenlee, W.J., Hjorth, S.A. y Schwartz, T.W. (1995). *J. Biol. Chem.* 270, 1493-1496
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989), *Molecular Cloning. A Laboratory Handbook*, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York
- Schlessinger, J. y Ulrich, A. (1992). *Neuron* 9, 383-391
- Schlessinger, J. (1993). *Trends Biochem. Sciences* 18, 273-275
- Stahl, N. y Yancopoulos, G.D. (1993) *Cell* 74, 587-590
- Wolf, B., Kraus, M., Baumann, W., Brischwein, M., Ehret, R., Henning, T., Lehmann, M. y Schwinde, A. (1997). *BioTec* 6/97, 26-29
- *ibid* (1998). *BioTec* 1/98, 24-27

REIVINDICACIONES

1. Célula de levadura transformada que comprende un receptor de membrana heterólogo que comprende un segmento de unión a ligando, una señal de localización en la membrana y un segmento mediador, en la que sólo en caso de unión o, alternativamente, sólo en ausencia de unión de un ligando al segmento de unión a ligando se produce un cambio estructural con efectos sobre el segmento mediador de manera que a continuación se une una proteína o un polipéptido efector que es capaz de activar una ruta de señalización ras o similar a ras en la célula a un componente de la membrana, dado el caso a través de proteínas o polipéptidos adicionales (adaptadores), **caracterizada** porque la proteína o polipéptido efector que es capaz de activar una ruta de señalización ras o similar a ras está presente en forma de una proteína de fusión heteróloga formada por un segmento efector y una proteína o polipéptido adaptador que permite la unión al componente de la membrana, dado el caso a través de proteínas o polipéptidos adicionales (adaptadores), comprendiendo el segmento efector de la proteína de fusión la secuencia de una proteína Ras activa de forma constitutiva.

2. Célula de levadura transformada según la reivindicación 1, **caracterizada** porque el receptor de membrana heterólogo es un receptor transmembrana, un receptor acoplado a enzima, un receptor acoplado a proteína G, un receptor con 7 dominios transmembrana o un receptor olfativo (“Odour Receptor” u “Olfactorial Receptor”).

3. Célula de levadura transformada según la reivindicación 1, **caracterizada** porque el segmento de unión a ligando deriva por mutación de un segmento de unión a ligando de un receptor presente en la naturaleza o es un segmento de unión a ligando sintético generado por modelado molecular.

4. Célula de levadura transformada según la reivindicación 3, **caracterizada** porque el segmento de unión a ligando de un receptor presente en la naturaleza es el segmento de unión a ligando de un receptor transmembrana, un receptor acoplado a proteína G, un receptor con 7 dominios transmembrana, un receptor olfativo (“Odour Receptor” u “Olfactorial Receptor”) o un receptor nuclear.

5. Célula de levadura transformada según la reivindicación 3, **caracterizada** porque la mutación es una sustitución, delección, inserción y/o modificación de uno o varios aminoácidos o grupos de aminoácidos.

6. Célula de levadura transformada según una de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizada** porque el segmento mediador es capaz de unirse, como consecuencia de la unión de ligando o, alternativamente, en ausencia de unión de ligando al segmento de unión a ligando, a una o varias proteínas adaptadoras a través de las cuales la proteína o polipéptido efector que es capaz de activar una ruta de señalización ras o similar a ras en la célula se puede unir al segmento mediador en forma de una proteína de fusión heteróloga formada por un segmento efector y un segmento proteico o polipeptídico adaptador que permite la unión al componente de la membrana a través de una o varias de las proteínas adaptadoras.

7. Célula de levadura transformada según la reivindicación 6, **caracterizada** porque el segmento mediador comprende la región citoplasmática del EGFR (“epidermal growth factor receptor”, receptor del factor de crecimiento epidérmico) o proviene de ésta.

8. Célula de levadura transformada según una de las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizada** porque la célula de levadura es una célula de levadura sin pared celular.

9. Célula de levadura transformada según una de las reivindicaciones 1 a 8, **caracterizada** porque el receptor de membrana heterólogo es necesario para la activación de una ruta de señalización ras o similar a ras en la célula de levadura transformada.

10. Ensayo *in vivo* para la detección de la presencia de un ligando para un segmento de unión a ligando de un receptor en una muestra que se ha de analizar respecto al ligando, **caracterizado** por los siguientes pasos:

(a) Poner en contacto la muestra con las células de levadura transformadas según la reivindicación 9 en unas condiciones en las que, en ausencia del receptor de membrana heterólogo, no se pueda activar una ruta de señalización ras o similar a ras en la célula, conteniendo el receptor de membrana heterólogo el segmento de unión a ligando mencionado y siendo la proteína o polipéptido efector, cuya unión a un componente de membrana depende de la unión o, alternativamente, de la ausencia de unión de un ligando al segmento de unión a ligando del receptor de membrana heterólogo como se ha definido en la reivindicación 1, capaz de activar esta ruta de señalización ras o similar a ras,

(b) analizar si se ha producido una activación de la ruta de señalización ras o similar a ras.

(c) indicando la detección de la activación de la ruta de señalización ras o similar a ras, en el caso en el que la unión de la proteína o polipéptido efector depende de la unión de un ligando al segmento de unión a ligando del receptor de membrana heterólogo, la ausencia de un ligando o de un segmento de unión a ligando de un receptor en la muestra,

y estudiándose, en el caso en el que la unión de la proteína o polipéptido efector depende de la ausencia de unión de un ligando al segmento de unión a ligando del receptor de membrana heterólogo, las células usadas en el paso (a)

respecto a la activación de la ruta de señalización ras o similar a ras en ausencia de la muestra y en unas condiciones en las que en ausencia del receptor de membrana heterólogo no se pueda activar la ruta de señalización ras o similar a ras en la célula de levadura transformada,

- 5 indicando la detección de la activación de la ruta de señalización ras o similar a ras en ausencia de la muestra y la inactividad de la ruta de señalización ras o similar a ras en presencia de la muestra la presencia de un ligando para el segmento de unión a ligando de un receptor en la muestra.

10 11. Ensayo según la reivindicación 10, **caracterizado** porque la sustancia de ensayo es (a) una sustancia presente en la naturaleza o (b) una sustancia no presente en la naturaleza.

15 12. Ensayo según la reivindicación 11, **caracterizado** porque la sustancia presente en la naturaleza es una sustancia odorífera, una sustancia saporífera, un péptido, una hormona peptídica, una proteína, un factor de crecimiento, un neurotransmisor, una hormona no proteica ni peptídica y/o una vitamina y porque la sustancia no presente en la naturaleza es un derivado sintético de un ligando natural o una sustancia tóxica.

13. Procedimiento de cribado para ligandos desconocidos de un receptor determinado, **caracterizado** porque para el cribado se usa un procedimiento de ensayo según la reivindicación 10.

20 14. Ensayo *in vivo* para determinar si un compuesto es capaz de modificar la actividad de unión de un segmento de unión a ligando de un receptor frente a un ligando, **caracterizado** por los siguientes pasos:

25 (a) Poner en contacto el ligando con las células de levadura transformadas según la reivindicación 9 en presencia del compuesto y en unas condiciones en las que, en ausencia del receptor de membrana heterólogo, no se pueda activar la ruta de señalización ras o similar a ras en la célula, conteniendo el receptor de membrana heterólogo el segmento de unión a ligando mencionado y siendo la proteína o polipéptido efector, cuya unión a un componente de membrana depende de la unión o, alternativamente, de la ausencia de unión de un ligando al segmento de unión a ligando del receptor de membrana heterólogo como se ha definido en la reivindicación 1, capaz de activar esta ruta de señalización ras o similar a ras,

30 (b) analizar si y, dado el caso, en qué medida se ha efectuado una activación de la ruta de señalización ras o similar a ras,

35 (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.

15. Ensayo *in vivo* para determinar si un polipéptido o una proteína presenta una función de unión a ligando de un receptor, **caracterizado** por los siguientes pasos:

40 (a) Poner en contacto las células de levadura transformadas según la reivindicación 9 con el ligando en unas condiciones en las que, en ausencia del receptor de membrana heterólogo como se ha definido en la reivindicación 1, no se pueda activar una ruta de señalización ras o similar a ras en las células, comprendiendo o constando el segmento de unión a ligando del receptor de membrana heterólogo del polipéptido o proteína que se ha de estudiar y siendo la proteína o polipéptido efector, cuya unión a un componente de membrana depende de la unión o, alternativamente, de la ausencia de unión de un ligando al segmento de unión a ligando del receptor de membrana heterólogo, capaz de activar esta ruta de señalización ras o similar a ras,

(b) analizar si se ha producido una activación de la ruta de señalización ras o similar a ras,

50 indicando la detección de la activación de la ruta de señalización ras o similar a ras, en el caso en el que la unión de la proteína o polipéptido efector depende de la unión de un ligando al segmento de unión a ligando del receptor de membrana heterólogo, que el segmento de unión a ligando del receptor de membrana heterólogo y, por consiguiente, el polipéptido o proteína que se ha de estudiar presenta una función de unión a ligando de un receptor y

55 estudiándose, en el caso en el que la unión de la proteína o polipéptido efector depende de la ausencia de unión de un ligando al segmento de unión a ligando del receptor de membrana heterólogo, las células usadas en el paso (a) respecto a la activación de la ruta de señalización ras o similar a ras en ausencia de ligando y en unas condiciones en las que, en ausencia del receptor de membrana heterólogo, no se pueda activar la ruta de señalización ras o similar a ras en la célula de levadura transformada,

60 indicando la detección de la activación de la ruta de señalización ras o similar a ras en ausencia del ligando y la inactividad de la ruta de señalización ras o similar a ras en presencia del ligando que el segmento de unión a ligando del receptor de membrana heterólogo y, por consiguiente, el polipéptido o proteína que se ha de estudiar presenta una función de unión a ligando de un receptor.

65

16. Kit para el uso en un ensayo según una de las reivindicaciones 10 a 14, que comprende los componentes (a), (b) y (c) indicados a continuación:

(a) Células de levadura en las que al menos en determinadas condiciones no se puede activar una ruta de señalización ras o similar a ras,

(b) un vector de ácido nucleico que comprende en una disposición adecuada:

- un segmento de ADN que codifica una señal de localización en la membrana de un receptor de membrana heterólogo como se ha definido en la reivindicación 1;
- un segmento de ADN que codifica un segmento mediador de un receptor de membrana heterólogo como se ha definido en la reivindicación 1 y
- un sitio de inserción dispuesto adecuadamente para la inserción funcional de una secuencia de ADN que codifica un segmento de unión a ligando como se ha definido en la reivindicación 1,

comprendiendo el vector de ácido nucleico, tras la inserción de una secuencia de ADN para el segmento de unión a ligando, un gen completo expresable para un receptor de membrana heterólogo como se ha definido en la reivindicación 1 y siendo la proteína o polipéptido efector, cuya unión a un componente de membrana depende de la unión o, alternativamente, de la ausencia de unión de un ligando al segmento de unión a ligando del receptor de membrana heterólogo, capaz de activar la ruta de señalización ras o similar a ras inactiva en las células de levadura mencionadas en el punto (a),

(c) un vector de ácido nucleico en el que está insertada de forma que se pueda expresar una secuencia de ADN que codifica la proteína o polipéptido efector que en el caso de una unión de ligando o, alternativamente, en ausencia de unión de ligando al segmento de unión a ligando del receptor de membrana heterólogo se puede unir a un componente de la membrana, dado el caso a través de proteínas o polipéptidos adicionales (adaptadores), y que está presente en forma de una proteína de fusión heteróloga formada por un segmento efector y una proteína o polipéptido adaptador que permite la unión al componente de la membrana, dado el caso a través de proteínas o polipéptidos adicionales (adaptadores).

17. Kit para el uso en un ensayo según la reivindicación 15, que comprende los componentes (a), (b) y (c) indicados a continuación:

(a) Células de levadura en las que al menos en determinadas condiciones no se puede activar una ruta de señalización ras o similar a ras,

(b) un vector de ácido nucleico que comprende en una disposición adecuada:

- un segmento de ADN que codifica una señal de localización en la membrana de un receptor de membrana heterólogo como se ha definido en la reivindicación 1;
- un segmento de ADN que codifica un segmento mediador de un receptor de membrana heterólogo como se ha definido en la reivindicación 1 y
- un sitio de inserción dispuesto adecuadamente para la inserción funcional de una secuencia de ADN que codifica un polipéptido o una proteína que se ha de estudiar respecto a una función de unión a ligando de un receptor,

comprendiendo el vector de ácido nucleico, tras la inserción de una secuencia de ADN para el segmento de unión a ligando, un gen completo expresable para un receptor de membrana heterólogo y siendo la proteína o polipéptido efector, cuya unión a un componente de membrana depende de la unión o, alternativamente, de la ausencia de unión de un ligando al segmento de unión a ligando del receptor de membrana heterólogo formado por el polipéptido o la proteína que se ha de estudiar respecto a una función de unión a ligando de un receptor, capaz de activar la ruta de señalización ras o similar a ras inactiva en las células de levadura mencionadas en el punto (a);

(c) un vector de ácido nucleico en el que está insertada de forma que se pueda expresar una secuencia de ADN que codifica la proteína o polipéptido efector que en el caso de una unión de ligando o, alternativamente, en ausencia de unión de ligando al segmento de unión a ligando del receptor de membrana heterólogo se puede unir a un componente de la membrana, dado el caso a través de proteínas o polipéptidos adicionales (adaptadores), y que está presente en forma de una proteína de fusión heteróloga formada por un segmento efector y una proteína o polipéptido adaptador que permite la unión al componente de la membrana, dado el caso a través de proteínas o polipéptidos adicionales (adaptadores).

18. Kit según una de las reivindicaciones 16 ó 17, **caracterizado** porque comprende adicionalmente un vector de ácido nucleico en el que está insertada de forma que se pueda expresar una secuencia de ADN que codifica al menos una proteína adaptadora a través de la cual la proteína o polipéptido efector se puede unir a un componente de la

membrana en caso de unión o, alternativamente, en ausencia de unión de un ligando al segmento de unión a ligando del receptor de membrana heterólogo.

19. Kit según una de las reivindicaciones 16 a 18, **caracterizado** porque contiene 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 o similar a ras especial cuya activación ha de detectarse mediante el ensayo, un promotor mínimo y un sitio de inserción, dispuesto adecuadamente para la expresión regulada por el promotor mínimo, para la inserción de un gen reportero, activándose el promotor mínimo como consecuencia de una unión del factor de transcripción activado a su sitio de unión.

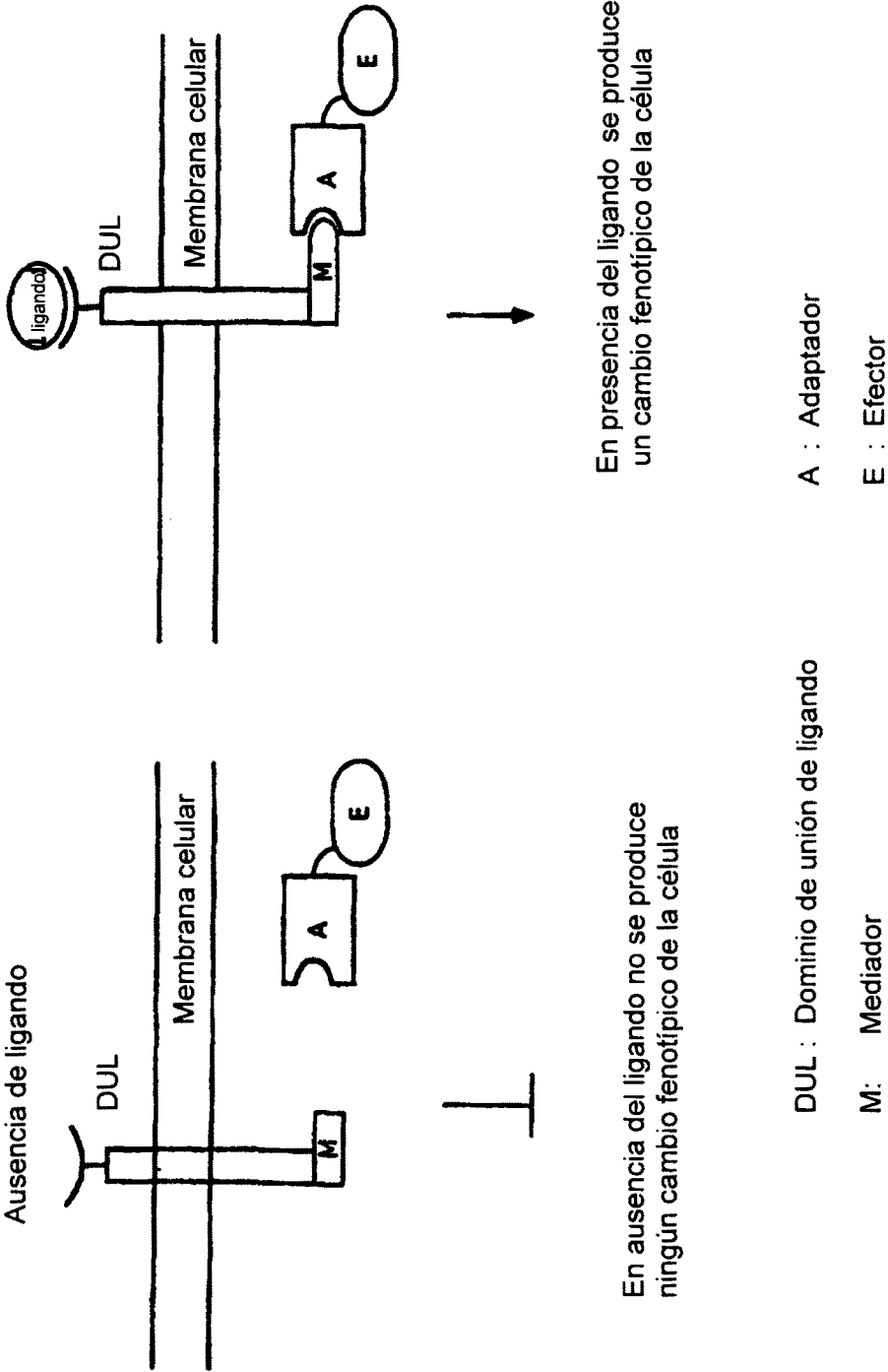
20. Procedimiento para la identificación de polipéptidos o proteínas que presentan una función de unión a ligando de un receptor, que comprende:

- la preparación de una célula de levadura transformada según la reivindicación 1 con un receptor de membrana heterólogo 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

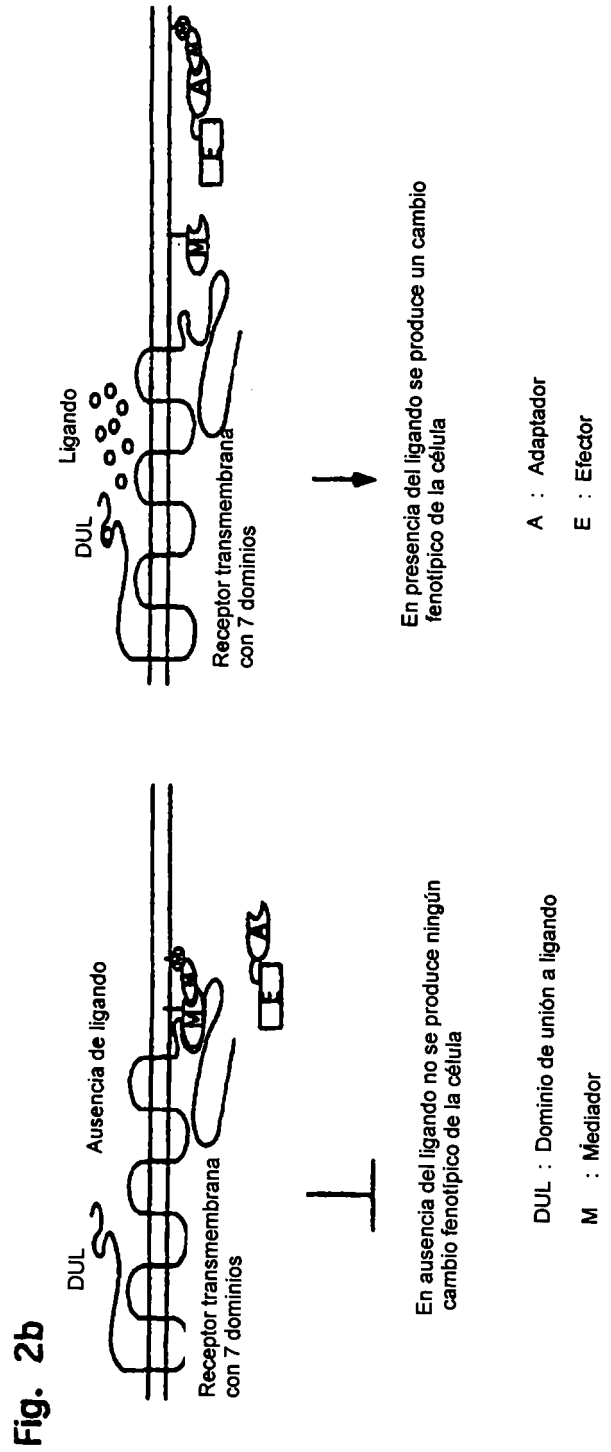
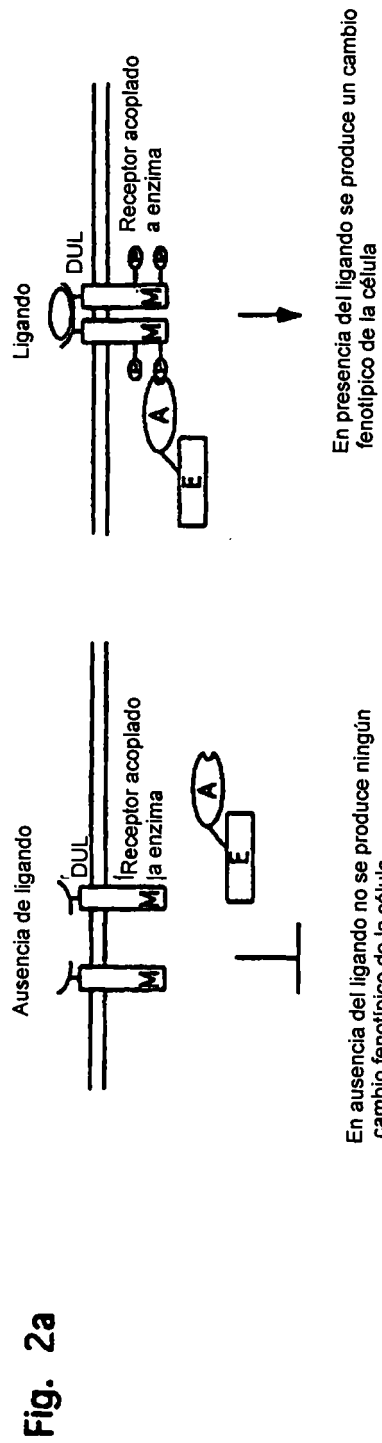
- la realización de un procedimiento de ensayo *in vivo* mediante esta célula de levadura transformada para detectar si un polipéptido o una proteína presenta una función de unión a ligando de un receptor según la reivindicación 15.

Representación esquemática de la detección de una interacción ligando / receptor de membrana

Fig. 1

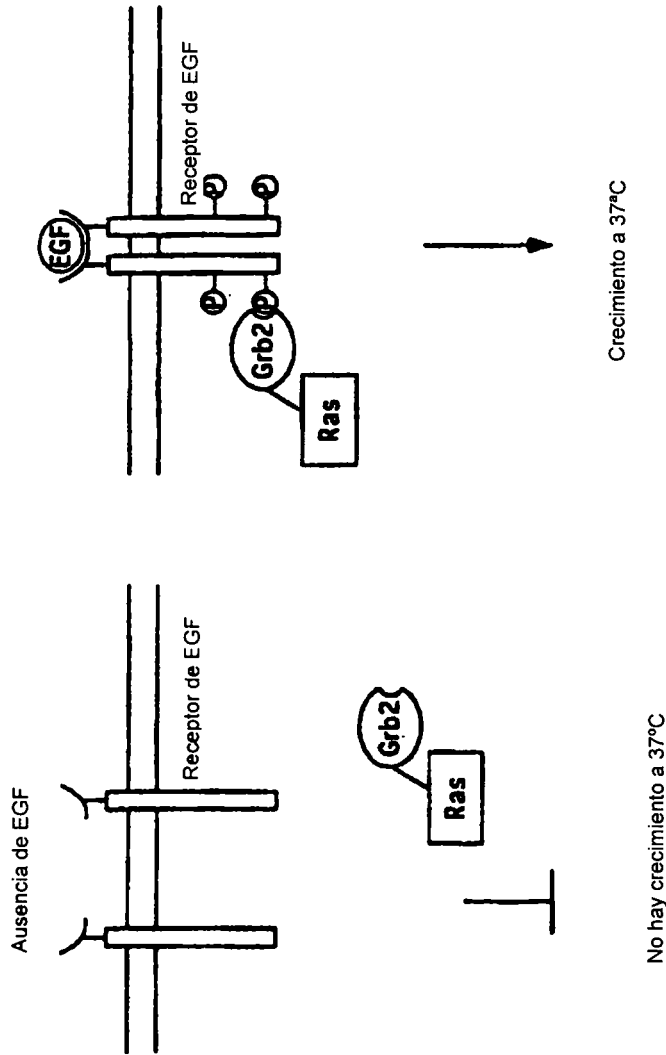


Representación esquemática de una interacción ligando/ receptor de membrana de un receptor acoplado a enzima o de un receptor acoplado a proteína G



Representación esquemática de la detección de la interacción de EGF con el receptor de EGF

Fig. 3



Representación esquemática de la detección de la interacción entre angiotensina y el receptor de angiotensina 1a

Fig. 4

