

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 952 996**

51 Int. Cl.:

G01N 33/50 (2006.01)

C07K 14/715 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.02.2018** **PCT/EP2018/052944**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.08.2018** **WO18141987**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.02.2018** **E 18702708 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.06.2023** **EP 3577456**

54 Título: **Polipéptido de fusión fluorescente capaz de detectar la fosforilación de receptores de membrana celular por GRK (cinasas receptoras de proteína G) y/o tirosina cinasas receptoras (RTK)**

30 Prioridad:

06.02.2017 EP 17382049

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

07.11.2023

73 Titular/es:

**INNOVATIVE TECHNOLOGIES IN BIOLOGICAL
SYSTEMS SL (100.0%)**

**Parque Tecnológico de Bizkaia, Edificio 502
Planta 1**

48160 Derio - Bizkaia, ES

72 Inventor/es:

**VILLACE LOZANO, PATRICIA;
MELLA LOPEZ, ROSA MARIA;
KORTAZAR ZABALLA, DANIEL;
GAMIZ MATA, JORGE y
SALADO POGONZA, AIDA CLARISA**

74 Agente/Representante:

BERTRÁN VALLS, Silvia

ES 2 952 996 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Polipéptido de fusión fluorescente capaz de detectar la fosforilación de receptores de membrana celular por GRK (quinasas receptoras de proteína G) y/o tirosina cinasas receptoras (RTK)

Campo de la invención

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

Antecedentes de la invención

La transferencia de energía de resonancia de bioluminiscencia (BRET) es una técnica potente y cada vez más popular para estudiar las interacciones proteína-proteína en células vivas y en tiempo real. En particular, ha habido un interés considerable en la capacidad de monitorizar las interacciones entre los receptores acoplados a proteína G (GPCR) y las proteínas que sirven como reguladores clave de la función receptora, tales como la beta-arrestina. La metodología de BRET implica la coexpresión heteróloga de proteínas fusionadas genéticamente que unen una proteína de interés (por ejemplo, un GPCR) a una enzima donadora bioluminiscente y una segunda proteína de interés (por ejemplo, beta-arrestina) a un fluoróforo aceptor. Si las proteínas de fusión están muy próximas, la energía de resonancia se transferirá de la molécula donadora a la aceptor y la fluorescencia posterior del aceptor puede detectarse a una longitud de onda característica. Por tanto, tal fluorescencia es indicativa de las proteínas de interés unidas al donador y al aceptor que interactúan directamente o como parte de un complejo. Además de monitorizar las interacciones proteína-proteína para dilucidar la función celular, BRET también tiene el potencial de convertirse en una técnica importante para el cribado de alto rendimiento de células vivas para fármacos que seleccionan como diana los GPCR, utilizando interacciones inducidas por ligando con beta-arrestinas.

Sin embargo, estos tipos de biosensores dependen en gran medida de la distancia entre (por ejemplo, <10 nm para CFP/YFP) y la orientación relativa del fluoróforo donador y aceptor. Además, los biosensores basados en BRET o FRET en el contexto de métodos de cribado de alto contenido requieren de un equipo de detección de al menos cuatro filtros, dos para la excitación y dos para la emisión. Además, debido a la baja intensidad de la señal de detección, el intervalo de la señal de detección y la sensibilidad de cribado son bajos. Por último, el uso de más de una señal de emisión de fluorescencia requiere el uso de más algoritmos para analizar correctamente la señal final.

Por tanto, todavía existe la necesidad de desarrollar métodos o productos mejorados para la medición en tiempo real de interacciones proteína-proteína en células vivas tales como las interacciones entre receptores acoplados a proteína G (GPCR) y proteínas que sirven como reguladores clave de la función receptora, tales como la beta-arrestina.

Breve descripción de la invención

La presente invención se enfrenta al problema de proporcionar herramientas de localización precisa, alto intervalo dinámico y la menor perturbación posible de la fisiología celular que sean capaces de monitorizar una variación en la translocación de GRK (quinasas receptoras de proteína G) y/o beta-arrestina o tirosina cinasas receptoras (RTK) desde el citoplasma celular hasta la membrana citoplásmica celular *in vivo* mediante el uso de cribado de alto contenido (HCS) en sistemas basados en células, en las que estas herramientas no tienen las desventajas de los biosensores basados en FRET.

Para resolver el problema anterior, los autores de la presente invención diseñaron un nuevo polipéptido de fusión fluorescente que comprende un péptido de localización en la membrana, un péptido capaz de unir receptores de proteína G o tirosina tras la fosforilación de estos receptores por GRK o RTK, un péptido de vesicularización y un péptido fluorescente. Este biosensor está formado por dos péptidos dirigidos a dos compartimentos celulares diferentes, permitiendo la detección de la translocación de GRK (quinasas receptoras de proteína G) y/o beta-arrestina o tirosina cinasas receptoras (RTK) desde el citoplasma celular hasta la membrana citoplásmica celular *in vivo* monitorizando la distribución del polipéptido fluorescente dentro del citoplasma celular. En este sentido, la translocación de biosensores dentro de la célula se deberá a un cambio en su conformación 3D que oculta o expone las señales de ubicación en ambos extremos del polipéptido desencadenadas por la unión del péptido capaz de unir receptores de proteína G o tirosina tras la fosforilación de estos receptores a los receptores de proteína G o tirosina fosforilados.

Breve descripción de las figuras

Los dibujos adjuntos, que se incorporan en y constituyen una parte de esta memoria descriptiva, ilustran diversas realizaciones y junto con la descripción ilustran las composiciones y los métodos dados a conocer.

Figura 1. Visión general del aumento en la fluorescencia de la línea celular "NK1-biosensor β -ARRNomad rojo". (A) Control negativo. (B) Células estimuladas con sustancia P 1 μ M. (C) Curva dosis-respuesta.

Figura 2. Análisis de imágenes de la línea celular “NK1-biosensor β -ARRNomad rojo”. (A) Control negativo. (B) Células estimuladas con sustancia P 1 μ M. (C) Curva dosis-respuesta.

5 Figura 3. Ensayo de inhibición de la línea celular “NK1-biosensor β -ARRNomad rojo”. (A) Control negativo. (B) Células estimuladas con sustancia P 1 μ M. (C) Células inhibidas con L733,060. (C) Gráfico de inhibición.

10 Figura 4. Visión general del aumento en la fluorescencia de “receptor de EP₄-biosensor $\text{Arrestina}^{\text{Nomad}}$ rojo” en la línea celular HEK293. (A) Control negativo. (B) Células estimuladas con PGE₂ 10 μ M. (C) Curva dosis-respuesta. CE_{50} de PGE₂= $8,64 \times 10^{-9}$ M; $Z' = 0,67$

15 Figura 5. Análisis de imágenes de “PAR2-biosensor $\text{Arres-Ca}^{2+}\text{Nomad}$ ” múltiple de Ca^{2+} -arrestina en la línea celular U2OS. (A) Visión general del aumento en la fluorescencia de biosensor $\text{Ca}^{2+}\text{Nomad}$ verde (panel izquierdo), biosensor $\text{Arrestina}^{\text{Nomad}}$ rojo (panel central) y fusión (panel derecho) (B) Curvas dosis-respuesta de cada uno de los biosensores con dos agonistas diferentes del receptor PAR2.

20 Figura 6. Cribado de una biblioteca de 490 compuestos usando la línea celular U2OS NK1R- $\text{Arrestina}^{\text{Nomad}}$. Datos representativos del número de vesículas por célula normalizado con respecto al control. El control negativo (DMSO) se representa en blanco y el control positivo (sustancia P 10 μ M) en verde.

Figura 7. Compuestos positivos. Los compuestos que muestran un aumento en la activación de la ruta de la arrestina se representan en negro y el porcentaje de viabilidad celular se representa en blanco. El control positivo (sustancia P) se representa en puntos verdes y el control negativo (DMSO) se representa en blanco.

25 Figura 8. NomadKin. Localización en la membrana de biosensor NomadKin en la línea celular U2OS.

Figura 9. Ensayo de inmunofluorescencia con anticuerpo anti-Tac de “NTSR1-biosensor $\text{Arrestina}^{\text{Nomad}}$ ”. El biosensor $\text{Arrestina}^{\text{Nomad}}$ está situado en la membrana plasmática en condiciones basales (panel superior), después de la adición del agonista (NTS, 1 μ M) puede observarse una relocalización del biosensor desde la membrana plasmática hasta las rutas de tráfico de vesículas (panel inferior).

Descripción detallada de la invención

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

Definiciones

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

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

50 Tal como se usa en el presente documento, se entiende que el término “péptido capaz de unir receptores de proteína G o tirosina tras la fosforilación de estos receptores por GRK o RTK” significa un dominio de péptido o proteína que tiene la capacidad de interactuar con los receptores de proteína G o tirosina sólo cuando estos están fosforilados. Un ejemplo claro de tal péptido es el péptido de unión a receptores fosforilados de b-arrestina de SEQ ID 2.

55 Cabe destacar que la secuencia de nucleótidos que codifica para el péptido de unión a receptores fosforilados de SEQ ID NO 2 es la siguiente:

ES 2 952 996 T3

(SEQ ID NO 1)

atggacagct acctgctgat gtggggcctg ctgaccttca tcatgggtgcc cggctgccag 60

gccgagctgt gcgacgacga cccccctgag atccccacg ccacctcaa agccatggcc 120

tacaaagaag gcaccatgct gaactgcgag tgcaagcggg gcttccggcg gatcaagagc 180

ggcagcctgt acatgctgtg caccggcaac agcagccaca gcagctggga caaccagtgc 240

cagtgcacca gcagcgccac ccggaacacc accaaacagg tcacaccca gcccgaggaa 300

cagaaagagc gcaagaccac cgagatgcag agcccatgc agcccgaggga ccaggcctct 360

ctgcccggcc actgcagaga gccccacct tgggagaacg aggccaccga gcggatctac 420

cacttcgtgg tcggacagat ggtgtactac cagtgcgtgc agggctaccg ggcctgcac 480

agaggacctg ccgagagcgt gtgcaagatg acccacggca agaccgggtg gaccagccc 540

cagctgatct gcaccggcga gatggaaacc agccagttcc ccggcgagga aaagccccag 600

gccagccctg agggcagacc cgagagcgag acaagctgcc tggtgacaac caccgacttc 660

ES 2 952 996 T3

cagatccaga ccgagatggc cgccacaatg gaaacctcca tcttcaccac cgacctgcag 720

gtggccgtgg ccggctgcgt gttcctgctg atctctgtgc tgctcctgag cggcctgacc 780

tggcagcggg gacagagaaa gagcggccgg accatcggga tccaactagt tgcgaccag 840

cagcagcagc agcaggggaat tctgcagtcg acggtacca tggtaggtga ggatagcgag 900

ctgatcaccg agaacatgca catgaaactg tacatggagg gcacctgaa caaccaccac 960

ttaagtgc catccgagg cgaaggcaag ccctacgagg gcaccagac catgaagatc 1020

aagtggtcg agggcgccc tctcccttc gccttcgaca tctggctac cagcttcag 1080

tacggcagca aagcctcat caaccacacc caggcatcc ccgacttct taagcagtc 1140

ttcctgagg gcttcacatg ggagagaatc accacatacg aagacggggg cgtgctgacc 1200

gtacccagg acaccagcct ccagaacggc tgcctcatct acaacgtcaa gatcaacggg 1260

gtgaactcc catccaacgg ccctgtgatg cagaagaaa cactcggctg ggaggccagc 1320

accgatgac tgtacccgc tgacagcggc ctgagaggcc atggccagat ggccctgaag 1380

ctcgtggcg ggggctacct gcactgctcc ctcaagacca catacagatc caagaaacc 1440

gctaagaacc tcaagatgc cggttcac ttcgtggacc acagactga aagaatcaag 1500

gaggccgaca aagagaccta cgtcgagcag cagagatgg ctgtggcaa gtactgcgac 1560

ctccctagca aactggggca cagcagatct cgagtaggcg gcggcggcta tggccgtgaa 1620

gacctgatg tgctgggctt gtcctccgc aaagacctg gcggcctcat tgaatttggc 1680

ggcggccggc ttcggctgaa g 1701

(SEQ ID NO 2):

Met Asp Ser Tyr Leu Leu Met Trp Gly Leu Leu Thr Phe Ile Met Val

Pro Gly Cys Gln Ala Glu Leu Cys Asp Asp Asp Pro Pro Glu Ile Pro

His Ala Thr Phe Lys Ala Met Ala Tyr Lys Glu Gly Thr Met Leu Asn

Cys Glu Cys Lys Arg Gly Phe Arg Arg Ile Lys Ser Gly Ser Leu Tyr

Met Leu Cys Thr Gly Asn Ser Ser His Ser Ser Trp Asp Asn Gln Cys

Gln Cys Thr Ser Ser Ala Thr Arg Asn Thr Thr Lys Gln Val Thr Pro

Gln Pro Glu Glu Gln Lys Glu Arg Lys Thr Thr Glu Met Gln Ser Pro

Met Gln Pro Val Asp Gln Ala Ser Leu Pro Gly His Cys Arg Glu Pro

Pro Pro Trp Glu Asn Glu Ala Thr Glu Arg Ile Tyr His Phe Val Val

Gly Gln Met Val Tyr Tyr Gln Cys Val Gln Gly Tyr Arg Ala Leu His

Arg Gly Pro Ala Glu Ser Val Cys Lys Met Thr His Gly Lys Thr Arg

Trp Thr Gln Pro Gln Leu Ile Cys Thr Gly Glu Met Glu Thr Ser Gln

Phe Pro Gly Glu Glu Lys Pro Gln Ala Ser Pro Glu Gly Arg Pro Glu

Ser Glu Thr Ser Cys Leu Val Thr Thr Thr Asp Phe Gln Ile Gln Thr

Glu Met Ala Ala Thr Met Glu Thr Ser Ile Phe Thr Thr Asp Leu Gln

Val Ala Val Ala Gly Cys Val Phe Leu Leu Ile Ser Val Leu Leu Leu

Ser Gly Leu Thr Trp Gln Arg Arg Gln Arg Lys Ser Gly Arg Thr Ile

Gly Ile Gln Leu Val Val Asp Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gly Ile Leu

Gln Ser Thr Val Pro Met Val Gly Glu Asp Ser Glu Leu Ile Thr Glu

Asn Met His Met Lys Leu Tyr Met Glu Gly Thr Val Asn Asn His His

Phe Lys Cys Thr Ser Glu Gly Glu Gly Lys Pro Tyr Glu Gly Thr Gln

Thr Met Lys Ile Lys Val Val Glu Gly Gly Pro Leu Pro Phe Ala Phe

Asp Ile Leu Ala Thr Ser Phe Met Tyr Gly Ser Lys Ala Phe Ile Asn

His Thr Gln Gly Ile Pro Asp Phe Phe Lys Gln Ser Phe Pro Glu Gly

Phe Thr Trp Glu Arg Ile Thr Thr Tyr Glu Asp Gly Gly Val Leu Thr

Ala Thr Gln Asp Thr Ser Leu Gln Asn Gly Cys Leu Ile Tyr Asn Val

Lys Ile Asn Gly Val Asn Phe Pro Ser Asn Gly Pro Val Met Gln Lys

Lys Thr Leu Gly Trp Glu Ala Ser Thr Glu Met Leu Tyr Pro Ala Asp

Ser Gly Leu Arg Gly His Gly Gln Met Ala Leu Lys Leu Val Gly Gly

Gly Tyr Leu His Cys Ser Leu Lys Thr Thr Tyr Arg Ser Lys Lys Pro

Ala Lys Asn Leu Lys Met Pro Gly Phe His Phe Val Asp His Arg Leu

Glu Arg Ile Lys Glu Ala Asp Lys Glu Thr Tyr Val Glu Gln His Glu

Met Ala Val Ala Lys Tyr Cys Asp Leu Pro Ser Lys Leu Gly His Ser

Arg Ser Arg Val Gly Gly Gly Gly Tyr Gly Arg Glu Asp Leu Asp Val

Leu Gly Leu Ser Phe Arg Lys Asp Leu Gly Gly Leu Ile Glu Phe Gly

Gly Gly Arg Leu Arg Leu Lys

5 Tal como se usa en el presente documento, se entiende que el término "péptido de vesicularización" significa una cadena peptídica corta que dirige el transporte del polipéptido a las vesículas de retención. Preferiblemente tal péptido de vesicularización es el péptido clatrina y beta-adaptina de arrestina. Más preferiblemente, la secuencia peptídica para el péptido clatrina y beta-adaptina de arrestina es la siguiente (a continuación en el presente documento SEQ ID NO 4):

Tyr Gly Arg Glu Asp Leu Asp Val Leu Gly Leu Ser Phe Arg Lys Asp Leu Gly Gly Leu Ile Glu Phe

Gly Gly Gly Arg Leu Arg Leu Lys

10 Tal como se usa en el presente documento, se entiende que el término "péptido fluorescente" significa un péptido fluorescente que tiene capacidades fluorescentes. Los dominios de péptidos fluorescentes se caracterizan por tener

un espectro de excitación y un espectro de emisión específicos.

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

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

Tal como se usa en el presente documento, se entiende que el término “fármaco” significa una molécula que actúa posiblemente como agonista o antagonista o modulador de una ruta de señalización.

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

Descripción

La presente invención se enfrenta al problema de proporcionar herramientas de localización precisa, alto intervalo dinámico y la menor perturbación posible de la fisiología celular que sean capaces de monitorizar una variación en la translocación de GRK (quinasas receptoras de proteína G) y/o beta-arrestina o tirosina cinasas receptoras (RTK) desde el citoplasma celular hasta la membrana citoplásmica celular *in vivo* mediante el uso de cribado de alto contenido (HCS) en sistemas basados en células, en las que estas herramientas no tienen las desventajas de los biosensores basados en FRET.

Para resolver el problema anterior, los autores de la presente invención diseñaron un nuevo polipéptido de fusión fluorescente que comprende un péptido de localización en la membrana, un péptido capaz de unir receptores de proteína G o tirosina tras la fosforilación de estos receptores por GRK o RTK, un péptido de vesicularización y un péptido fluorescente. Este biosensor está formado por dos péptidos dirigidos a dos compartimentos celulares diferentes, permitiendo la detección de la translocación de GRK (quinasas receptoras de proteína G) y/o beta-arrestina o tirosina cinasas receptoras (RTK) desde el citoplasma celular hasta la membrana citoplásmica celular *in vivo* monitorizando la distribución del polipéptido fluorescente dentro del citoplasma celular. En este sentido, la translocación de biosensores dentro de la célula se deberá a un cambio en su conformación 3D que oculta o expone las señales de ubicación en ambos extremos del polipéptido desencadenadas por la unión del péptido capaz de unir receptores de proteína G o tirosina tras la fosforilación de estos receptores a los receptores de proteína G o tirosina fosforilados.

En el estado basal, el biosensor está situado en uno de los compartimentos; esto significa que el péptido de localización dirigido al otro compartimento celular se oculta por la conformación 3D. Cuando existe una translocación de GRK (quinasas receptoras de proteína G) y/o beta-arrestina o tirosina cinasas receptoras (RTK) desde el citoplasma celular hasta la membrana citoplásmica celular debido a una estimulación celular, el péptido capaz de unir receptores de proteína G o tirosina tras la fosforilación de estos receptores se une a los receptores de proteína G o tirosina fosforilados provocando un cambio conformacional en el biosensor. En este punto, se modifica la distribución espacial de los diferentes elementos estructurales en el biosensor y el péptido de vesicularización dirigido al otro compartimento celular se expone por la nueva conformación 3D de modo que todo el biosensor se transporta a su nueva ubicación en el nuevo compartimento celular. Todo este procedimiento puede trazarse en células vivas debido a la presencia de la proteína fluorescente en el biosensor.

Se observa además que los autores de la presente invención se dieron cuenta de que el orden de los péptidos dentro del polipéptido de fusión fluorescente mencionado anteriormente no podían colocarse de manera arbitraria dentro del polipéptido. Este es el caso puesto que después de numerosos experimentos los autores concluyeron que sólo una combinación de elementos proporcionaba el efecto técnico de transportar el biosensor al otro compartimento celular, tal combinación era:

a. el péptido de localización en la membrana está situado en el extremo N-terminal del polipéptido de fusión fluorescente y está unido físicamente, opcionalmente a través de un ligador, al péptido fluorescente, que a su vez está unido físicamente, opcionalmente a través de un ligador, al péptido capaz de unir receptores de proteína G o tirosina tras la fosforilación de estos receptores por GRK o RTK; y

b. el péptido capaz de unir receptores de proteína G o tirosina tras la fosforilación de estos receptores por GRK o RTK está unido físicamente, opcionalmente a través de un ligador, al péptido de vesicularización, que a su vez está situado en el extremo C-terminal del polipéptido de fusión fluorescente;

Los autores sometieron a prueba si tal biosensor que tiene la estructura anterior podría emplearse para detectar y cuantificar la translocación de beta-arrestina provocada por la sustancia P. Tal como se ilustra en los ejemplos divulgados en el presente documento, los autores de la presente invención construyeron un polipéptido de fusión

fluorescente, capaz de detectar y cuantificar beta-arrestina con éxito, que comprende el péptido de unión a receptores fosforilados de b-arrestina de SEQ ID 2. Sorprendentemente, los autores identificaron que usando como péptido de vesicularización el péptido clatrina y beta-adaptina de arrestina, la señal de detección era significativamente mejor.

Los resultados mostrados en los ejemplos y dibujos presentados en el presente documento mediante el uso del polipéptido de fusión anterior indican que un aumento en la translocación de beta-arrestina indujo un cambio conformacional en el biosensor que fomentó una redistribución del biosensor fluorescente. La actividad se calculó como un aumento de la granularidad de las células transfectadas con los biosensores de la invención. La redistribución de fluorescencia del biosensor se detectó mediante fluorescencia usando algoritmos de análisis de imágenes. Por consiguiente, las variaciones en la ubicación de la beta arrestina pueden monitorizarse a través de este procedimiento de "ocultación y exposición" de señales de ubicación y la localización final del biosensor.

Por tanto, un primer aspecto de la presente invención se refiere a un polipéptido de fusión fluorescente capaz de cambiar su localización dentro de la célula desde la membrana citoplásmica celular hasta las vesículas de retención, tras un aumento en la translocación de GRK (cinastas receptoras de proteína G) y/o beta-arrestina o tirosina cinastas receptoras (RTK) desde el citoplasma celular hasta la membrana citoplásmica celular, que comprende un péptido de localización en la membrana, un péptido capaz de unir receptores de proteína G o tirosina tras la fosforilación de estos receptores por GRK o RTK, un péptido de vesicularización y un péptido fluorescente, en el que:

a. el péptido de localización en la membrana está situado en el extremo N-terminal del polipéptido de fusión fluorescente y está unido físicamente, opcionalmente a través de un ligador, al péptido fluorescente, que a su vez está unido físicamente, opcionalmente a través de un ligador, al péptido capaz de unir receptores de proteína G o tirosina tras la fosforilación de estos receptores por GRK o RTK; y

b. el péptido capaz de unir receptores de proteína G o tirosina tras la fosforilación de estos receptores por GRK o RTK está unido físicamente, opcionalmente a través de un ligador, al péptido de vesicularización, que a su vez está situado en el extremo C-terminal del polipéptido de fusión fluorescente;

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

Preferiblemente, tal polipéptido de fusión fluorescente es capaz de cambiar su localización dentro de la célula desde la membrana citoplásmica celular hasta las vesículas de retención, tras un aumento en la translocación de GRK (cinastas receptoras de proteína G) y beta-arrestina desde el citoplasma celular hasta la membrana citoplásmica celular.

Más preferiblemente el polipéptido de fusión fluorescente del primer aspecto de la invención se caracteriza porque:

a. el péptido de localización en la membrana es el dominio extracelular del receptor de interleucina-2 de SEQ ID 3 o una variante que es al menos el 90 % homóloga a esta secuencia en toda la región basándose en la identidad de aminoácidos; y

b. el péptido de vesicularización es el péptido clatrina y beta-adaptina de arrestina.

La SEQ ID No 3 de aminoácidos es la siguiente:

Met Asp Ser Tyr Leu Leu Met Trp Gly Leu Leu Thr Phe Ile Met Val

Pro Gly Cys Gln Ala Glu Leu Cys Asp Asp Asp Pro Pro Glu Ile Pro

His Ala Thr Phe Lys Ala Met Ala Tyr Lys Glu Gly Thr Met Leu Asn

Cys Glu Cys Lys Arg Gly Phe Arg Arg Ile Lys Ser Gly Ser Leu Tyr

Met Leu Cys Thr Gly Asn Ser Ser His Ser Ser Trp Asp Asn Gln Cys

Gln Cys Thr Ser Ser Ala Thr Arg Asn Thr Thr Lys Gln Val Thr Pro

Gln Pro Glu Glu Gln Lys Glu Arg Lys Thr Thr Glu Met Gln Ser Pro

Met Gln Pro Val Asp Gln Ala Ser Leu Pro Gly His Cys Arg Glu Pro

Pro Pro Trp Glu Asn Glu Ala Thr Glu Arg Ile Tyr His Phe Val Val

Gly Gln Met Val Tyr Tyr Gln Cys Val Gln Gly Tyr Arg Ala Leu His

Arg Gly Pro Ala Glu Ser Val Cys Lys Met Thr His Gly Lys Thr Arg

Trp Thr Gln Pro Gln Leu Ile Cys Thr Gly Glu Met Glu Thr Ser Gln

Phe Pro Gly Glu Glu Lys Pro Gln Ala Ser Pro Glu Gly Arg Pro Glu

Ser Glu Thr Ser Cys Leu Val Thr Thr Thr Asp Phe Gln Ile Gln Thr

Glu Met Ala Ala Thr Met Glu Thr Ser Ile Phe Thr Thr Asp Leu Gln

Val Ala Val Ala Gly Cys Val Phe Leu Leu Ile Ser Val Leu Leu Leu

Ser Gly Leu Thr Trp Gln Arg Arg Gln Arg Lys Ser Gly Arg Thr Ile

5 Más preferiblemente el polipéptido de fusión fluorescente del primer aspecto de la invención se caracteriza porque:

- a. el péptido de localización en la membrana es el dominio extracelular del receptor de interleucina-2 de SEQ ID 3; y
- b. el péptido de vesicularización es el péptido clatrina y beta-adaptina de arrestina, preferiblemente de SEQ ID No 4.

10 Más preferiblemente el polipéptido de fusión fluorescente del primer aspecto de la invención se caracteriza porque:

- a. el péptido de localización en la membrana es el dominio extracelular del receptor de interleucina-2 de SEQ ID 3;
- b. el péptido de vesicularización es el péptido clatrina o beta-adaptina de arrestina, preferiblemente de SEQ ID No 4;
- y
- c. el péptido capaz de unir receptores de proteína G tras la fosforilación de estos receptores por GRK es el péptido

de unión a receptores fosforilados de b-arrestina de SEQ ID 2.

En aún otra realización preferida del primer aspecto de la invención, tal polipéptido es capaz de cambiar su localización dentro de la célula desde la membrana citoplásmica celular hasta las vesículas de retención, tras un aumento en la translocación de tirosina cinasas receptoras (RTK) desde el citoplasma celular hasta la membrana citoplásmica celular.

Más preferiblemente el polipéptido de fusión fluorescente de la realización preferida mencionada anteriormente de la invención (el biosensor capaz de detectar un aumento en la translocación de tirosina cinasas receptoras (RTK) desde el citoplasma celular hasta la membrana citoplásmica celular) se caracteriza porque:

a. el péptido de localización en la membrana es el dominio extracelular del receptor de interleucina-2 de SEQ ID 3 o una variante que es al menos el 90 % homóloga a esta secuencia en toda la región basándose en la identidad de aminoácidos; y

b. el péptido de vesicularización es el péptido clatrina y beta-adaptina de arrestina.

Más preferiblemente el polipéptido de fusión fluorescente de la realización preferida mencionada anteriormente de la invención (el biosensor capaz de detectar un aumento en la translocación de tirosina cinasas receptoras (RTK) desde el citoplasma celular hasta la membrana citoplásmica celular) se caracteriza porque:

a. el péptido de localización en la membrana es el dominio extracelular del receptor de interleucina-2 de SEQ ID 3; y

b. el péptido de vesicularización es el péptido clatrina y beta-adaptina de arrestina, preferiblemente de SEQ ID No 4.

Más preferiblemente el polipéptido de fusión fluorescente de la realización preferida mencionada anteriormente de la invención (el biosensor capaz de detectar un aumento en la translocación de tirosina cinasas receptoras (RTK) desde el citoplasma celular hasta la membrana citoplásmica celular) se caracteriza porque:

a. el péptido de localización en la membrana es el dominio extracelular del receptor de interleucina-2 de SEQ ID 3;

b. el péptido de vesicularización es el péptido clatrina y beta-adaptina de arrestina, preferiblemente de SEQ ID No 4; y

c. el péptido capaz de unir los receptores de proteína tirosina tras la fosforilación de estos receptores por RTK es un péptido capaz de reconocer la proteína tirosina receptora fosforilada.

Se observa que tal péptido capaz de reconocer la proteína tirosina receptora fosforilada puede comprender un dominio SH2 y/o un dominio diseñado *in silico*, siendo cualquiera de estos capaz de reconocer receptores de tirosina cinasa fosforilados. El experto en la técnica conoce bien tales dominios.

En otra realización preferida del primer aspecto de la invención, el polipéptido de fusión fluorescente puede seleccionarse de cualquiera de la siguiente lista de compuestos que consiste en GFP, YFP, turboGFP, turboRFP, turboRFP602 y turboFP650.

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

Un tercer aspecto de la invención se refiere a un biosensor que comprende el polipéptido de fusión tal como se define en el primer aspecto de la invención.

Un cuarto aspecto de la invención se refiere a una célula que comprende el polipéptido de fusión fluorescente tal como se define en el primer aspecto de la invención, en el que preferiblemente dicha célula es una línea celular U2OS (véanse los ejemplos).

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a varios usos para el polipéptido de fusión fluorescente tal como se define en el primer aspecto de la invención. Un primer uso del biosensor según la presente invención es para detectar y cuantificar compuestos capaces de la translocación de GRK (cinasas receptoras de proteína G) y/o beta-arrestina o tirosina cinasas receptoras (RTK) desde el citoplasma celular hasta la membrana citoplásmica celular incluyendo, pero sin limitarse a, la sustancia P. Tal como ya se ha indicado, la unión del péptido capaz de unir receptores de proteína G o tirosina tras la fosforilación de estos receptores se une a los receptores de proteína G o tirosina fosforilados, lo que da como resultado un cambio sustancial en la conformación espacial que conduce a un cambio en la localización de fluorescencia intracelular. Esta translocación de fluorescencia puede aprovecharse para la cuantificación de compuestos mediante fluorescencia. Además, todo este procedimiento puede trazarse en células vivas debido a la presencia de la proteína fluorescente en el biosensor.

El empleo del polipéptido de fusión fluorescente tal como se define en el primer aspecto de la invención implica además su uso como herramienta de cribado de fármacos.

Además, el polipéptido de fusión fluorescente tal como se define en el primer aspecto de la invención es útil en la práctica de esencialmente cualquier aplicación para la que se obtiene la lectura de la transducción del segundo mensajero. Tales aplicaciones se conocen bien en la técnica. Sin embargo, más aplicaciones a modo de ejemplo de la presente invención incluyen, pero no se limitan a:

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

En una realización preferida de la invención, el polipéptido de fusión fluorescente tal como se define en el primer aspecto de la invención puede usarse para generar líneas celulares estables que permiten estudiar los receptores acoplados a proteína G (GPCR), y la actividad de otras proteínas en células vivas. La translocación rápida del biosensor de la invención permite la cuantificación de GPCR y la estimulación de canales de iones.

El polipéptido de fusión fluorescente y el biosensor correspondiente de la presente invención pueden fabricarse mediante técnicas bien conocidas por los expertos en la técnica, pero a modo de ejemplo, pueden construirse de la siguiente manera. Las secuencias codificantes correspondientes al péptido de localización en la membrana, el péptido fluorescente, el péptido capaz unir receptores de proteína G o tirosina tras la fosforilación de estos receptores por GRK o RTK y el péptido de vesicularización pueden amplificarse fácilmente mediante PCR y clonarse en un plásmido lanzadera. Luego, estas secuencias codificantes pueden clonarse fácilmente en el plásmido de fusión final en el orden específico presentado en el presente documento usando los sitios de enzimas de restricción que flanquean cada secuencia.

Los siguientes ejemplos sirven simplemente para ilustrar la presente invención.

Ejemplos

Ejemplo 1. Materiales y métodos

Cultivo celular de células U2OS

Se hizo crecer una línea celular de osteosarcoma óseo humano (DSMZ), derivada de ATCC (n.º de catálogo HTB-96), en mezcla de nutrientes con medio de Eagle modificado por Dulbecco F-12 HAM (Sigma-Aldrich) complementada con suero bovino fetal al 10 % (Sigma-Aldrich), aminoácidos no esenciales MEM (Sigma-Aldrich), gentamicina (Sigma-Aldrich), geneticina 500 µg/ml (Sigma-Aldrich) y puomicina 10 µg/ml (Sigma) a 37 °C en una atmósfera humidificada complementada con el 5 % de CO₂.

Generación de línea celular estable recombinante

Se creó un plásmido de biosensor β-ARRNomad rojo clonando posteriormente el ADNc de Tac, ADNc de proteína turboFP602 (Evrogen), péptido de unión a receptores fosforilados de b-arrestina y el péptido de vesicularización (péptido clatrina y beta-adaptina de arrestina) en el vector CMV-ptNL resistente a la geneticina en el laboratorio de los presentes inventores. Se subclonó ADNc del receptor receptor de taquiquinina 1 (NK1) (cDNA.org) en un vector resistente a la puomicina, CMV-pPuro, diseñado en el laboratorio de los presentes inventores usando las enzimas de restricción NheI y XhoI.

Se confirmaron todas las clonaciones mediante secuenciación de ADN. Se transfectó el plásmido que contenía biosensor β-ARRNomad rojo en células U2OS usando Lipofectamine LTX (Invitrogen) y se seleccionaron células transfectadas positivas usando geneticina 500 µg/ml (Sigma-Aldrich), se transfectó el clon positivo denominado C1 con el plásmido resistente a la puomicina que contenía receptor de taquiquinina 1 (NK1-pPuro) y se seleccionaron

los clones positivos usando puromicina 10 µg/ml (Sigma-Aldrich) y geneticina 500 µg/ml (Sigma-Aldrich). Se obtuvieron clones resistentes mediante dilución límite. Luego se sometió a prueba una línea celular estable doble, denominada "línea celular NK1-biosensor β-ARRNomad rojo" usando sustancia P (Sigma-Aldrich) para determinar la respuesta funcional del biosensor β-ARRNomad rojo.

Desarrollo de los ensayos

Se sembraron células a 18.000 células/placa en placas de obtención de imágenes negras de 96 pocillos de fondo transparente (BD Biosciences) para ensayos de β-arrestina. Se trató una línea celular "NK1-biosensor β-ARRNomad rojo" con dilución 8 log (n=6) de sustancia P (Sigma-Aldrich) que oscilaba desde 0 hasta 1 µM en medio Opti-MEM (Gibco) durante 24 horas a 37 °C, el 5 % de CO₂, el 95 % de humedad relativa antes de la adquisición de datos.

Ensayo de intensidad de fluorescencia

Para las determinaciones de intensidad de fluorescencia, se midieron los cambios en la distribución del biosensor β-ARRNomad rojo usando el lector de microplacas "Synergy 2" (Biotek). Se retiró el medio Opti-MEM con los agonistas y se reemplazó por PBS 1X sin calcio ni magnesio (Sigma-Aldrich) antes de la adquisición de datos. Se adquirieron datos de turboFP602 con filtros de ex./em. 590/620.

Ensayo de obtención de imágenes

Se desarrolló la rutina de análisis de imágenes de la redistribución de biosensor β-ARRNomad rojo con una plataforma de imágenes automatizada de alto contenido BD Pathway 855 (BD Biosciences) usando algoritmos de análisis de imágenes con el software de obtención de imágenes biológicas Attovision (BD). Los filtros de excitación/emisión de rodamina usados para la adquisición de imágenes fueron 548/20 y 570LP. Se normalizó el número de vesículas del biosensor Nomad calculado como porcentaje de actividad en comparación con el control negativo (vehículo H₂O).

Ensayo de inhibición

Se sembraron células a 18.000 células/placa en placas de 96 pocillos para el ensayo de inhibición. Se trató conjuntamente la línea celular "NK1-biosensor β-ARRNomad rojo" con sustancia P 100 nM (Sigma-Aldrich) y dilución log de clorhidrato de L733,060 (Tocris) que oscilaba desde 100 pM hasta 3 µM en medio Opti-MEM (Gibco) durante 24 horas a 37 °C, el 5 % de CO₂, el 95 % de humedad relativa antes de la adquisición de datos.

Determinación de señal con respecto a fondo y factor Z'

Se calculó el parámetro de señal con respecto a fondo (S/B) como $\mu c^+ - \mu c^-$, y se calculó el factor Z' usando la siguiente fórmula: $Z' = 1 - [(3\sigma c^+ + 3\sigma c^-) / (\mu c^+ - \mu c^-)]$.

Ejemplo 1. Resultados

La línea celular "NK1-biosensor β-ARRNomad rojo" que expresa de manera estable biosensor β-ARRNomad rojo y receptor de neuroquinina 1 se ha diseñado para someter a ensayo compuestos o analizar su capacidad para modular el receptor NK1. Antes de la estimulación mediada por el agonista de interés, se localiza el biosensor fluorescente en la membrana celular, la unión de sustancia P al receptor de neuroquinina 1 conduce a un cambio en el plegamiento estructural de biosensor β-ARRNomad rojo que fomenta su reubicación celular en el tráfico vesicular de las células.

Ensayo de intensidad de fluorescencia

Se detectó el aumento en la fluorescencia y se analizó usando un lector de microplacas "Synergy 2" de Biotek. La CE₅₀ para la sustancia P era de aproximadamente $5,20 \times 10^{-9}$ M después de un tratamiento de 24 h con el agonista. Se validó el ensayo con un promedio de $Z' = 0,70 \pm 0,02$ (n=6).

Ensayo de obtención de imágenes

Se detectaron los procedimientos de activación y cambio de localización del biosensor β-ARRNomad rojo y se analizaron usando el dispositivo de obtención de imágenes biológicas de alto contenido "BD Pathway 855" de BD Biosciences. La CE₅₀ para la sustancia P fue de aproximadamente $2,99 \times 10^{-9}$ M después de un tratamiento de 24 h con el agonista. Se validó el ensayo con un promedio de $Z' = 0,79 \pm 0,02$ (n=6).

Ensayo de inhibición

Se trató conjuntamente la línea celular "NK1-biosensor β-ARRNomad rojo" con sustancia P 100 nM y

concentraciones crecientes de L733,060 (inhibidor de NK1) durante 24 h. Después del tratamiento, se tiñeron los núcleos con DAPI y se detectó la inhibición del receptor NK1 analizando el cambio de localización del biosensor β -ARRNomad rojo usando un dispositivo de obtención de imágenes biológicas de alto contenido "BD Pathway 855" de BD Biosciences. La CI_{50} para L733,060 era de aproximadamente $1,84 \times 10^{-7}$ M después de un tratamiento de 24 h con el agonista. Se validó el ensayo con un promedio de $Z' = 0,66 \pm 0,02$.

Ejemplo 2: "Receptor de EP₄-biosensor ArrestinaNomad rojo" en la línea celular HEK293

Ejemplo 2. Resultados

Una línea celular HEK293 con "receptor de EP₄-biosensor ArrestinaNomad rojo" que expresa de manera transitoria biosensor ArrestinaNomad rojo y receptor de prostaglandina E 4 se ha diseñado para someter a ensayo compuestos o analizar su capacidad para modular el receptor de EP₄. Antes de la estimulación mediada por el agonista de interés, el biosensor fluorescente se localiza en la membrana celular, la unión de PGE2 al receptor de EP₄ conduce a un cambio en el plegamiento estructural del biosensor ArrestinaNomad que fomenta su relocalización celular en el tráfico vesicular de las células. La CE_{50} para PGE2 fue de $8,64 \times 10^{-9}$ M después de un tratamiento de 24 h con el agonista. Se validó el ensayo con un promedio de $Z' = 0,67 \pm 0,04$ (n=6).

Ejemplo 2. Materiales y métodos

Cultivo celular de células HEK293

Se hicieron crecer células HEK293 derivadas de ATCC (n.º de catálogo CRL-1573), en medio de Eagle modificado por Dulbecco con alto contenido de glucosa (Sigma-Aldrich) complementado con suero bovino fetal al 10 % (Sigma-Aldrich), aminoácidos no esenciales MEM (Sigma-Aldrich) y gentamicina (Sigma-Aldrich) a 37 °C en una atmósfera humidificada complementada con el 5 % de CO₂.

Generación de línea celular transfectada de manera transitoria

Se creó un plásmido de biosensor ArrestinaNomad rojo clonando posteriormente el ADNc de Tac, ADNc de proteína turboFP602 (Evrogen), péptido de unión a receptores fosforilados de b-arrestina y el péptido de vesicularización (péptido clatrina y beta-adaptina de arrestina) en el vector CMV-ptNL resistente a la geneticina en el laboratorio de los presentes inventores. Se subclonó ADNc del receptor receptor de EP₄ (EP₄) (cDNA.org) en un vector resistente a la puomicina, CMV-pPuro, diseñado en el laboratorio de los presentes inventores usando las enzimas de restricción NheI y XhoI.

Se realizó la transfección transitoria usando el método de fosfato de calcio y luego se sometió a prueba la línea celular transfectada de manera transitoria, denominada "línea celular EP₄-biosensor ArrestinaNomad rojo" usando PGE2 (Sigma-Aldrich) para determinar la respuesta funcional del biosensor ArrestinaNomad rojo.

Desarrollo de los ensayos

Se sembraron células a 20.000 células/placa en placas de obtención de imágenes negras de 96 pocillos de fondo transparente (BD Biosciences) para los ensayos de β -arrestina. Se trató la línea celular "EP₄-biosensor ArrestinaNomad rojo" con una dilución 8 log (n=6) de PGE2 (Sigma-Aldrich) que oscilaba desde 0 hasta 10 μ M en medio Opti-MEM (Gibco) durante 24 horas a 37 °C, el 5 % de CO₂, el 95 % de humedad relativa antes de la adquisición de datos. Se adquirieron imágenes de fluorescencia en la plataforma de imágenes automatizada de alto contenido BD Pathway 855 con un objetivo seco x20.

Ensayo de intensidad de fluorescencia

Para las determinaciones de intensidad de fluorescencia, se midieron los cambios en la distribución de biosensor β -ARRNomad rojo usando un lector de microplacas "Synergy 2" (Biotek). Se retiró el medio Opti-MEM con los agonistas y se reemplazó por PBS 1X sin calcio ni magnesio (Sigma-Aldrich) antes de la adquisición de datos. Se adquirieron datos de turboFP602 con filtros de ex/em. 590/620.

Determinación de señal con respecto a fondo y factor Z'

Se calculó el parámetro de señal con respecto a fondo (S/B) como $\mu c^+ - \mu c^-$, y se calculó el factor Z' usando la siguiente fórmula: $Z' = 1 - [(3\sigma c^+ + 3\sigma c^-) / (\mu c^+ - \mu c^-)]$

Ejemplo 3: "PAR2-biosensor Arres-Ca2+Nomad" múltiple de Ca²⁺-arrestina en la línea celular U2OS

Ejemplo 3. Resultados

Un "PAR2-biosensor Arres-Ca_2^+ Nomad" múltiple de Ca_2^+ -arrestina en la línea celular U2OS que expresa de manera estable biosensor Ca_2^+ Nomad verde, biosensor Arrestina Nomad rojo y receptor de tripsina similar a F2R 1 se ha diseñado para someter a ensayo compuestos o analizar su capacidad para modular PAR2. Antes de la estimulación mediada por los agonistas de interés, el biosensor fluorescente se localiza en la membrana celular, la unión de SLIGKV o SLIGRL-NH₂ a PAR2 conduce a un cambio en el plegamiento estructural de ambos biosensores Nomad que fomenta su relocalización celular en el tráfico vesicular de las células.

Se detectó el aumento en la fluorescencia y se analizó usando el lector de microplacas "Synergy 2" de Biotek. Se midió la CE_{50} para los agonistas después de un tratamiento de 24 h. Se validó el ensayo con $Z' > 0,6$ para cada agonista.

CE_{50} de SLIGKV del ensayo de β -arrestina: $4,83 \times 10^{-6}$ M	CE_{50} de SLIGKV del ensayo de calcio: $1,67 \times 10^{-6}$ M
CE_{50} de SLIGRL-NH ₂ del ensayo de β -arrestina: $1,27 \times 10^{-5}$ M	CE_{50} de SLIGRL-NH ₂ del ensayo de calcio: $4,06 \times 10^{-6}$ M
Z' de SLIGKV β -Arrestina: $0,85 \pm 0,01$	Z' de SLIGKV Calcio: $0,68 \pm 0,01$
Z' de SLIGRL-NH ₂ β -Arrestina: $0,75 \pm 0,01$	Z' de SLIGRL-NH ₂ Calcio: $0,74 \pm 0,01$

Ejemplo 3. Materiales y métodos

Cultivo celular de células U2OS

Se hizo crecer una línea celular de osteosarcoma óseo humano (DSMZ), derivada de ATCC (n.º de catálogo HTB-96), en mezcla de nutrientes con medio de Eagle modificado por Dulbecco F-12 HAM (Sigma-Aldrich) complementada con suero bovino fetal al 10 % (Sigma-Aldrich), aminoácidos no esenciales MEM (Sigma-Aldrich), gentamicina (Sigma-Aldrich) a 37 °C en una atmósfera humidificada complementada con el 5 % de CO₂.

Generación de línea celular estable recombinante

Se transfectó el plásmido que codifica para el biosensor Ca_2^+ Nomad verde en células U2OS usando Lipofectamine LTX (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Se obtuvieron clones resistentes mediante dilución límite, y se seleccionaron células transfectadas positivamente usando puromicina 10 µg/ml (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Una vez que esta línea celular estable estaba lista, se transfectó un clon positivo con el plásmido que codifica para el biosensor Arrestina Nomad rojo, y se seleccionaron los clones positivos mediante dilución límite usando puromicina 10 µg/ml (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) y geneticina 500 µg/ml (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Se transfectó posteriormente la línea celular que expresa conjuntamente ambos biosensores, denominada línea celular Arres-Ca_2^+ Nomad, con la construcción PAR2-CMV-pHygro, y se obtuvieron clones resistentes mediante dilución límite y se seleccionaron usando geneticina 500 µg/ml (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), puromicina 10 µg/ml (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) e higromicina B 100 µg/ml (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Estas células expresaron de manera constitutiva biosensor Ca_2^+ Nomad verde, biosensor Arrestina Nomad rojo y el receptor de tripsina similar a F2R 1, y esta triple línea celular estable se denominó "línea celular PAR2- Arres-Ca_2^+ Nomad".

Desarrollo de los ensayos

Se sembraron células a 20.000 células/placa en placas de obtención de imágenes negras de 96 pocillos de fondo transparente (BD Biosciences) para los ensayos de Ca_2^+ y arrestina. Se trató la línea celular "PAR2- Arres-Ca_2^+ Nomad" con una dilución 10 log (n=6) de SLIGKV (Sigma-Aldrich) o SLIGRL-NH₂ (Sigma-Aldrich) que oscilaba desde 0 hasta 300 µM en medio Opti-MEM (Gibco) durante 24 horas a 37 °C, el 5 % de CO₂, el 95 % de humedad relativa antes de la adquisición de datos. Se adquirieron imágenes de fluorescencia en la plataforma de imágenes automatizada de alto contenido BD Pathway 855 con un objetivo seco x20.

Ensayo de intensidad de fluorescencia

Para las determinaciones de intensidad de fluorescencia, se midieron los cambios en la distribución de biosensor β -ARRNomad rojo usando un lector de microplacas "Synergy 2" (Biotek). Se retiró el medio Opti-MEM con los agonistas y se reemplazó por PBS 1X sin calcio ni magnesio (Sigma-Aldrich) antes de la adquisición de datos. Se adquirieron los datos de turboFP650 con filtros de ex./em. 590/650 y se capturaron las lecturas de turboGFP con filtros de ex./em. 485/585.

Determinación de señal con respecto a fondo y factor Z'

Se calculó el parámetro de señal con respecto a fondo (S/B) como $\mu_{c+} - \mu_{c-}$, y se calculó el factor Z' usando la siguiente fórmula: $Z' = 1 - [(3\sigma_{c+} + 3\sigma_{c-}) / (\mu_{c+} - \mu_{c-})]$

Ejemplo 4: Cribado de alto contenido de Prestwick Chemical Library en la línea celular U2OS NK1R-ArrestinaNomad.Ejemplo 4. Resultados

- 5 Se obtuvo una biblioteca química que comprendía 490 compuestos de Prestwick Chemical Library®, y basándose en la diversidad química y farmacológica de los compuestos y su biodisponibilidad y seguridad para los humanos, se usaron estos compuestos para el ensayo de cribado. El compuesto de referencia era la sustancia P. Se disolvieron todos los compuestos de la biblioteca en dimetilsulfóxido (DMSO) a 5 mM y el compuesto de referencia en agua a 1 mM. Se trataron las células U2OS NK1R-ArrestinaNomad con sustancia P (control positivo) a 10 µM, mientras que los
- 10 compuestos de la biblioteca se sometieron a prueba a 10 µM durante 24 horas en medio Opti-MEM antes de la adquisición de imágenes.

Ejemplo 4. Materiales y métodos

- 15 Adquisición y análisis de imágenes: después de 24 h de tratamiento, se fijaron las células con solución salina tamponada con fosfato complementada con formaldehído al 3,7 % durante 10 min a temperatura ambiente (TA) y se permeabilizaron con Triton-X100 al 0,3 % en PBS durante 3 min a TA. Luego se tiñeron los núcleos de las células con DAPI durante 5 min a TA. Se adquirieron imágenes de fluorescencia en la plataforma de imágenes automatizada de alto contenido BD Pathway 855 con un objetivo seco x20. Se procesaron los cambios en los
- 20 patrones de fluorescencia del biosensor ArrestinaNomad y se cuantificaron usando algoritmos de análisis de imágenes con el software de obtención de imágenes biológicas Attovision en subcampos de 3x3 de cada pocillo (500-1.000 células analizadas por pocillo). Los filtros de excitación y emisión usados fueron los siguientes: para DAPI, 380/10 y 540/20, y para rodamina, 548/20 y 570LP. Se midió la actividad de arrestina contando los gránulos rojos fluorescentes y normalizando el resultado con respecto al número de células. Se normalizaron los datos como
- 25 porcentajes de actividad en comparación con el control positivo (sustancia P) después de restar el valor del control de vehículo. Se determinó la viabilidad celular contando los núcleos (DAPI). Para cada una de las condiciones, se usaron 5 réplicas. Se procesaron los datos usando Excel y se representaron gráficamente en SigmaPlot 11.0.

Ejemplo 5. Desarrollo de línea celular estable U2OS NomadKin

30

Ejemplo 5: Resultados y materiales y métodosGeneración de línea celular estable recombinante

- 35 Se transfectó el plásmido que codifica para el biosensor KinNomad en células U2OS usando Lipofectamine LTX (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Se obtuvieron clones resistentes mediante dilución límite, y se seleccionaron células transfectadas positivamente usando geneticina 500 µg/ml (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Estas células expresaron de manera constitutiva el biosensor KinNomad verde.
- 40 Se adquirieron imágenes de fluorescencia en la plataforma de imágenes automatizada de alto contenido BD Pathway 855 con un objetivo seco x20.

Ejemplo 6. Ensayo de inmunofluorescencia con anticuerpo anti-TAC de biosensor "NTSR1-Arres-Ca2+Nomad de múltiple de Ca²⁺-arrestina"

45

Ejemplo 6. Resultados

- Se realizó un ensayo de inmunofluorescencia con anticuerpo anti-TAC para trazar la localización de biosensor ArrestinaNomad. La localización en la membrana del biosensor observado en el control (paneles superiores) se
- 50 difumina en las células activadas (paneles inferiores) con el agonista. El biosensor se relocaliza desde la membrana plasmática hasta las vesículas citosólicas.

Ejemplo 6. Materiales y métodos

- 55 Se sembraron células a 12.000 células/placa en placas de obtención de imágenes negras de 96 pocillos de fondo transparente (BD Biosciences). Se trató la línea celular "NTSR1-ArrestinaNomad" con 1 µM de NTS (Sigma-Aldrich) en medio Opti-MEM (Gibco) durante 24 horas a 37 °C, el 5 % de CO₂, el 95 % de humedad relativa.

- Después de la incubación durante la noche, se retiró el medio celular y se realizó una incubación de 15 minutos con FBS (Sigma-Aldrich) a 4 °C. Seguido de una incubación de 90 minutos a 4 °C con anticuerpo anti-CD25 humana
- 60 marcado con FITC (Biolegend) a una concentración 1:20. Luego se lavaron las células dos veces con PBS (Sigma-Aldrich). Se adquirieron imágenes de fluorescencia en la plataforma de imágenes automatizada de alto contenido BD Pathway 855 (Franklin Lakes, NJ) con un objetivo seco x20. Los filtros de excitación y emisión usados fueron los siguientes: para FITC, 488/10 y 540/20; y para FP650, 548/20 y 570LP.

65

REIVINDICACIONES

1. Polipéptido de fusión fluorescente capaz de cambiar su localización e intensidad de fluorescencia dentro de la célula desde la membrana citoplásmica celular hasta las vesículas de retención, tras un aumento en la translocación de beta-arrestina desde el citoplasma celular hasta la membrana citoplásmica celular, que comprende un péptido de localización en la membrana que consiste en el dominio extracelular del receptor de interleucina-2 de SEQ ID 3 o una variante que es al menos el 90 % homóloga a esta secuencia en toda la región basándose en la identidad de aminoácidos; un péptido capaz de unir receptores de proteína G o tirosina tras la fosforilación de estos receptores por GRK o RTK que consiste en el péptido de unión a receptores fosforilados de b-arrestina de SEQ ID 2; un péptido de vesicularización que consiste en el péptido clatrina y beta-adaptina de arrestina; y un péptido fluorescente, en el que:
 - a. el péptido de localización en la membrana está situado en el extremo N-terminal del polipéptido de fusión fluorescente y está unido físicamente, opcionalmente a través de un ligador, al péptido fluorescente, que a su vez está unido físicamente, opcionalmente a través de un ligador, al péptido capaz de unir receptores de proteína G o tirosina tras la fosforilación de estos receptores por GRK o RTK; y
 - b. el péptido capaz de unir receptores de proteína G o tirosina tras la fosforilación de estos receptores por GRK o RTK está unido físicamente, opcionalmente a través de un ligador, al péptido de vesicularización, que a su vez está situado en el extremo C-terminal del polipéptido de fusión fluorescente;
 y en el que se entiende que el término "péptido de localización en la membrana" significa un péptido cuya localización intracelular natural está en la membrana plasmática.
2. Polipéptido de fusión fluorescente según la reivindicación 1, en el que el péptido de vesicularización que consiste en el péptido clatrina y beta-adaptina de arrestina consiste en SEQ ID NO 4.
3. Polipéptido de fusión fluorescente según la reivindicación 1, en el que:
 - a. el péptido de localización en la membrana es el dominio extracelular del receptor de interleucina-2 de SEQ ID 3; y
 - b. el péptido de vesicularización que consiste en el péptido clatrina y beta-adaptina de arrestina consiste en SEQ ID NO 4.
4. Polipéptido de fusión fluorescente según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el péptido fluorescente se selecciona del grupo que consiste en GFP, YFP, turboGFP, turboRFP, turboRFP602 y turboRFP650.
5. Molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de polinucleótido que codifica para un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-4.
6. Biosensor que comprende el polipéptido de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 1-4.
7. Célula *in vitro* que comprende el polipéptido fluorescente según cualquiera de las reivindicaciones 1-4.
8. Célula según la reivindicación 7, en la que dicha célula es una línea celular U2OS (línea celular de osteosarcoma óseo humano).
9. Uso *in vitro* del polipéptido fluorescente según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, para detectar y/o reclutar beta arrestina.

Fig. 1.

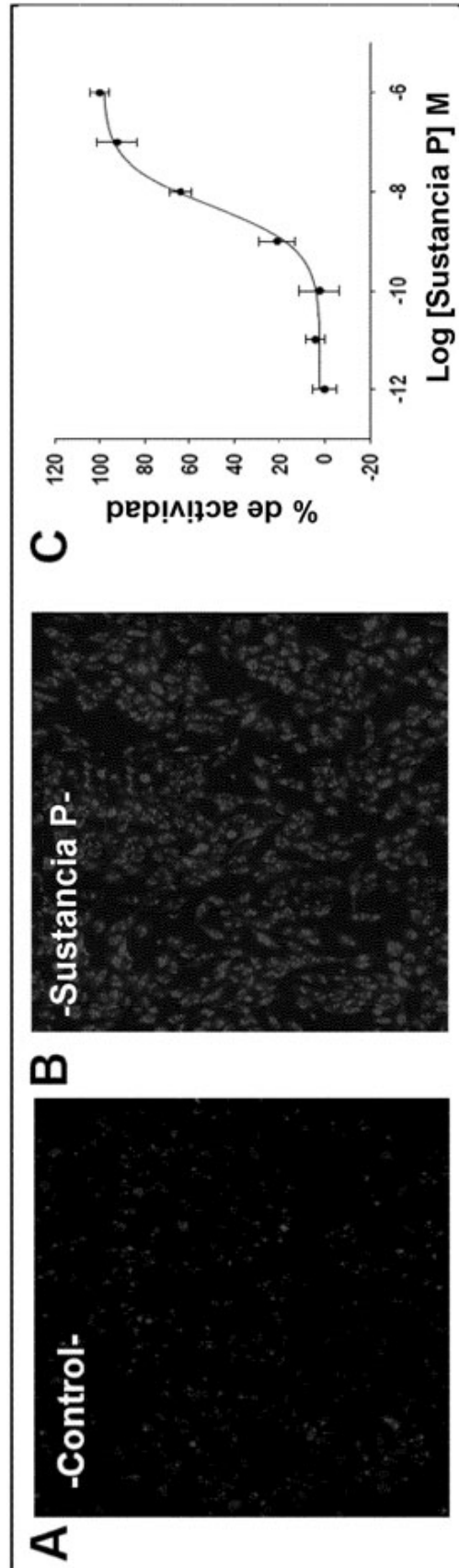


Fig. 2

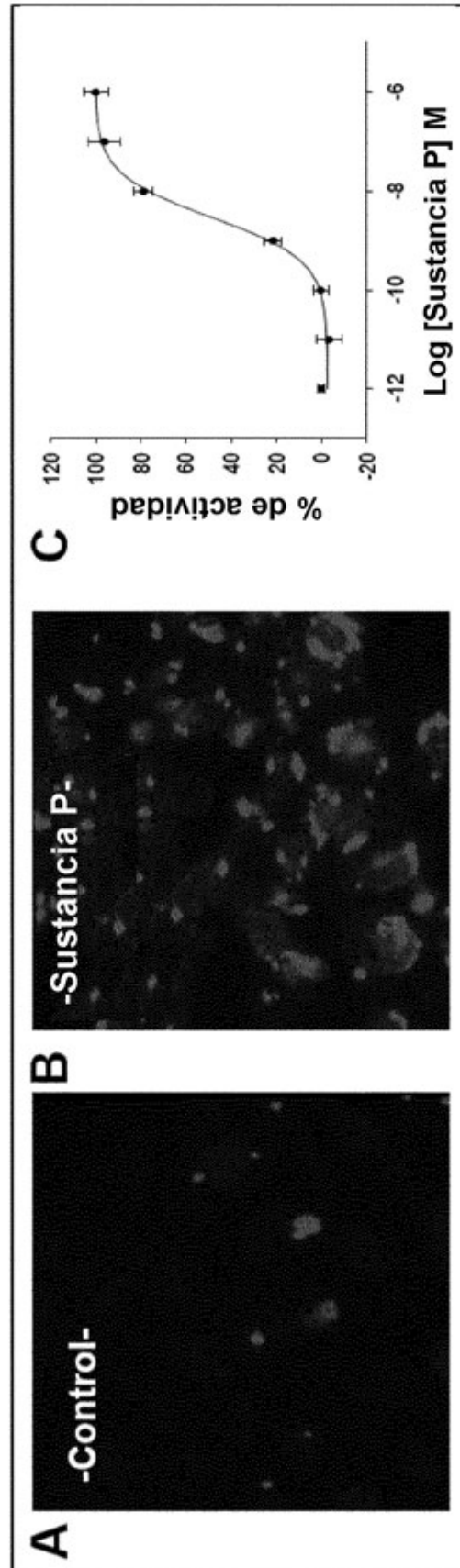


Fig. 3

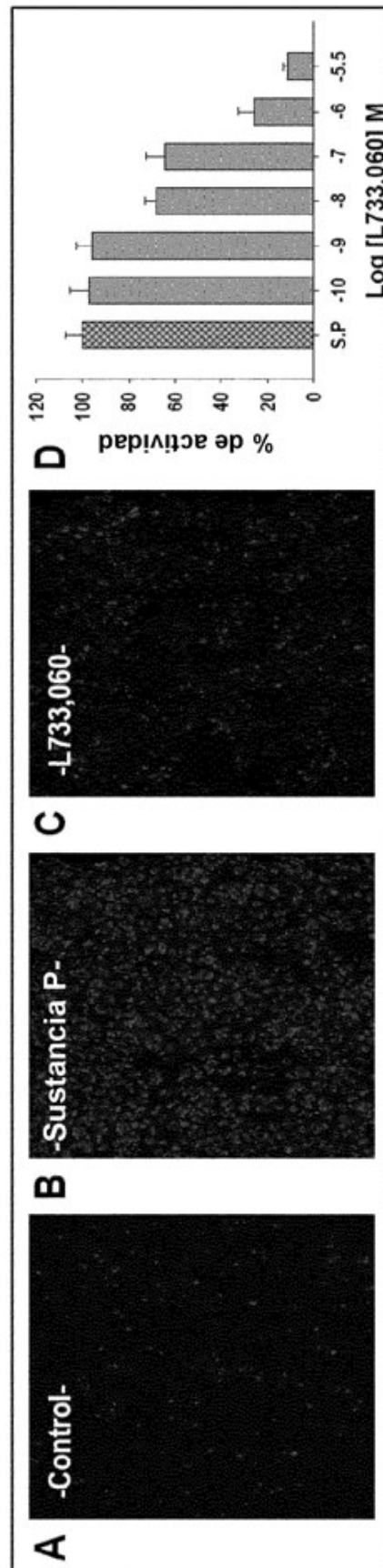


Fig. 4

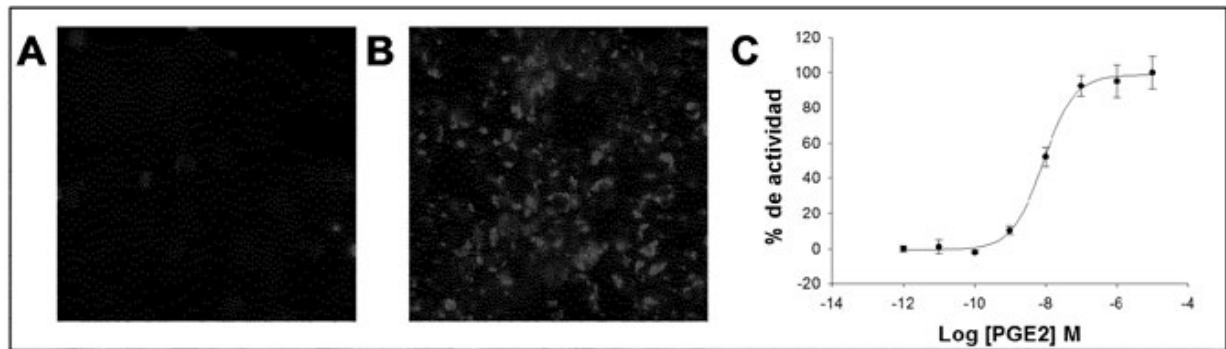


Fig. 5

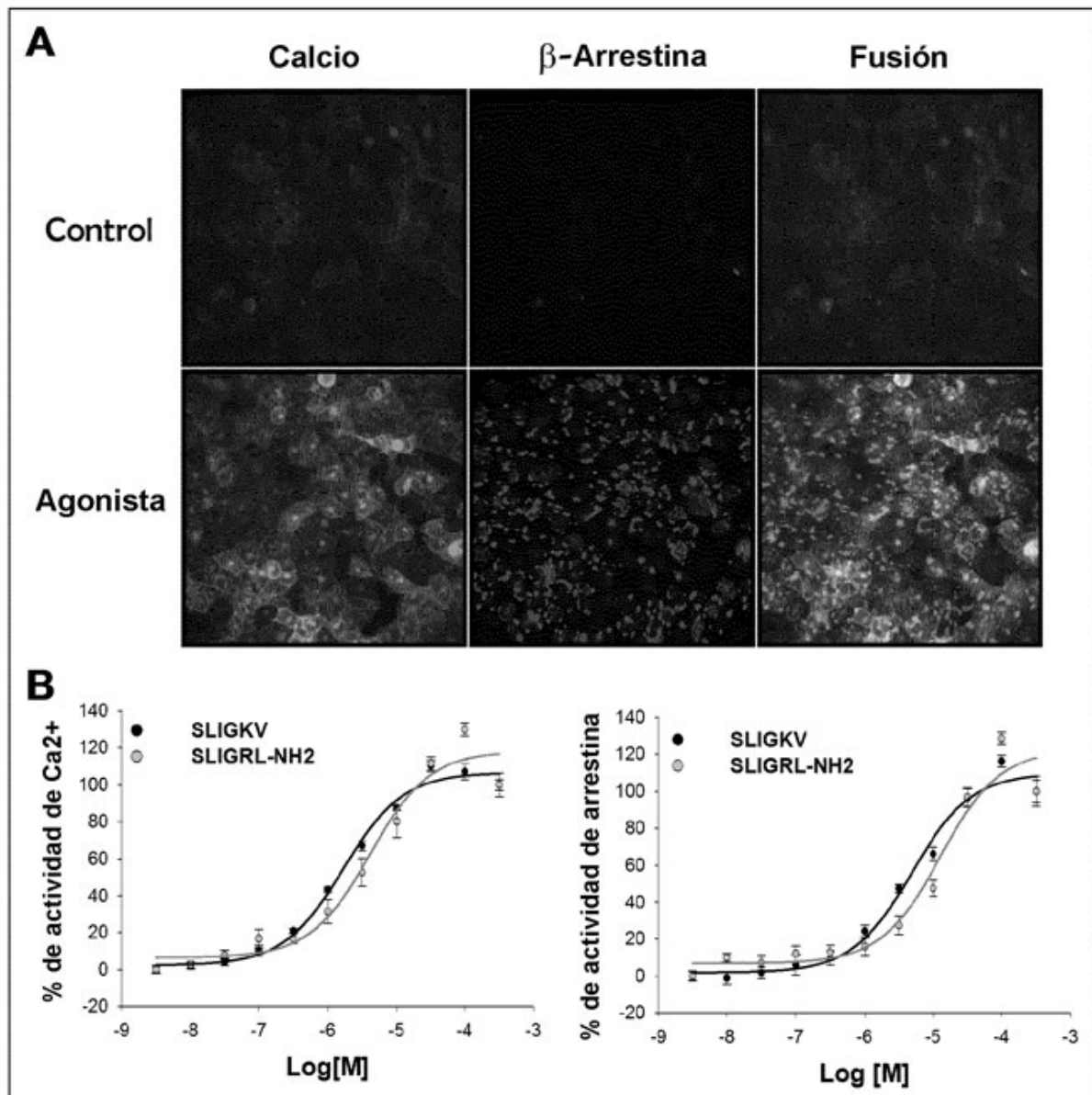


Fig. 6

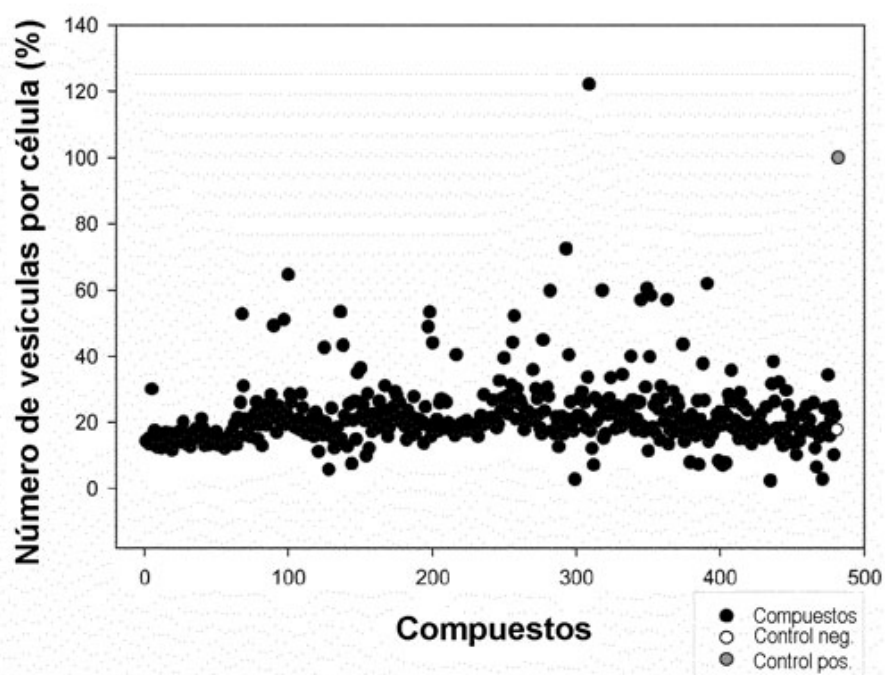


Fig. 7

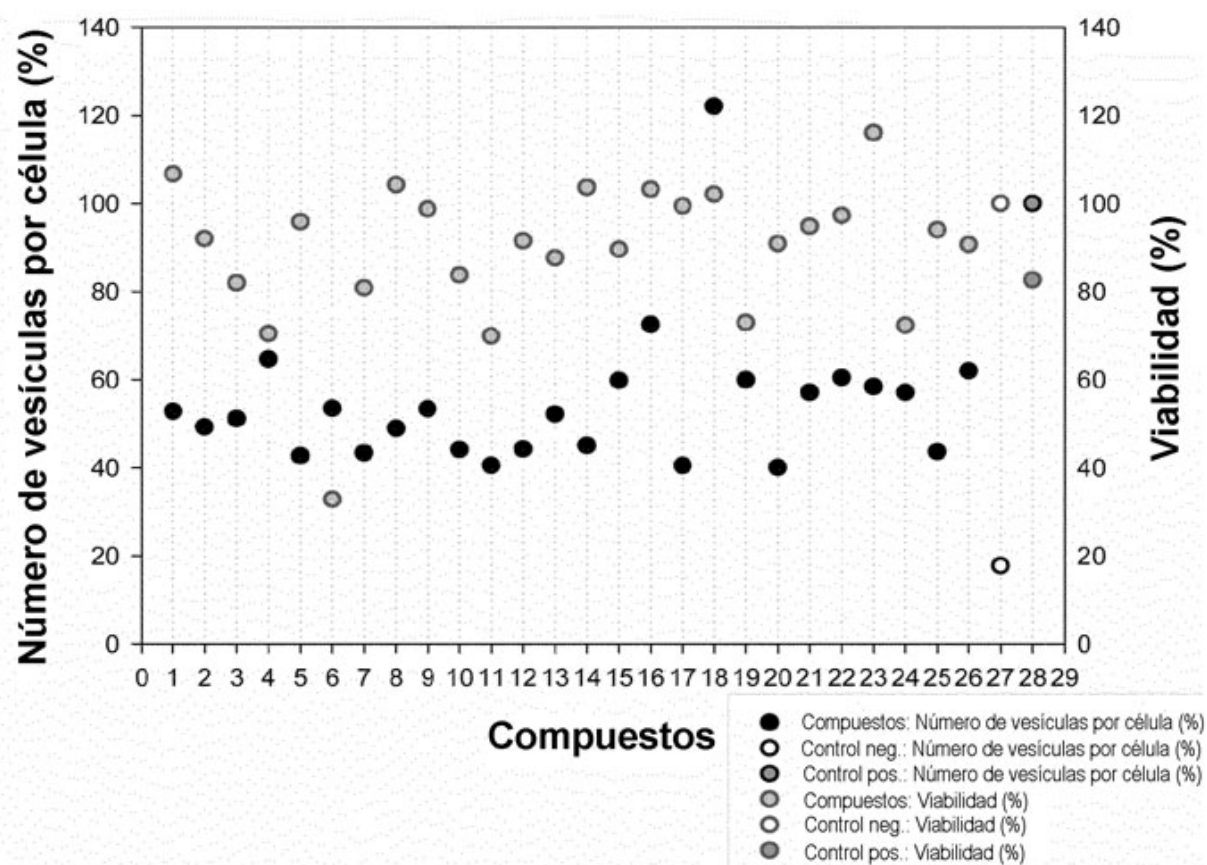


Fig. 8

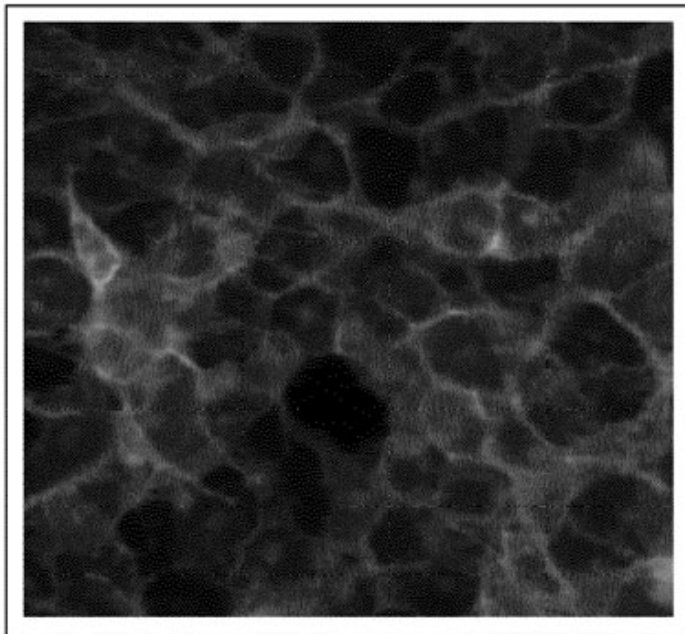


Fig. 9

