

MODULADORES DE LA SECRECIÓN DE PROTEÍNAS

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUD RELACIONADA

Esta solicitud reivindica la prioridad de la solicitud EP 23315197.6, presentada el 11 de mayo de 2023, cuyo contenido se incorpora en su totalidad en el presente documento.

LISTADO DE SECUENCIAS

La presente solicitud contiene un Listado de secuencias que ha sido presentado electrónicamente en formato XML y se incorpora por este documento como referencia en su totalidad. Dicha copia XML, creada el 3 de mayo de 2024, se denomina 122548WO034.xml y tiene un tamaño de 60,335 bytes.

ANTECEDENTES

La secreción de proteínas es un proceso biológico fundamental para el crecimiento, movimiento y comunicación celular. Muchos mecanismos reguladores actúan como control de calidad para este proceso. Los defectos en el plegamiento y secreción de proteínas pueden conducir a diversas patologías, tales como cáncer y enfermedades neurodegenerativas, metabólicas e inflamatorias.

La comprensión de los mecanismos de secreción celular también es de suma importancia para la producción de agentes terapéuticos biológicos. El número de agentes terapéuticos proteicos elaborados a partir de células cultivadas ha aumentado considerablemente en las últimas dos décadas, representando hoy una cuarta parte de todos los fármacos aprobados, siendo aproximadamente la mitad de ellos terapéuticos de anticuerpo (Walsh y Walsh, *Nat Biotechnol.* (2022) 40:1722-60). Se han intentado muchos enfoques para optimizar los títulos de proteínas recombinantes, incluyendo la selección de células hospedadoras, el diseño de vectores y la formulación de medio de cultivo.

Por el contrario, la secreción de proteínas no controlada podría inducir disfunción celular y patogénesis. Véase, por ejemplo, Kuo et al., *Cell Sys.* (2021) 12(9):873-84) y Wang et al., *Mol Neurodegen.* (2014) 9:31). En los casos en que las moléculas secretadas tienen efectos perjudiciales sobre las

células vecinas, la secreción incontrolada puede conducir a la muerte celular, lo que es motivo de preocupación en la bioproducción.

Por lo tanto, sigue existiendo la necesidad de identificar enfoques para modular la secreción de proteínas y optimizar la producción de productos biológicos.

SUMARIO

La presente divulgación proporciona moduladores de la secreción de proteínas a partir de células eucariotas. En consecuencia, en un aspecto, la presente divulgación proporciona un método de inhibición de la secreción de proteínas a partir de una célula eucariota, que comprende poner en contacto la célula con nigericina o tirfostina AG-879, o un análogo de las mismas. En algunas realizaciones, la célula es un cultivo celular (es decir, *in vitro*). En algunas realizaciones, el contacto comprende añadir nigericina, tirfostina AG-879, o un análogo al cultivo celular. En realizaciones adicionales, la nigericina, tirfostina AG0879, o análogo, se añade al cultivo celular para llegar a una concentración de aproximadamente 1 µg/ml a aproximadamente 100 µg/ml, opcionalmente aproximadamente 5 µg/ml a aproximadamente 50 µg/ml. En realizaciones adicionales, la nigericina, tirfostina AG0879, o análogo, se añade al cultivo celular para llegar a una concentración de aproximadamente 50 µg/ml. En realizaciones adicionales, la nigericina, tirfostina AG0879, o análogo, se añade al cultivo celular para llegar a una concentración de al menos aproximadamente 50 µg/ml.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método de aumento de la secreción de proteínas a partir de una célula eucariota, que comprende poner en contacto la célula con licorina o un análogo de la misma. En algunas realizaciones, la célula eucariota es una célula recombinante manipulada para expresar una proteína recombinante, tal como una enzima para terapia de reemplazo enzimático, o un anticuerpo. En algunas realizaciones, la célula es en un cultivo celular. En algunas realizaciones, el contacto comprende añadir licorina o un análogo al cultivo celular. En algunas realizaciones, la licorina o análogo se añade al cultivo celular para alcanzar una concentración de desde aproximadamente 0.1 µM hasta aproximadamente 100

5 μM , opcionalmente desde aproximadamente 1 μM hasta aproximadamente 50 μM . En realizaciones adicionales, la licorina o análogo se añade al cultivo celular para llegar a una concentración de al menos aproximadamente 1 μM . En realizaciones adicionales, la licorina o análogo, se añade al cultivo celular para llegar a una concentración de aproximadamente 1 μM . En realizaciones adicionales, la licorina o análogo, se añade al cultivo celular para llegar a una concentración de aproximadamente 50 μM .

10 En algunas realizaciones de los presentes métodos, la célula eucariota es una célula de mamífero, una célula de insecto o una célula de levadura. En realizaciones adicionales, la célula de mamífero es una célula CHO; una célula NS0, una célula BHK, una célula 293, una célula HeLa, una célula HEK o una célula Sp2/0.

15 Otras características, objetivos y ventajas de la invención son evidentes en la descripción detallada que sigue. Se debe entender que, sin embargo, la descripción detallada, aunque indique realizaciones y aspectos de la invención, se proporciona solamente a modo de ilustración, no limitación. A partir de la descripción detallada serán evidentes para los expertos en la técnica diversos cambios y modificaciones dentro del alcance de la invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

20 La **FIG. 1A** es un diagrama esquemático que muestra el principio del ensayo RUSH para la secreción de anticuerpos. La proteína de fusión (en este caso, el anticuerpo fusionado al dominio de unión a estreptavidina (SBD) separado por un conector que contiene un sitio de escisión de furina) se retiene en la luz del retículo endoplasmático (RE) mediante la interacción de SBD con
 25 una proteína anzuelo de estreptavidina-KDEL. Tras la adición de biotina, la interacción entre el anzuelo y la proteína de fusión se altera competitivamente y la proteína de fusión, por lo tanto, está libre de viajar a través de la vía secretora clásica al Golgi, donde la furina proteasa residente escinde el conector entre SBD y el anticuerpo. A continuación, las partes resultantes se
 30 secretan en el entorno extracelular. El resto GFP permite la monitorización del tráfico de proteínas mediante microscopía de fluorescencia.

La **FIG. 1B** es un diagrama esquemático que muestra un anticuerpo

RUSH a modo de ejemplo. El anticuerpo está compuesto por una IgG fusionada en sus extremos C de cadena pesada a una secuencia peptídica que contiene un conector escindible por furina, una proteína fluorescente verde (GFP) y un péptido de unión a estreptavidina (SBP).

La **FIG. 1C** es un panel de fotografías de células fijadas inmunoteñidas que muestran la colocalización del anzuelo de estreptavidina-KDEL con calreticulina en el RE. Coeficiente de correlación de Pearson (CCP) = 0.69. Coeficiente de solapamiento superficial (SOC) = 0.45.

Las **FIG. 2A-2F** muestran la caracterización del sistema del anticuerpo anti-PD-L1 RUSH. La **FIG. 2A** muestra la microscopía por lapso temporal de células del clon n.º 7 incubadas en ausencia o en presencia de biotina 40 µM, fijadas y teñidas con DAPI. La tasa de secreción se puede deducir de la intensidad de GFP intracelular decreciente tras la adición de biotina a los cultivos celulares (**FIG. 2A**). La **FIG. 2B** muestra la inmunotinción de células fijas incubadas durante 4 h en ausencia o en presencia de biotina que muestra la colocalización del anzuelo de estreptavidina-KDEL con el anticuerpo marcado con GFP en ausencia de biotina y la pérdida de colocalización 4 h después de la adición de biotina. CCP = 0.51 en ausencia de biotina, CCP = 0.29 en presencia de biotina. Transferencia de Western de lisados celulares (**FIG. 2C**) o sobrenadantes concentrados (**FIG. 2D-2F**) del clon n.º 7 incubado durante 4 h en ausencia de biotina, en presencia de biotina 40 µM, o en presencia de biotina 40 µM junto con inhibidor de furina I 100 µM. Las membranas se sondaron con los anticuerpos indicados para detectar proteínas que contienen el resto GFP (**FIG. 2C, 2D**), el resto SBP (**FIG. 2E**) o epítomos de las cadenas pesada y ligera de inmunoglobulina (**FIG. 2F**). Los patrones de masa molecular (en kDa) se indican a la izquierda en el panel **FIG. 2D**. Las estructuras de las proteínas detectadas por inmunotransferencia se indican basándose en el esquema mostrado en la **FIG. 1B** e incluyen cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos, GFP, SBP y un conector con un sitio de escisión de furina. La forma truncada en el extremo C del anticuerpo representa los residuos conectores que quedan después de la escisión por furina. Los resultados son representativos de al menos 3 experimentos independientes.

Las **FIG. 3A-F** muestran la caracterización de la capacidad de unión del anticuerpo anti-PD-L1 RUSH liberado a través del sistema RUSH activado por biotina (**FIG. 3A, 3C y FIG. 3E**) Representación esquemática del anticuerpo que se une a células PD-L1^{pos} y detección por citometría de flujo. La **FIG. 3B** muestra una gráfica de histograma de FACS del anticuerpo anti-PD-L1 recombinante y purificado nativo. Gráficos de histograma de FACS del anticuerpo anti-PD-L1 RUSH procesado y no procesado liberado por el clon n.º 7 en presencia de biotina y en ausencia o presencia de inhibidor de furina, respectivamente (**FIG. 3D, 3F**). Gris oscuro, unión a células CHO PD-L1^{pos} (CHO-PDL1); gris claro, unión a células CHO parentales PD-L1^{neg} (CHO-K1). La unión del anticuerpo se detecta mediante un ensayo de inmunofluorescencia indirecta con un APC anti-Fc secundario conjugado o mediante medición directa de la fluorescencia de GFP.

Las **FIG. 4A-4C** muestran el cribado de alto rendimiento de bibliotecas de compuestos químicos para la identificación de moduladores de la secreción de proteínas. La **FIG. 4A** muestra el flujo de trabajo de cribado. El clon U2OS n.º 7 se siembra en placas de 384 pocillos y se incuba durante 24 h antes del tratamiento con cada compuesto de Prestwick, ICCB Known Bioactives o Autophagy Compound Library a 2 concentraciones, bajas y altas (con una diferencia de 10 veces). Se añade biotina después de 4 h, las células se lavan y fijan 1 h después de la adición de biotina, y se procesan para la adquisición automatizada de imágenes de la fluorescencia intracelular de Hoechst 33324 y GFP. La **FIG. 4B** muestra una representación gráfica de puntos de los fármacos basándose en su impacto en la liberación de GFP (señal de GFP citoplásmica) y la integridad del núcleo (viabilidad). La **FIG. 4C** muestra la clasificación de la puntuación Z de la intensidad de GFP citoplásmica después del tratamiento. Se representan gráficamente los resultados del cribado de la biblioteca Prestwick a la baja concentración de fármaco. Se utilizó brefeldina A como control positivo de la inhibición de la secreción. Los compuestos que provocan una intensidad de GFP citoplásmica inferior a la observada para las células tratadas solo con biotina son potenciadores potenciales de la secreción de proteínas. Los fármacos que inducen un nivel de fluorescencia de GFP

superior al medido en presencia de biotina solo son potenciales inhibidores de la secreción de proteínas.

Las **FIG. 5A-5C** muestran la elección de potenciadores potenciales de la secreción de proteínas. Las **FIG. 5A** y **5B** muestran representaciones de gráficas de puntos de la eficiencia de fármacos basadas en sus puntuaciones Z medidas a baja y alta concentración de fármaco (**FIG. 5A**, colección Prestwick; **FIG. 5B**, colecciones ICCB Known Bioactives y TargetMol Autophagy). Se enumeran los compuestos seleccionados para una caracterización adicional. (**FIG. 5C**) El clon n.º 7 se trató con los compuestos indicados, se fijó y se analizó como se describe en la leyenda de la **FIG. 4A**.

Las **FIG. 6A-6C** muestran la validación de potenciadores de la secreción de proteínas. Las células del clon n.º 7 se trataron con los compuestos indicados y se analizaron tal como se indica en la leyenda de la **FIG. 4A**. Los fármacos se usaron a baja (**FIG. 6A**) o alta concentración (**FIG. 6B**) tal como se indica en el texto y después del tratamiento, la fluorescencia intracitoplásmica se normalizó a la medida en células tratadas simuladamente (sin biotina). La **FIG. 6C** muestra un ensayo ELISA en PD-L1 inmovilizado.

Las **FIG. 7A** y **7B** muestran la validación de inhibidores de la secreción de proteínas. La **FIG. 7A** muestra el ensayo ELISA en PD-L1 inmovilizado. Las células del clon n.º 7 se trataron con los compuestos indicados y los sobrenadantes se ensayaron para determinar la unión a PD-L1. Se usó brefeldina A como control positivo de inhibidores de la secreción de proteínas. La **FIG. 7B** muestra células tratadas en la **FIG. 7A** que se sometieron a un ensayo de toxicidad. Se midió la fluorescencia de Hoechst 33324, lo que permitió numerar células vivas adherentes en cada pocillo.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

La presente divulgación proporciona un método para identificar moduladores de la secreción de anticuerpos a partir de células hospedadoras recombinantes aprovechando el sistema de retención usando anzuelos selectivos (RUSH) en el cribado de bibliotecas de fármacos de medio a alto rendimiento.

El sistema RUSH se basa en la retención de la proteína de interés en

una ubicación subcelular específica hasta su liberación activada en la vía secretora. El sistema utiliza un sistema de dos estados donde una proteína anzuelo fusionada con el núcleo de estreptavidina está firmemente anclada en el compartimento donante, e interactúa de manera reversible con una proteína

5 indicadora fusionada a un péptido de unión a estreptavidina (SBP). Tras la adición de biotina, la proteína indicadora se libera simultáneamente de la proteína anzuelo. Véanse, por ejemplo, Boncompain et al., *Nat Methods*. (2012) 9:493-98; Zhao et al., *Sci Rep*. (2018) 8:14966; documento de patente WO 2022/101482.

10 Por consiguiente, la presente divulgación proporciona un método para identificar un compuesto que modula la secreción de anticuerpos a partir de una célula eucariota, comprendiendo el método: proporcionar una célula que se ha manipulado para expresar (i) una proteína anzuelo que se retiene en el retículo endoplasmático de la célula, en donde la proteína anzuelo comprende

15 un dominio de unión a biotina (por ejemplo, estreptavidina), y (ii) una proteína cebo que comprende un anticuerpo cuyo extremo C de cadena pesada está fusionado a un péptido de unión a proteína anzuelo (por ejemplo, un péptido de unión a estreptavidina); poner en contacto la célula con un compuesto candidato (por ejemplo, un miembro de una colección de moléculas pequeñas)

20 y con biotina, y determinar la cantidad de dicho anticuerpo secretado a partir de la célula, en donde una cantidad alterada del anticuerpo secretado de la célula en comparación con una célula de referencia no puesta en contacto con el compuesto candidato indica que el compuesto candidato es un compuesto capaz de modular la secreción de anticuerpos a partir de la célula.

25 Los presentes inventores han generado un sistema RUSH basado en anticuerpos que permite el cribado de moduladores de la secreción de proteínas (por ejemplo, un anticuerpo, una enzima u otra proteína biológica) de células que se han modificado para producir proteína recombinante (por ejemplo, un anticuerpo, una enzima u otra proteína biológica). El cribado de

30 pequeñas colecciones de compuestos condujo al descubrimiento de licorina, anisomicina, cicloheximida, digoxigenina, metenamina, ropinirol, pinocembrina y piritildiona como potenciadores de la secreción; y nigericina y tirfostina AG-

879 como inhibidores de la secreción. Estos compuestos se pueden usar para modular directamente la secreción de proteínas mediante su adición en el medio de cultivo celular. Por ejemplo, pueden usarse potenciadores de la secreción de proteínas para potenciar el rendimiento de la producción de proteínas recombinantes, mientras que los inhibidores de la secreción de proteínas pueden usarse para controlar el momento de la secreción de proteínas o para prevenir o reducir la secreción de proteínas que son dañinas.

I. Sistema RUSH

La presente divulgación proporciona un ensayo basado en células (sistema RUSH) para identificar reguladores de la secreción de anticuerpos. En realizaciones particulares, el ensayo basado en células hace uso de una línea celular que coexpresa una proteína anzuelo y una proteína cebo para ayudar en la identificación de moduladores de molécula pequeña de la secreción de proteínas y para monitorizar la cinética de la secreción de proteínas.

La línea celular seleccionada para el ensayo RUSH puede ser cualquier línea celular eucariota. La línea celular RUSH puede ser la misma que la línea celular que está destinada a la producción de un anticuerpo diana. En algunas realizaciones, la célula eucariota es una célula de levadura. En algunas realizaciones, la célula de levadura es *S. cerevisiae*, *P. pastoris* y similares. En algunas realizaciones, la célula eucariota es una célula de insecto. En algunas realizaciones, la célula eucariota es una célula de mamífero. En realizaciones adicionales, la célula de mamífero es una célula CHO, una célula HEK, una célula BHK, una célula 293, una célula HeLa, una célula NS0, una célula SP2/0, una célula U2OS y similares.

A. Proteínas anzuelo

En algunas realizaciones, la proteína anzuelo proporcionada en el presente documento comprende una proteína de unión a biotina fusionada a un péptido que puede secuestrar la proteína anzuelo en el retículo endoplasmático (RE). En la siguiente tabla se muestran péptidos de retención de RE a modo de ejemplo.

Tabla 1. Péptidos de retención de RE a modo de ejemplo

SE Q ID NO	Secuencia de aminoácidos	
5	3	KDEL
	4	KTEL
	5	HNEL
	6	KEDL
	7	HDEL
10	8	KEEL
	9	QEDL
	10	K(X)KXX, en donde X es cualquier residuo aminoacídico y el paréntesis indica presencia o ausencia.
	11	HKXX, en donde X es cualquier residuo aminoacídico
	--	RR, en donde X es cualquier residuo aminoacídico
15	--	RXR, en donde X es cualquier residuo aminoacídico
	12	RXXR, en donde X es cualquier residuo aminoacídico
	13	EFFDAXE, en donde X es cualquier residuo aminoacídico
	--	DXE, en donde X es cualquier residuo aminoacídico
	--	DIE
20	--	SKK
	14	MAGARRGWRLAPVRRGVCGRPRLMRPLWLLFAVSFFGWTGALDG
	15	MGSLWSKISQLFVDA
	16	MRVKEKYQHLWRWGWGTMLLGMLMIC
	17	MRLSWFRVLTVLSICLSAVAT
25	18	MDPVVVLGLCLSCLLLLSLWKQSYGGGKL
	19	HALSYWKPFVLNMCVATVLTAGAYLCYRFLFNSNT
	20	SPRGSRPSWGPTDPRRRSRNLGKVIDTLTCGFADLMGYIPLVGA
	21	MALWMRFLPLLALLVLWEPKPAQA

SEQ ID NO	Secuencia de aminoácidos
5	22 MEAMWLLCVALAVLAWG
	23 IPHDLCHNGEKS KPSKIKSLFKKSK
	24 RPSNNNTTTTTTDTATQPHHHHHHRHRDAGVKNVTNNSKTTESSSSSSAAKE KPKHKKGLLHKLKKKL
	25 VVQAITFIFKSLGLKCVQFLPQVMPTFLNVIRVCDGAIRE
10	26 TFCSTALLITALALVCTLLYL
	27 GVMLGSIFCALITMLGHI
	28 FLAAFVVMLCITIVTIVVYIYLV
	29 WGVLAGIAYFSMVGNWAKVLVLLLFAGV
	30 TAPASINTPN
15	31 WWQLTLGAICALPLAGLLACCA

En algunas realizaciones, el péptido de retención de RE comprende un motivo KDEL (SEQ ID NO:3), K(X)KXX (SEQ ID NO:10), RR, RXR o RXXR (SEQ ID NO:12), en donde X es cualquier residuo aminoacídico. En realizaciones adicionales, el péptido de retención de RE comprende o consiste en KDEL (SEQ ID NO:3).

En algunas realizaciones, la proteína de unión a biotina se selecciona de avidina, estreptavidina, tamavidina, bradavidina, extravidina, rizavidina y derivados de las mismas. En realizaciones adicionales, la proteína de unión a biotina es estreptavidina. Una secuencia a modo de ejemplo de estreptavidina se muestra a continuación:

MRKIVVAAIA VSLTTVSITA SASADPSKDS KAQVSAAEAG ITGTWYNQLG
STFIVTAGAD GALTGTYESA VGNAESRYVL TGRYDSAPAT DSGGTALGWT
VAWKNNYRNA HSATTWSGQY VGGAEARINT QWLLTSGTTE ANAWKSTLVG
HDTFTKVKPS AASIDAAKKA GVNNGNPLDA VQQ (SEQ ID NO:2)

También se puede usar una proteína variante que sea al menos un 90 % (por ejemplo, al menos un 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99 %) idéntica a esta secuencia a modo de ejemplo, siempre que la proteína variante conserve la

capacidad de unirse a la biotina o a un derivado de la misma.

El porcentaje de identidad de dos secuencias de aminoácidos (o de dos secuencias de ácidos nucleicos) puede obtenerse, por ejemplo, mediante BLAST® usando parámetros predeterminados (disponibles en el sitio web del Centro Nacional de Información Biotecnológica de la Biblioteca Nacional de Medicina de los Estados Unidos). En algunas realizaciones, la longitud de una secuencia de referencia alineada a efectos de comparación es de al menos un 30 % (por ejemplo, al menos un 40, 50, 60, 70, 80 o 90 %) de la secuencia de referencia.

En ciertas realizaciones, la proteína anzuelo comprende estreptavidina fusionada con un péptido KDEL (SEQ ID NO:3).

La proteína anzuelo se puede introducir en una célula hospedadora transfectando un casete de expresión que codifica la proteína anzuelo en la célula hospedadora. El casete de expresión puede comprender un promotor que es activo en la célula hospedadora. Para células hospedadoras de mamífero, por ejemplo, un promotor seleccionado de CMV, SFFV, CAG, EFI, EFIA, GALI, GALI0, GPD, ADH y promotores de GAP.

B. Proteínas cebo

La proteína cebo usada en los presentes métodos comprende un anticuerpo, u otra proteína multimérica, fusionada a un péptido que puede unirse a la proteína anzuelo. En algunas realizaciones, el péptido de unión a proteína anzuelo es un péptido de unión a estreptavidina (SBP) si la proteína anzuelo comprende estreptavidina. Los ejemplos de SBP se muestran en la siguiente tabla. En algunas realizaciones, el SBP comprende o consiste en SEQ ID NO: 32.

Tabla 2. Secuencias de SBP a modo de ejemplo

SEQ ID NO	Secuencia de aminoácidos
32	DEKTTGWRGGHVVEGLAGELEQLRARLEHHPQGQREP
33	AWRHPQFGG
34	AWRHPQFGGAWRHPQFGG
35	AWRHPQFGGAWRHPQFGGAWRHPQFGG
36	WSHPQFEK

5	37	WSHPQFEKWSHPQFEK
	38	WSHPQFEKWSHPQFEKWSHPQFEK
	39	WSGPQFEK
	40	WSGPQFEKWSGPQFEK
	41	WSGPQFEKWSGPQFEKWSGPQFEK
10	42	WHRWPWLVS
	43	WHRWPWLVS
	44	WHRWPWLVS
	45	WHWWYALDR
	46	WHWWYALDRWHWWYALDR
15	47	WHWWYALDRWHWWYALDRWHWWYALDR
	48	$WX_1HPQFX_2X_3$, en donde X_1 representa cualquier residuo aminoacídico, y X_2 y X_3 representan ambos G, o donde X_2 representa E y X_3 representa R o K
	--	DVE
	--	VEA
	--	EA
20	49	VEA
	50	DVEA
	51	DVEA
	52	DVXA, donde X representa E, D o G
	53	DVXAL, donde X representa E, D o G
25	54	DVEAL
	55	DVX_1ALX_2 , en donde X_1 representa E, D o G; y X_2 representa G o D
	56	$DVX_1ALX_2X_3$, en donde X_1 representa E, D o G; X_2 representa G o D; y X_3 representa A o E
	57	$DVX_1ALX_2X_3R$, en donde X_1 representa E, D o G; X_2 representa G o D; y X_3 representa A o E
	58	DVEALGAR

59	DVX ₁ AWLX ₂ X ₃ RVPLVET, en donde X ₁ representa E, D o G; X ₂ representa G o D; y X ₃ representa A o E
60	DRATPY
61	SEKLSNTK

La proteína multimérica puede ser un anticuerpo (por ejemplo, una IgG₁, IgG₂, IgG₃ o IgG₄) cuyos extremos C de cadena pesada se fusionan a un SBP. El anticuerpo puede unirse a cualquier antígeno de interés, incluyendo, sin limitaciones, citocinas (por ejemplo, TNF-alfa, IL-6 o TGF-beta), antígenos tumorales (por ejemplo, AFP, BCMA, CD19, CD20, CD22, CD123, EGFR, EPCAM, GPC2, GPC3, HER2, MUC16, ROR1 o ROR2), o puntos de control inmunitarios (por ejemplo, PD-1, PD-L1, PD-L2, CTLA-4, TIGIT, TIM-3 o LAG-3).

En algunas realizaciones, la proteína cebo puede comprender además un dominio señal fluorescente (por ejemplo, un dominio de proteína fluorescente verde (GFP) o dominio de GFP potenciado (eGFP)) para permitir la monitorización del tráfico de la proteína cebo dentro de la célula. En dichas realizaciones, el dominio de señal fluorescente se puede unir a la proteína multimérica (por ejemplo, el anticuerpo) a través de un conector escindible por una proteasa en un compartimento subcelular, tal como una furina residente en el aparato de Golgi. Un sitio de escisión de furina puede ser RX₁X₂R, donde X₁ = cualquier aminoácido de origen natural y X₂ = R o K (SEQ ID NO:62).

La proteína cebo puede introducirse en una célula hospedadora transfectando un casete de expresión que codifica la proteína cebo en la célula hospedadora. El casete de expresión puede comprender un promotor que es activo en la célula hospedadora. Para células hospedadoras de mamífero, por ejemplo, se puede usar un promotor seleccionado de promotores vav, PGK, SV40, promotor de timidina cinasa (TK), MSCV y UbC.

C. Conectores peptídicos

En la proteína anzuelo y la proteína cebo, los diversos dominios funcionales pueden unirse a través de un conector peptídico. Los conectores peptídicos pueden ser conectores flexibles para permitir el plegamiento, movimiento e interacción apropiados de los dominios unidos. En algunas

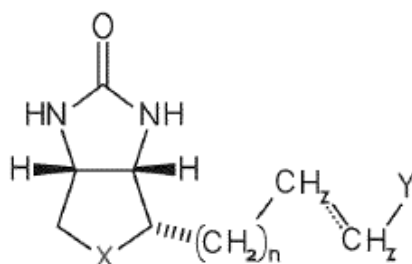
realizaciones, el conector peptídico flexible del presente documento comprende mayoritariamente aminoácidos pequeños (por ejemplo, Gly, Ser o Thr). En algunas realizaciones, el conector peptídico del presente documento consiste principalmente (por ejemplo, más del 50 % de los residuos) en residuos de Gly y Ser (conector "GS"). Como se ha descrito anteriormente, dicho conector peptídico puede comprender $(G_4S)_n$ (SEQ ID NO:1). Al ajustar el número de copias "n", se puede ajustar la longitud del conector para conseguir la distancia deseada de los dominios funcionales unidos. En algunas realizaciones, n puede ser 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10. En realizaciones adicionales, n puede ser 2 o 3. En algunas realizaciones, el conector peptídico puede contener aminoácidos adicionales, tales como Thr y Ala, para mantener la flexibilidad, así como aminoácidos polares, tales como Lys y Glu, para mejorar la solubilidad. Véase, por ejemplo, Chen et al., *Adv Drug Deliv Rev.* (2013) 65(10):1357-69.

En algunas realizaciones de la proteína anzuelo, el dominio de estreptavidina y el dominio de retención de RE (por ejemplo, KDEL) pueden unirse a un conector GS tal como $(G_4S)_n$ (SEQ ID NO:1), donde n puede ser, por ejemplo, 2 o 3 (es decir, GGGGSGGGGS o GGGGSGGGGSGGGGS, respectivamente).

En algunas realizaciones de la proteína cebo, una IgG se fusiona en sus extremos C a un SBP a través de un conector peptídico. En realizaciones adicionales, el conector peptídico es escindible. En ciertas realizaciones, el conector peptídico incluye un sitio de escisión de furina y es escindible por furina. En ciertas realizaciones, el conector escindible (por ejemplo, escindible por furina) une la IgG a un péptido señalizador fluorescente y un SBP.

D. Biotina y derivados de la misma

Se añade biotina a las células RUSH para interrumpir la unión entre la proteína anzuelo y la proteína cebo (anticuerpo). En algunas realizaciones, se puede usar un derivado de biotina. En algunas realizaciones, un derivado de biotina tiene la estructura de Fórmula (I):



Fórmula (I),

en donde:

X se selecciona de H₂, O, S, Se, SO y SO₂,

Y se selecciona de CONH(CH₂)₄CH(NH₂)COOH, COOH y OH,

n es 1, 2 o 3, y

z es 1 o 2.

En una realización, el derivado de biotina se selecciona del grupo que consiste en biocitina, detiobiotina, selenobiotina, sulfóxido de biotina, oxibiotina, biotinol, norbiotina, homobiotina, alfa-dehidrobiotina y biotina sulfona.

II. Identificación de moduladores de la secreción de proteínas

La presente divulgación proporciona métodos de cribado para moduladores (agonistas o antagonistas) de la secreción de proteínas (por ejemplo, proteínas multiméricas tal como un anticuerpo). En estos métodos, se añaden compuestos candidatos (por ejemplo, aquellos en una colección de moléculas pequeñas) a células que comprenden el sistema de anticuerpos RUSH descrito en el presente documento. Con la adición de biotina (o un derivado de la misma) a las células, el cebo del anticuerpo se liberará del secuestro en el RE. La medición de la secreción de anticuerpos se puede realizar (por ejemplo, mediante ELISA) para determinar la alteración de la secreción de anticuerpos con respecto a las células de referencia que no se tratan con los compuestos candidatos. Los compuestos candidatos pueden añadirse antes, simultáneamente con o después de, la adición de biotina al cultivo celular.

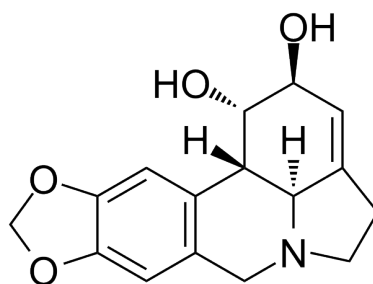
Los métodos de cribado de la presente divulgación permiten identificar un compuesto (por ejemplo, un compuesto de molécula pequeña) como un potenciador o inhibidor de la secreción de proteínas, por ejemplo, la secreción de anticuerpos.

III. Moduladores de molécula pequeña de la secreción de anticuerpos

La presente divulgación también proporciona potenciadores e inhibidores de la secreción de proteínas (por ejemplo, proteínas monoméricas o proteínas multiméricas, tales como anticuerpos) identificadas mediante los presentes métodos de cribado.

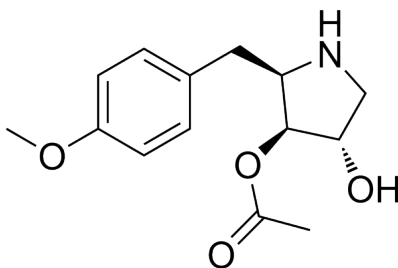
A. Potenciadores de la secreción de proteínas

En algunas realizaciones, el potenciador de la secreción de proteínas (por ejemplo, anticuerpo) es licorina (3,12-didehidro-2'H-[1,3]dioxolo[4',5':9,10]galantan-1 α ,2 β -diol). La licorina es un alcaloide natural extraído de la planta *Amaryllidaceae*. La licorina es un inhibidor de SCAP potente y activo por vía oral. La licorina regula negativamente el nivel de proteína SCAP (proteína activadora de escisión SREBP; SREBP, proteína de unión al elemento regulador del estero) sin cambiar su transcripción. La licorina presenta potencial como inhibidor vasculogénico del melanoma, por lo que es útil en el estudio de enfermedades metabólicas y cáncer de próstata. Véase, por ejemplo, Roy et al., *Biomed Pharmacother.* (2018) 107:615-24. La licorina se identifica por el n.º CAS 476-28-8 y tiene la siguiente estructura química:

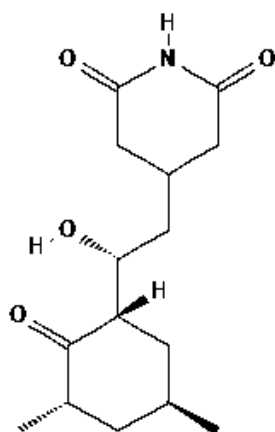


En algunas realizaciones, el potenciador de la secreción de proteínas (por ejemplo, anticuerpo) es anisomicina (acetato de [(2R,3S,4S)-4-hidroxi-2-[(4-metoxifenil)metil]pirrolidin-3-ilo]). La anisomicina es un potente inhibidor de la síntesis de proteínas e interfiere con la síntesis de proteínas y ADN inhibiendo la peptidil transferasa o el sistema ribosómico 80S. La anisomicina actúa como un activador de JNK, aumentando los niveles de fosfo-JNK. La anisomicina es también un antibiótico bacteriano. La anisomicina se identifica

por el n.º CAS 22862-76-6 y tiene la siguiente estructura química:

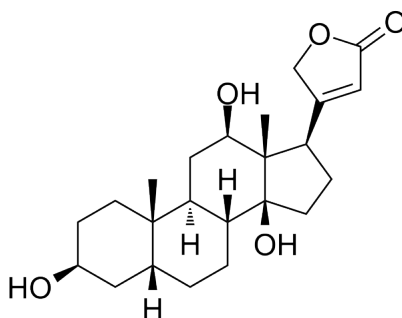


En algunas realizaciones, el potenciador de la secreción de proteínas (por ejemplo, anticuerpo) es cicloheximida (4-[(2R)-2-[(1S,3S,5S)-3,5-dimetil-2-oxociclohexil]-2-hidroxietil]piperidin-2,6-diona). La cicloheximida es una dicarboximida que es 4-(2-hidroxietil)piperidin-2,6-diona en la que uno de los hidrógenos unidos al carbono que porta el grupo hidroxilo se reemplaza por un grupo 3,5-dimetil-2-oxociclohexilo. Es un antibiótico producido por la bacteria *Streptomyces griseus*, y funciona como un metabolito bacteriano, un inhibidor de la síntesis de proteínas, un agente neuroprotector, un agente anticoronavírico y un inhibidor de la ferroptosis. Es un miembro de piperidonas, un antibiótico piperidínico, un fungicida antibiótico, una dicarboximida, un alcohol secundario y una cetona cíclica, y está relacionado funcionalmente con una piperidina-2,6-diona. La cicloheximida se identifica por el n.º CAS 17974-04-8 y tiene la siguiente estructura química:

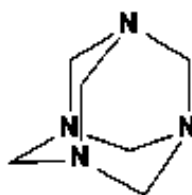


En algunas realizaciones, el potenciador de la secreción de proteínas (por ejemplo, anticuerpo) es digoxigenina (3-[(3S,5R,8R,9S,10S,12R,13S,14S,17R)-3,12,14-trihidroxi-10,13-dimetil-

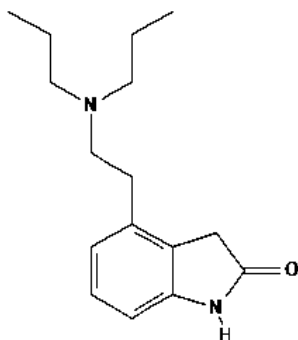
1,2,3,4,5,6,7,8,9,11,12,15,16,17-tetradecahidrociclopenta[a]fenantren-17-il]-2H-furan-5-ona). La digoxigenina es un hidroxiesteroide que consiste en 5-beta-cardanolida que tiene un doble enlace en la posición 20(22), así como grupos hidroxilo en las posiciones 3-beta, 12-beta y 14-beta. Ha sido aislado de las especies vegetales del género *Digitalis*, y funciona como un hapteno y un metabolito vegetal. La digoxigenina se identifica por el n.º CAS 1672-46-4 y tiene la siguiente estructura química:



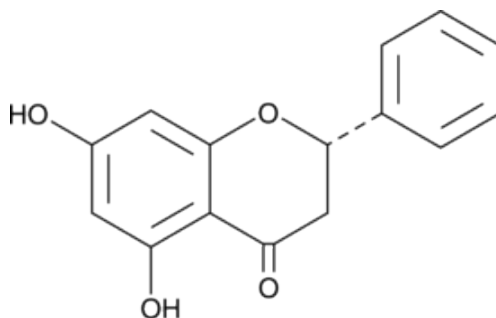
En algunas realizaciones, el potenciador de la secreción de proteínas (por ejemplo, anticuerpo) es metenamina (1,3,5,7-tetrazatriciclo[3.3.1.1^{3,7}.0]decano). La metenamina es un compuesto orgánico heterocíclico con actividad antibiótica. En el cuerpo, la metenamina se convierte en formaldehído, que es un agente bactericida no específico. La metenamina se usa normalmente a largo plazo para tratar infecciones urinarias crónicas y para prevenir la recurrencia de infecciones. La metenamina se identifica por el n.º CAS 37604-90-3 y tiene la siguiente estructura química:



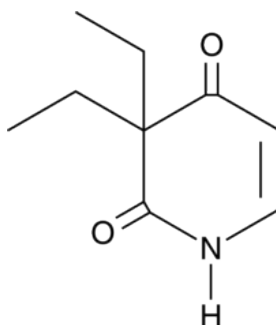
En algunas realizaciones, el potenciador de la secreción de proteínas (por ejemplo, anticuerpo) es ropinirol (4-[2-(dipropilamino)etil]-1,3-dihidroindol-2-ona). El ropinirol (SKF 101468) es un potente agonista del receptor D₃/D₂ activo por vía oral, pero sin afinidad por los receptores D₁. El ropinirol se identifica por el n.º CAS 91374-21-9 y tiene la siguiente estructura química:



En algunas realizaciones, el potenciador de la secreción de proteínas (por ejemplo, anticuerpo) es pinocembrina (5,7-dihidroxi-2-fenil-2,3-dihidro-4H-cromen-4-ona). La pinocembrina es un compuesto que se encuentra en *Pinus contorta* var. *latifolia*, y *Piper nigrum*. La pinocembrina se identifica por el n.º CAS 68745-38-0 y tiene la siguiente estructura química:



En algunas realizaciones, el potenciador de la secreción de proteínas (por ejemplo, anticuerpo) es piritildiona (3,3-dietil-1H-piridin-2,4-diona). La piritildiona es un fármaco psicoactivo y se identifica por el n.º CAS 77-04-3 y tiene la siguiente estructura química:



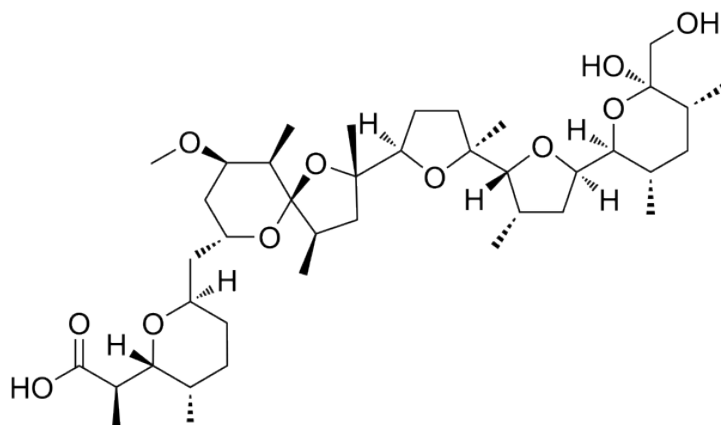
También se pueden usar análogos de los potenciadores ejemplificados anteriormente. Por "análogo" se entiende un compuesto que es un equivalente funcional a un compuesto de referencia y comparte la misma estructura

química central o similar. Un análogo de un compuesto incluye, por ejemplo, una sal o éster farmacéuticamente aceptable del compuesto.

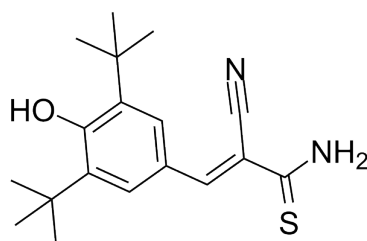
En algunas realizaciones, se añade un potenciador en el presente documento (por ejemplo, licorina o un análogo de la misma) al medio de cultivo celular para alcanzar una concentración de aproximadamente 0.1 μM a aproximadamente 1000 μM (por ejemplo, de aproximadamente 0.5 μM a aproximadamente 100 μM , o de aproximadamente 1 μM a aproximadamente 50 μM). En algunas realizaciones, se añade licorina (o un análogo de la misma) al medio de cultivo celular para alcanzar una concentración de aproximadamente 1 μM o aproximadamente 50 μM . En algunas realizaciones, se añade licorina (o un análogo de la misma) al medio de cultivo celular para alcanzar una concentración de aproximadamente 1 μM . En algunas realizaciones, se añade licorina (o un análogo de la misma) al medio de cultivo celular para alcanzar una concentración de aproximadamente 50 μM . En algunas realizaciones, se añade licorina (o un análogo de la misma) al medio de cultivo celular para alcanzar una concentración de al menos aproximadamente 1 μM .

B. Inhibidores de la secreción de proteínas

En algunas realizaciones, el inhibidor de la secreción de proteínas (por ejemplo, anticuerpo) es nigericina. La nigericina es un antibiótico derivado de *Streptomyces hygroscopicus* que funciona como un ionóforo K^+/H^+ , promoviendo el intercambio K^+/H^+ a través de las membranas mitocondriales. La nigericina también puede actuar como un activador de NLRP3 (dominio de unión a nucleótidos con repeticiones ricas en leucina [LRR] y receptor 3 que contiene pirina), lo que conduce a la liberación de $\text{IL-1}\beta$. Se ha descubierto que la nigericina promueve la eriptosis, un proceso que se acompaña de la formación de ROS y se atribuye en parte a la inducción del estrés oxidativo. Además, la nigericina desencadena la apoptosis. La nigericina se identifica por el n.º CAS 28380-24-7 y tiene la siguiente estructura química:



En algunas realizaciones, el inhibidor de la secreción de proteínas (por ejemplo, anticuerpo) es tirfostina AG 879 o “AG 879”. AG 879 es un inhibidor de la tirosina cinasa que inhibe eficazmente la fosforilación de TrkA y no tiene efecto inhibidor sobre TrkB y TrkC. Este compuesto también es un inhibidor selectivo de la tirosina cinasa ErbB2, con al menos 500 veces mayor especificidad por ErbB2 que por EGFR. AG 879 también ha demostrado actividad anticancerosa. AG 879 se identifica por el n.º CAS 148741-30-4 y tiene la siguiente estructura química:



También se pueden usar análogos de los inhibidores ejemplificados anteriormente. En algunas realizaciones, se añade un inhibidor en el presente documento (por ejemplo, nigericina o AG 879, o un análogo de los mismos) al medio de cultivo celular para alcanzar una concentración de aproximadamente 0.5 µg/ml a aproximadamente 500 µg/ml (por ejemplo, de aproximadamente 1 µg/ml a aproximadamente 100 µg/ml, de aproximadamente 5 µg/ml a aproximadamente 50 µg/ml, de aproximadamente 10 µg/ml a aproximadamente 100 µg/ml o de aproximadamente 10 µg/ml a aproximadamente 50 µg/ml). En algunas realizaciones, se añade nigericina (o un análogo de la misma) al medio de cultivo celular para alcanzar una concentración de aproximadamente 50

µg/ml. En algunas realizaciones, se añade nigericina (o un análogo de la misma) al medio de cultivo celular para alcanzar una concentración de al menos aproximadamente 50 µg/ml. En algunas realizaciones, se añade AG 879 (o un análogo del mismo) al medio de cultivo celular para alcanzar una concentración de aproximadamente 50 µg/ml. En algunas realizaciones, se añade AG 879 (o un análogo del mismo) al medio de cultivo celular para alcanzar una concentración de al menos aproximadamente 50 µg/ml.

A menos que se defina lo contrario en el presente documento, los términos científicos y técnicos usados en relación con la presente divulgación tendrán el significado comúnmente entendido por los expertos en la materia. A continuación, se describen métodos y materiales ilustrativos, aunque también se pueden utilizar métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento en la puesta en práctica o la evaluación de la presente divulgación. En caso de contradicción, prevalecerá la presente memoria descriptiva, incluidas las definiciones. Además, a menos que el contexto indique lo contrario, los términos en singular incluirán el plural y los términos en plural incluirán el singular. A lo largo de toda esta memoria descriptiva y las realizaciones, las palabras “tienen” y “comprenden”, o variaciones tales como “tiene”, “que tiene/n”, “comprende” o “que comprende/n”, se entenderá que implican la inclusión de un número entero o grupo de números enteros indicado, pero no la exclusión de ningún otro número entero o grupo de números enteros. Todas las publicaciones y otras referencias mencionadas en el presente documento se incorporan por referencia en su totalidad, como si cada referencia individual se indicara específica e individualmente que se incorporaría por referencia en su totalidad. Aunque aquí se citan varios documentos, esta cita no constituye una admisión de que alguno de estos documentos forme parte del conocimiento general común en la técnica. Como se utiliza en el presente documento, el término “aproximadamente” o “alrededor de”, según se aplica a uno o más valores de interés, se refiere a un valor que es similar a un valor de referencia indicado. En ciertas realizaciones, el término se refiere a un intervalo de valores que entra dentro del 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 % o menos en

cualquier dirección (mayor que o menor que) del valor de referencia indicado a menos que se indique otra cosa o que bien sea evidente por el contexto.

De acuerdo con la presente divulgación, se pretende que las retroreferencias en las reivindicaciones dependientes sean abreviaturas para una divulgación directa e inequívoca de todas y cada una de las combinaciones de reivindicaciones que se indican mediante la retroreferencia. Asimismo, los encabezados del presente documento se crean para facilitar la organización y no se pretende que limiten el alcance de la invención reivindicada de ninguna manera.

A fin de que se pueda entender mejor esta invención, se exponen los siguientes ejemplos. Estos ejemplos se proporcionan con fines ilustrativos únicamente y no se deben interpretar como limitantes del alcance de la invención de modo alguno.

EJEMPLO

A. Materiales y métodos

Cultivo celular, productos químicos y anticuerpos

Las células U2OS de osteosarcoma humano obtenidas del laboratorio de Kroemer se mantuvieron a 37 °C en una incubadora humidificada con 5% de CO₂ en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) complementado con 10 % de suero bovino fetal (FBS), 1% de penicilina-estreptomicina y 1% de HEPES (Gibco, Carlsbad, CA). Se obtuvieron células CHO-K1 (CCL-61) de la ATCC y se cultivaron a 37 °C en una incubadora humidificada con 5 % de CO₂ en una mezcla de nutrientes F-12 Ham's (Sigma, Saint-Louis, MO) complementada con FBS al 10 % y L-glutamina 2 mM (Gibco). Se cultivaron células CHO que expresaban PD-L1 en condiciones similares en medio complementado con 7.5 µg/ml de puromicina (Gibco). Prestwick, BML-2840 ICCB Known Bioactives y las Autophagy Compounds libraries se adquirieron de Prestwick Chemicals (Illkirch, Francia), Enzo Life Sciences (Farmingdale, NY) y TargetMol (Boston, MA), respectivamente. Los anticuerpos anti-estreptavidina (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX), anti-calreticulina (Abcam, Cambridge, GB), anti-SBP (Santa Cruz Biotechnology), de cadenas IgG pesadas y ligeras anti-humano (Invitrogen) y anti-GFP (Cell Signaling, Danvers, MA) se usaron a

diluciones 1:500, 1:200, 1:500, 1:5,000 y 1:1,000, respectivamente, en experimentos de inmunofluorescencia y transferencia de Western. El anticuerpo anti-PD-L1 humano de referencia usado en experimentos FACS se produjo en laboratorios Sanofi a partir de células transfectadas con construcciones de plásmidos basándose en las secuencias de cadenas pesadas y ligeras de atezolizumab publicadas disponibles en el sitio web de IMGT (imgt.org) (Lefranc et al., *Methods in Molecular Biology* (2018) 1827:35-69. Los anticuerpos anti-IgG de ratón y conejo conjugados con Alexa Fluor 568 y 488 secundarios (Life Technologies, Carlsbad, CA, EE.UU.) se usaron a diluciones 1:1,000 y 1:500, respectivamente, en experimentos de inmunofluorescencia y FACS. Los anticuerpos secundarios de cabra anti-ratón e IgG de conejo conjugados con HRP (Southern Biotech, Birmingham, AL) se usaron a una dilución 1:5000 en experimentos de transferencia de Western. El anticuerpo de cadena ligera kappa anti-humano (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) se usó a una dilución 1:4,000 en ELISA.

Cálculos usados para el sistema de secreción de anticuerpos RUSH

El plásmido estreptavidina-KDEL se describió en Zhao et al., *Sci Rep.* (2018) 8:14966. Las secuencias de aminoácidos de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo anti-PD-L1 atezolizumab disponible en IMGT se usaron para generar secuencias de ácido nucleico adaptadas a la expresión en células humanas. Se añadieron secuencias que codificaban un sitio escindible por furina (AVSKERSKRSP) (SEQ ID NO:63), un conector (G₄S)₃ (SEQ ID NO:1), proteína fluorescente verde potenciada (eGFP) y un péptido de unión a estreptavidina (SBP) en este orden, al extremo 3' de la secuencia codificante de cadena pesada anti-PD-L1. Las construcciones de cadenas pesadas y ligeras anti-PD-L1 se fabricaron por GeneArt (Ratisbonne, Alemania) y se proporcionaron en un vector lanzadera. Las secuencias de cadenas pesadas y ligeras se clonaron entonces en los sitios de clonación múltiple 2 y 1, respectivamente, del plásmido pVITRO1 (Invivogen, San Diego, CA) usando el kit de ensamblaje NEBuilder® (New England Biolabs, Ipswich, MA). La integridad de la construcción denominada posteriormente plásmido RUSH IgG anti-PD-L1 se confirmó mediante secuenciación (Eurofins, Luxemburgo).

Establecimiento de la línea celular RUSH-anticuerpo

Las células U2OS se transfectaron con el plásmido estreptavidina-KDEL usando Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific) y se seleccionaron en medio complementado con G418 (400 µg/ml, Gibco-Invitrogen) durante 2 semanas. Se usó la dilución limitante en placas de 96 pocillos para el aislamiento de una sola célula del conjunto seleccionado. Los clones se amplificaron y seleccionaron basándose en inmunofluorescencia de estreptavidina. El clon n.º BD6 que muestra la mayor expresión de estreptavidina se expandió adicionalmente en medio complementado con G418 (200 µg/ml) y se transfectó con el plásmido de IgG-RUSH anti-PD-L1 usando Lipofectamine 2000 y se seleccionó en medio complementado con G418 (200 µg/ml) e higromicina (100 µg/ml, Santa Cruz Biotechnology) durante 2 semanas. Se usó la dilución limitante en placas de 96 pocillos para el aislamiento de una sola célula a partir del conjunto seleccionado derivado del clon n.º BD6. Los clones se amplificaron y seleccionaron basándose en la fluorescencia de GFP y se seleccionó el clon n.º 7 para campañas de caracterización y cribado adicionales.

Inmunofluorescencia

Se sembraron células del clon U2OS n.º 7 en placas de formación de imágenes negras de 96 pocillos (Greiner bio One, Kremsmünster, Austria). Después de 24 h, el medio se retiró, las células se enjuagaron con PBS precalentado a 37 °C y se fijaron en PBS complementado con paraformaldehído al 4 % (PFA, Sigma) y 1 µg/ml de Hoechst (Life Technologies, Carlsbad, CA, EE.UU.) durante 20 min bajo agitación a temperatura ambiente (TA). Las células se enjuagaron con PBS antes de la adición de una disolución permeabilizante de FBS al 5 %/Triton X-100 al 0.3 %/PBS durante 30 min bajo agitación a TA. Las células se enjuagaron con PBS y se incubaron durante la noche con agitación a 4 °C con el anticuerpo primario en BSA/PBS al 1 %. Las células se lavaron con PBS y se incubaron durante 45 min bajo agitación a TA con el anticuerpo secundario en BSA/PBS al 1%. Finalmente, las células se lavaron y se procesaron para la adquisición de imágenes usando un BioImager IXM XL (Molecular Devices, Sunnyvale,

CA).

Expresión de anticuerpos y caracterización de secreción mediante inmunotransferencia Western

Se sembraron células del clon U2OS n.º 7 en matraces T-175 y se mantuvieron durante 24 h a 37 °C en una estufa de incubación humidificada con 5 % de CO₂. Al día siguiente, se retiró el sobrenadante, las células se enjugaron con PBS precalentado a 37 °C y se añadió al matraz un nuevo medio sin suero que no contenía biotina, biotina 40 µM o biotina 40 µM junto con 100 µM de inhibidor de furina I (Sigma) durante 4 h. Al final del tiempo de incubación, las células se recogieron y se lisaron en tampón RIPA (Thermo Fisher Scientific) complementado con inhibidores de proteasa y fosfatasa (Roche, Basilea, Suiza). Además, se recogieron los sobrenadantes de cultivo celular y se concentraron ~100 veces en una unidad de filtro Amicon de 50 kDa (Sigma) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las concentraciones de proteína en el lisado celular y en el sobrenadante concentrado se determinaron usando el kit de ensayo de proteína BCA™ (Thermo Fisher Scientific). Se resolvieron diez µg de contenido proteico total de lisados y sobrenadantes en geles Bis-Tris al 4-12 % NuPAGE™ (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.) en condiciones reductoras y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (BioRad) usando un sistema BioRad. Las membranas se bloquearon durante 1 h con Tween-20 al 0.01 %/5% de leche desnatada en polvo/TBS y los anticuerpos primarios se añadieron durante la noche bajo agitación a 4 °C. Las membranas se enjugaron con Tween-20 al 0.01 %/5% de leche desnatada en polvo/TBS y se incubaron durante 1 h con anticuerpos secundarios bajo agitación a 4 °C. Las membranas se lavaron luego 3 veces durante 5 min con Tween-20 al 0.01 %/TBS y la actividad peroxidasa se evaluó con reactivo de detección de transferencia Western Amersham ECL Prime (GE Healthcare, Little Chalfont, GB) en ImageQuant™ LAS4000 (GE Healthcare).

Validación por citometría de flujo de la reactividad de anticuerpos

Se prepararon sobrenadantes del cultivo celular del clon U2OS n.º 7 tal como se describió anteriormente y se usaron para evaluar la unión del anticuerpo RUSH a células que expresan PD-L1 mediante citometría de flujo.

Se recogieron tres millones de células CHO-K1 y CHO PD-L1, se enjuagaron con PBS y se incubaron durante 30 min a 4 °C bajo agitación en la oscuridad con 150 µl del atezolizumab recombinante preparado en los laboratorios de investigación de Sanofi o sobrenadante de cultivo celular concentrado del clon U2OS n.º 7. A continuación, las células se enjuagaron con PBS y se tiñeron secundariamente durante 30 min a 4 °C bajo agitación en la oscuridad con un anticuerpo IgG anti-humano acoplado a Alexa Fluor 647 antes del análisis por citometría de flujo de una disolución de 100 µl en un MACSQuant® (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania).

Cribado de compuestos de alto rendimiento para moduladores de la secreción de proteínas

Se sembraron células del clon U2OS n.º 7 en placas de formación de imágenes negras de 384 pocillos (Greiner bio one), 2,000 células/pocillo, y se incubaron durante 24 h a 37 °C en una estufa de incubación humidificada con 5 % de CO₂. Las células se trataron al día siguiente con los compuestos de la colección Prestwick a 20 µM o 10 µM, la colección ICCB Known Bioactives a 1/100^e o 1/1000^e, o la Autophagy Compound Library a 10 µM o 1 µM durante 4 h. Al final del tiempo de incubación, se añadió biotina a 40 µM durante 1 h (se usaron células no tratadas y células tratadas con DMSO como control). A continuación, las células se fijaron como se ha descrito anteriormente y se procesaron para la posterior adquisición automatizada de imágenes usando un BioImager IXM XL asistido por robot (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EE.UU.) equipado con una fuente de luz Sola (Lumencor, Beaverton, OR, EE.UU.), filtros de excitación y emisión adaptados (Semrock), una cámara sCMOS PCO.edge 5.5 monocromática de 16 bits (PCO, Kelheim, Alemania). Se usó un objetivo PlanApo de 20x (Nikon, Tokio, Japón) para adquirir un mínimo de 4 campos de visión en cada pocillo. Las imágenes adquiridas se procesaron usando el software R de acceso abierto (<https://www.r-project.org>) con la ayuda de paquetes disponibles gratuitamente EBImage (disponible en el repositorio Bioconductor <https://www.bioconductor.org>) y RBioFormats (<https://github.com/aoles/RBioFormats>), y los paquetes personalizados MetaxpR (<https://github.com/asauvat/MetaxpR>) y MorphR

(<https://github.com/kroemerlab/MorphR>). Los núcleos se detectaron primero usando la señal de Hoechst 33342 y se usaron como marcador para detectar áreas citoplásmicas basándose en la señal de GFP, lo que permitió la evaluación de la intensidad de GFP citoplásmica. Los datos se extrajeron posteriormente y se evaluaron estadísticamente usando R (<https://www.r-project.org>). Los datos se normalizaron usando controles negativos y positivos, se redujeron y se transformaron en una puntuación Z. Los experimentos se repitieron manualmente a baja escala con fármacos seleccionados para confirmar sus efectos sobre la secreción, en este segundo conjunto de ensayos, las células del clon U2OS n.º 7 incubadas con inhibidores de la secreción se fijaron y se tiñeron con Hoechst como se ha descrito anteriormente para la obtención de imágenes y la determinación de la viabilidad basándose en recuentos celulares.

ELISA

Se sembraron células del clon U2OS n.º 7 en placas de 6 pocillos y se mantuvieron durante 24 h a 37 °C en una estufa de incubación humidificada con 5 % de CO₂. Al día siguiente, se retiraron los sobrenadantes, las células se aclararon con PBS precalentado a 37 °C y se añadió un nuevo medio que contenía el tratamiento químico durante 4 h. Al final del tiempo de incubación, no se añadió biotina o se añadió biotina 40 µM al matraz durante 30 min (moléculas seleccionadas inhibidoras) o 1 h (moléculas seleccionadas por activador). A continuación, se recogieron los sobrenadantes y se usaron para el ensayo ELISA de la siguiente manera. Se recubrieron placas MaxiSorp de 96 pocillos (Thermo Fisher Scientific) con 0.5 µg/ml de hFc-humano-PD-L1 (R&D Systems, Mineápolis, MN) en PBS durante 5.5 h a TA. A continuación, se eliminó la disolución de recubrimiento y se añadió una disolución de bloqueo de BSA/PBS al 2 % durante la noche a 4 °C. Al día siguiente, los pocillos se lavaron 3 veces con una disolución de BSA al 0.5 %/Tween-20 al 0.05 %/PBS. Los sobrenadantes se añadieron después de una dilución 1/3 en BSA al 0.5 %/Tween-20 al 0.05 %/PBS, durante 2.3 h a TA. Los pocillos se lavaron 3 veces con disolución de BSA al 0.5 %/Tween-20 al 0.05 %/PBS. Se añadió anticuerpo acoplado a HRP anti-cadena ligera kappa humana diluido en BSA al

0.5 %/Tween-20 al 0.05 %/PBS a 1/4000^e durante 2.3 h a TA. Los pocillos se lavaron 3 veces con una disolución de BSA al 0.5 %/Tween-20 al 0.05 %/PBS antes de la incubación con un paquete de reactivos de sustrato (R&D Systems) durante 15 min en la oscuridad. A continuación, se añadieron cincuenta µl de solución STOP (R&D Systems) a cada pocillo y la absorbancia en cada pocillo se midió posteriormente a 450 nm, y 635 nm para la resta de fondo, usando un VICTOR™ X4 (PerkinElmer, Waltham, MA).

Estadística

A menos que se especifique lo contrario, los datos se presentan como media ± DE de dos réplicas en un mínimo de tres experimentos independientes. La significación estadística se evaluó usando la prueba de la U de Mann-Whitney.

B. Resultados

Diseño de un sistema RUSH de anticuerpos

El sistema RUSH está compuesto por un anzuelo que es estreptavidina, y un cebo que es una proteína fusionada a un péptido de unión a estreptavidina (SBP). Cuando estas dos moléculas se coexpresan, el cebo es secuestrado por el anzuelo debido a la interacción de estreptavidina/SBP de alta afinidad (K_D en el intervalo de 10^{-8} a 10^{-9} M) (Barrette-ng et al., *Acta Crystallographica. Sección D, Cristalografía Biológica* (2013) 69:879-87), y liberado tras la adición de biotina, que supera a SBP debido a su mayor afinidad por estreptavidina (K_D en el intervalo 10^{-14} M) (Delgadillo et al., *PLoS One* (2019) 14:e0204194). Los presentes inventores han usado aquí este ensayo basado en células para monitorizar la cinética de secreción de un anticuerpo (el cebo) y cribar colecciones de compuestos pequeños para identificar moduladores de secreción. Debido a que los anticuerpos se secretan a través de la vía convencional, el anzuelo de estreptavidina se fusionó a un péptido KDEL para asegurar su retención en el retículo endoplasmático (RE) a través de la interacción con los receptores KDEL presentes en el RE (Capitani, *FEBS Letters* (2009) 583:3863-71).

El anticuerpo también se modificó para ajustarse al propósito del ensayo. Se usó un vector policistrónico, que codifica las cadenas pesada y ligera

(kappa) de un anticuerpo específico para PD-L1 humano (Zhang et al., *Oncotarget* (2017) 8:90215-24). El extremo C de la cadena pesada se fusionó con un conector (Gly₄Ser)₃, un sitio escindible por furina, la proteína fluorescente verde (GFP) y SBP (**FIG. 1B**). Los presentes inventores razonaron que la molécula de fusión (denominada posteriormente anticuerpo RUSH) se ensamblaría en homodímeros maduros tras la síntesis de proteínas y permanecería en el RE debido a su interacción con el anzuelo de estreptavidina KDEL hasta la adición de biotina, lo que desencadenaría la liberación y maduración del anticuerpo RUSH en el Golgi en ruta al espacio extracelular (**FIG. 1A**). El clon que expresa el anzuelo y el cebo se obtuvo mediante transfección de células U2OS con la construcción que codifica el anzuelo, y la selección de un clon con altos niveles de expresión del anzuelo con el fin de garantizar una retención eficaz del cebo y minimizar la fuga en ausencia de biotina. Como se muestra en la **FIG. 1C**, la tinción del clon n.º BD6 con anticuerpos específicos de estreptavidina revela la colocalización del anzuelo con la proteína prototípica sésil en el RE calreticulina (Nomura et al., *Histochemistry and Cell Biology* (2011) 135:531-8). El clon n.º BD6 se transfectó adicionalmente con el vector codificante de anticuerpos RUSH seguido de clonación de células individuales y la selección del clon de anzuelo/cebo usado en este estudio (clon n.º 7). Este clon se seleccionó basándose en dos criterios: (i) una señal fluorescente dependiente de GFP brillante que indica una alta abundancia del anticuerpo RUSH y (ii) localización discreta de la señal de GFP en el área perinuclear que indica la retención en el RE (**FIG. 2A**). La observación videomicroscópica de fluorescencia de células del clon n.º 7 reveló que la GFP permanece en el mismo compartimento subcelular durante las 2 horas de adquisición.

Por el contrario, la adición de biotina dio como resultado la reubicación de la señal de GFP hacia puntos discretos que corresponden al aparato de Golgi en 40 a 120 min, y un decaimiento de la señal de GFP citoplasmática completa en 4 h lo más probable posible debido a la liberación de la proteína de fusión en el espacio extracelular (**FIG. 2A**). La señal de GFP colocalizada con estreptavidina en el nivel basal y la adición de biotina no modificó este

patrón, confirmando la retención del anzuelo en el RE independientemente de la presencia o ausencia de biotina en el medio. Por el contrario, la colocalización de GFP/estreptavidina se perdió 4 h después de la adición de biotina (**FIG. 2B**).

Estos resultados confirman la expresión del cebo, su retención en el RE a través del anzuelo y sugieren su liberación progresiva en el espacio extracelular tras la adición de biotina.

Validación bioquímica del sistema RUSH de anticuerpos

En el siguiente paso, los presentes inventores procedieron a la validación bioquímica del clon n.º 7 antes de su uso en una campaña de cribado. Con este objetivo, los presentes inventores caracterizaron las especies moleculares sintetizadas y liberadas por el clon n.º 7 cultivadas con o sin biotina y un inhibidor de la proteasa furina. Como se puede observar en la **FIG. 2C**, los anticuerpos específicos de GFP usados en experimentos de transferencia Western revelaron la presencia de una especie molecular principal de ~80 kDa y dos especies menores de ~55 y ~35 kDa en el lisado de células cultivadas en ausencia de biotina. La masa de 80 kDa es compatible con la cadena pesada de longitud completa del anticuerpo RUSH (masa teórica de 84 kDa) mientras que la masa de 35 kDa es compatible con el fragmento carboxiterminal de GFP-SBP de la cadena pesada que se libera tras la escisión por furina (masa teórica de 32 kDa). Un análisis similar realizado en el sobrenadante del cultivo celular con GFP, SBP y anticuerpos específicos de IgG humana solo reveló cantidades traza de proteína recombinante en ausencia de biotina (**FIG. 2D a 2F**). Esto es consistente con el menor procesamiento observado en los lisados celulares y, por lo tanto, la retención eficaz del anticuerpo RUSH en compartimentos intracelulares pre-Golgi tal como se documenta mediante inmunofluorescencia (**FIG. 2A y B**).

Cuando las células se cultivaron en presencia de biotina, el patrón de transferencia Western en el lisado celular no cambió, excepto que la intensidad de la señal era menor, lo que era concomitante con la detección de especies recombinantes en el sobrenadante de cultivos celulares (**FIG. 2C a 2F**). Esto demuestra que el decaimiento de GFP intracitoplásmica observado por

inmunofluorescencia en la **FIG. 2A y 2B** es una consecuencia directa de la liberación de proteínas en el espacio extracelular. Además, las masas moleculares del material detectadas en el sobrenadante sugieren un procesamiento casi completo del anticuerpo RUSH liberado. Esto se confirma
5 además por los patrones comparables obtenidos en los lisados celulares y en el sobrenadante del cultivo celular cuando las células se cultivan en presencia de inhibidor de furina. Por lo tanto, se puede concluir que el anticuerpo RUSH se libera a través de la red Golgi y se procesa tras la adición de biotina.

Todos juntos, estos hallazgos demuestran que el clon n.º 7 permite la liberación estimulada con biotina, así como la maduración proteolítica
10 dependiente de furina, del anticuerpo RUSH.

Validación inmunológica del sistema RUSH de anticuerpos

Además de la validación mecánica del clon n.º 7 en términos de producción, retención, maduración y liberación de anticuerpos tras la adición de biotina, los presentes inventores también abordaron las propiedades de unión a
15 PD-L1 del anticuerpo RUSH secretado. Un ELISA demostró la especificidad del anticuerpo RUSH por PD-L1 recombinante inmovilizado (no mostrado). Los inventores investigaron además las propiedades de unión del anticuerpo RUSH a PD-L1 en su conformación nativa cuando se presenta en la membrana
20 plasmática. Con este objetivo, el clon n.º 7 se incubó con biotina y el sobrenadante del cultivo celular se sometió a ensayo para determinar la unión a células CHO PD-L1^{pos} y PD-L1^{neg} mediante FACS. Como se puede observar en la **FIG. 3A y 3B**, se puede documentar la unión anti-PD-L1 recombinante nativa a PD-L1^{pos} (CHO-PDL1), pero no a células PD-L1^{neg} CHO (CHO-K1), lo
25 que valida el uso de dicho sistema para la caracterización adicional del anticuerpo RUSH. De manera similar, el sobrenadante del clon n.º 7 cultivado en presencia de biotina demostró actividad de unión a células CHO-PDL1 pero no a células CHO-K1 (**FIG. 3C y D**), lo que indica que el anticuerpo RUSH liberado conservó sus propiedades de unión a antígeno a pesar de la presencia
30 de aminoácidos adicionales en su extremo C, dejados después del procesamiento por furinas. Cabe destacar que la unión a PD-L1 también fue detectable en el sobrenadante del clon n.º 7 cultivado en presencia de biotina y

un inhibidor de la proteasa furina (**FIG. 3E y 3F**). En estas condiciones, la unión se detecta tanto a través del anticuerpo de tinción secundaria como del resto GFP del anticuerpo RUSH no procesado que no era detectable con el anticuerpo nativo (**FIG. 3B**) y solo se detectó muy ligeramente en el caso del sobrenadante del clon n.º 7 cultivado con biotina solamente (**FIG. 3D**).

En conjunto, estas observaciones indican que el clon n.º 7 es apto tanto para campañas de cribado como para caracterización adicional de anticuerpos en ensayos de unión a PD-L1.

Cribado farmacológico para moduladores de la liberación de anticuerpos inducida por biotina

A continuación, los presentes inventores buscaron usar el clon n.º 7 en campañas de detección para la identificación de fármacos capaces de potenciar o inhibir la secreción de anticuerpos. Para esto, el clon n.º 7 se cultivó en placas de 384 pocillos y se trató durante 4 h con fármacos de quimiotecas, seguido de la adición de biotina durante 1 h y la determinación del análisis de señales de GFP intracitoplásmica (**FIG. 4A**). El recuento celular se facilitó mediante contraintinción nuclear con Hoechst 33324 con el fin de evaluar la viabilidad y distinguir los efectos del fármaco sobre la cinética de secreción de la citotoxicidad directa y seleccionar fármacos relevantes para una caracterización adicional. Se realizaron dos campañas de cribado independientes para probar un total de 2,300 fármacos a 2 concentraciones diferentes (es decir, una concentración baja y una concentración 10 veces mayor denominada dosis “baja” y “alta” como se describe en la sección Materiales y Métodos).

La disminución inducida por biotina de la señal de GFP celular fue influenciada por una minoría de compuestos de diversas quimiotecas, tal como se indica mediante la representación gráfica de datos primarios (**FIG. 4B**) o análisis de puntuación Z (**FIG. 4C**). Como control interno, la brefeldina A, que es un inhibidor de la secreción de proteínas dependiente de Golgi convencional (Misumi et al., *J Biol Chem.*(1986) 261:11398-403), inhibió la disminución inducida por biotina de la señal de GFP (**FIG. 4B y C**). La representación de las puntuaciones Z obtenidas a las concentraciones bajas y altas para cada

compuesto (**FIG. 5A y B**) condujeron a la identificación de varios compuestos que disminuyeron consistentemente la señal fluorescente, actuando por lo tanto como activadores de la secreción. Con el fin de seleccionar los candidatos que se caracterizarán adicionalmente, se enumeraron los 20 mejores activadores identificados a la concentración baja o alta y, entre ellos, se preseleccionaron los activadores que trabajan a ambas concentraciones.

En la colección Prestwick, balsalazida sódica (ya no disponible comercialmente), metenamina, piritildiona, cicloheximida, digoxigenina, verteporfina y ropinirol cumplieron estos criterios (**FIG. 5A**). La verteporfina se eliminó debido a su fototoxicidad que conduce al blanqueo de GFP (datos no mostrados). En un cribado combinado que implicaba compuestos contenidos en dos colecciones adicionales (ICCB Known Bioactives y TargetMol Autophagy), varios compuestos adicionales, anisomicina, emetina y pinocembrina, fueron activos tanto a concentraciones bajas como altas. Adicionalmente, aunque la licorina no estaba entre los 20 compuestos más activos a la concentración alta, fue más eficaz que cualquier otro compuesto a baja concentración y, por lo tanto, se seleccionó (**FIG. 5B**).

También se identificaron varios fármacos que inhibían el decaimiento de la señal de GFP citoplasmática inducido por biotina, actuando por lo tanto como potenciales inhibidores de la secreción, entre los cuales se seleccionaron nigericina y tirfostina AG-879 para su caracterización adicional (**FIG. 5B**) debido a que no se han identificado previamente (Zhao et al., *Sci Rep.* (2018) 8:14966).

Validación de estimuladores e inhibidores de la liberación de anticuerpos inducida por biotina

Los exámenes de medio y alto rendimiento a menudo producen falsos resultados positivos y negativos, lo que exige una validación independiente en experimentos de bajo rendimiento con tecnologías ortogonales. En una primera ronda de experimentos, los presentes inventores evaluaron los efectos de compuestos preseleccionados con potencial actividad potenciadora de la secreción de anticuerpos. Los compuestos identificados en las campañas de cribado se evaluaron de nuevo en el clon n.º 7 a una concentración baja (**FIG.**

6A) o una concentración diez veces mayor (**FIG. 6B**) por su capacidad para aumentar la secreción de anticuerpos. Este experimento muestra que todos los aciertos seleccionados fueron activos a la concentración más alta, lo que confirma los resultados del cribado (**FIG. 6B**). Los presentes inventores

5 caracterizaron además estos aciertos en un ELISA de unión a PD-L1. En este sistema, el butirato de sodio indujo un aumento de dos veces de la liberación de anticuerpos RUSH tras la adición de biotina, como se esperaba a partir de su efecto en la expresión de proteínas (Jiang y Sharfstein, *Biotechnol Bioeng.* (2008) 100:189-94; Mimura et al., *J Imm Methods* (2001) 247:205-16). Entre los

10 fármacos evaluados, solo se consideró activa la licorina (evaluada tanto a 1 como a 50 μ M), aunque su efecto fue más leve que el del butirato de sodio, mientras que todos los demás compuestos no mostraron ninguna actividad estimuladora de la secreción de anticuerpos (**FIG. 6B**).

De manera similar, los inhibidores potenciales de secreción identificados

15 durante las campañas de cribado también se ensayaron en un ensayo especial. Tanto la nigericina como la tirfostina AG-879 (usadas a 50 μ g/ml) resultaron ser tan potentes como la brefeldina A en la supresión de la secreción de anticuerpos (**FIG. 7A**) sin afectar a la viabilidad celular (**FIG. 7B**). La obtención de imágenes celulares confirma además el efecto activador de la secreción de

20 la licorina y el efecto inhibidor de nigericina y tirfostina AG-879 (**FIG. 5C**).

C. Sumario

En el presente estudio, los presentes inventores proporcionan evidencia de que, usando un sistema RUSH compatible con anticuerpos, se cribaron con éxito colecciones de compuestos químicos pequeños usando un sistema de

25 obtención de imágenes de fluorescencia de alto rendimiento para la identificación de moduladores de la secreción de anticuerpos convencional. En este documento se presenta un activador novedoso y dos inhibidores novedosos de la secreción de anticuerpos validados por titulación de anticuerpos por ELISA.

30 La configuración de un sistema RUSH requiere la adición de SBP al anticuerpo para el direccionamiento reversible de RE y una proteína fluorescente (por ejemplo, GFP) para la monitorización por videomicroscopía

automatizada de la secreción de anticuerpos. Esto representa un desafío para los anticuerpos ya que las inmunoglobulinas y GFP no se originan normalmente a partir del mismo compartimento celular y se ha demostrado que la adición de secuencias extrañas a los anticuerpos interfiere con su secreción y

5 funcionalidad (Haas et al., *Methods Mol Biol.* (2012) 901:265-76; Luria et al., *MAbs.* (2012) 4:373-84). El mecanismo del ensamblaje de la cadena pesada y ligera de IgG antes de la secreción de anticuerpos maduros planteó otro desafío. De hecho, mientras que las cadenas pesadas de anticuerpos requieren ensamblaje con cadenas ligeras para la secreción, podría secretarse la cadena ligera libre. Por lo tanto, los presentes inventores optaron por retener el anticuerpo RUSH a través de su cadena pesada con el fin de monitorizar con confianza la secreción de anticuerpos completamente ensamblados. Teniendo en cuenta todas las restricciones, se añadió la maquinaria RUSH al extremo carboxiterminal de la cadena pesada anti-PD-L1. También se añadió un sitio de escisión por furina entre la cadena pesada y la construcción RUSH para la eliminación de las secuencias de SBP y GFP más allá de la red Golgi, que podría afectar a las funciones del anticuerpo de otro modo. Los datos de los presentes inventores muestran que el anticuerpo de longitud completa no escindido conservó su especificidad y fue detectable a través de su resto GFP.

20 Entre los dos compuestos únicos que provocaron la retención del anticuerpo RUSH en el citoplasma, la tirfostina AG-879 se caracteriza como un inhibidor de la tirosina cinasa ($CI_{50} = 10 \mu M$) y podría validarse como un inhibidor de la secreción de anticuerpos cuando se usó a una concentración de 50 $\mu g/ml$. La nigericina también se ha confirmado como un inhibidor de la secreción cuando se usa a una concentración de 50 $\mu g/ml$.

25 Nuestras campañas de cribado también condujeron a la identificación de moléculas candidatas que aumentaron la secreción de anticuerpos en el sistema RUSH estimulado por biotina debido a que disminuyeron la señal de fluorescencia intracitoplásmica de GFP, entre las cuales se seleccionaron 8 compuestos (anisomicina, cicloheximida, digoxigenina, licorina, metenamina, ropinirol, pinocembrina y piritildiona) para su caracterización adicional mediante ELISA. Este ensayo mide la unión del anticuerpo RUSH a su diana PD-L1

inmovilizada y se usó para medir los títulos de anticuerpos en células tratadas con moléculas candidatas. Inesperadamente, entre estos 8 compuestos que redujeron de manera consistente la fluorescencia de GFP intracitoplásmica, que se interpretó como liberación acelerada de anticuerpos, solo se demostró que la licorina aumentaba los títulos de anticuerpos RUSH en el sobrenadante de cultivo celular tratado. Por el contrario, el hecho de que la licorina se validara en ambos ensayos y en varios experimentos independientes sugiere fuertemente su efecto estimulador sobre la secreción de anticuerpos en nuestro sistema.

La licorina probablemente tiene múltiples efectos sobre la biología celular con varias dianas celulares y una utilidad propuesta para indicaciones bastante diversas, incluyendo cáncer (Roy et al., *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapy* (2018) 107:615-24), infección fúngica (Zhao et al., *Biotechnology Letters* (2021) 43:1503-12) y enfermedad de Alzheimer (Kola et al., *Int J Mol Sci.*(2023) 24(3):2500); sin embargo, no se publica ningún efecto sobre la secreción al mejor de nuestros conocimientos.