

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 375 610**

51 Int. Cl.:
C07K 14/435 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
C12N 15/12 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)
G01N 33/533 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **04764797 .9**
96 Fecha de presentación: **03.09.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1664102**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **07.06.2006**

54 Título: **FOTOPROTEINA MTCICLINA AISLADA Y SU USO.**

30 Prioridad:
16.09.2003 DE 10342670

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
02.03.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
02.03.2012

73 Titular/es:
AXXAM S.P.A.
VIA OLGETTINA, 58
20132 MILANO, IT

72 Inventor/es:
GOLZ, Stefan;
MARKOVA, Svetlana;
BURAKOVA, Ludmila;
FRANK, Ludmila y
VYSOTSKI, Eugene

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 375 610 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

Fotoproteína mtCiclina aislada y su uso

La invención se refiere a la fotoproteína mtClitina, a sus secuencias de nucleótidos y de aminoácidos, y a la actividad y uso de la fotoproteína mtClitina.

5 **Fotoproteínas**

La bioluminiscencia se refiere al fenómeno de generación de luz por los organismos vivos. Es el resultado de reacciones bioquímicas en células, reacciones en las que la energía química se emite en forma de cuantos de luz (que también se denomina emisión fría por quimioluminiscencia). La luz generada de este modo es monocromática, ya que se emite durante una transferencia de electrones discretos, pero se puede desplazar a regiones del espectro de mayor longitud de onda mediante pigmentos luminiscentes secundarios (por ejemplo, proteínas fluorescentes en medusas luminiscentes del género *Aequora*).

La función biológica es múltiple: a una profundidad marina de entre 200 y 1000 m (región mesopelágica), aproximadamente el 90 % de todos los organismos vivos brilla. Aquí, las señales luminiscentes se emplean para atraer a la pareja, como engaño y como cebo. Los gusanos brillantes y las luciérnagas también explotan las señales de luz para atraer a la pareja. Por el contrario, el significado de la luminiscencia de las bacterias, hongos y algas monocelulares no está claro. Se supone que se usa para coordinar muchos individuos únicos de una gran población o constituye una clase de reloj biológico.

Un gran número de celentéreos son bioluminiscentes (Morin y col., 1974). Estos organismos emiten luz azul o verde. La aequorina, que deriva de *Aequoria victoria* y que, en 1962, fue la primera proteína productora de luz que se identificó (Shimomura et al., 1969), emitió, como proteína aislada, una luz azul y no una luz verde como se observó fenotípicamente en el caso de *Aequoria victoria*. Más tarde, se aisló la proteína verde fluorescente (GFP) de *Aequoria victoria*, proteína que hace que la medusa aparezca fenotípicamente verde como resultado de la excitación mediante aequorina (Johnson y col., 1962; Hastings y col., 1969; Inouye y col., 1994). Otras fotoproteínas que también se han identificado y descrito son clitina (Inouye y col., 1993), mitrocomina (Fagan y col., 1993) y obelina (Illarionov y col., 1995).

Tabla 1: Resumen de algunas fotoproteínas. En la tabla se proporcionan el nombre, el organismo del que se ha aislado la proteína y el número de identificación (Nº Reg.) de la entrada en la base de datos.

Nombre	Organismo	Nº de identificación
Obelina	<i>Obelia geniculata</i>	AAL86372
Clitina	<i>Clytia gregaria</i>	CAA49754
Acuorina	<i>Aequorea macrodactyla</i>	AAK02061
Acuorina	<i>Aequorea parva</i>	AAK02060
Mitrocomina	<i>Mitrocoma cellularia</i>	AAA29298
Folasina	<i>Pholas dactylus</i>	AAM18085
?	<i>Symplectoteuthis oualaniensis</i>	AX305029

Tabla 2: Resumen de algunas fotoproteínas. En la tabla se proporcionan el organismo del que se ha aislado la proteína, el nombre de la fotoproteína y una selección de patentes o solicitudes.

Organismo	Proteína fluorescente	Patente/Solicitud
<i>Obelia geniculata</i>	Obelina	WO03006497
<i>Clytia gregaria</i>	Clitina	WO03006497
<i>Aequoria victoria</i>	Acuorina	WO200168824 US-0908909 US 6,152,358 JP-0176125
<i>Pholas dactylus</i>	Folasina	WO0028025 GB-0024357

Actualmente, la bioluminiscencia se usa en la tecnología de muchos modos, por ejemplo en forma de bioindicadores de contaminación o en bioquímica para la detección sensible de proteínas, para la determinación cuantitativa de compuestos específicos o como lo que se conoce como "indicador" en el estudio de la regulación génica en células.

5 Las fotoproteínas no solo difieren en sus secuencias de nucleótidos y de aminoácidos, sino también en sus propiedades bioquímicas y físicas.

Se ha demostrado que las propiedades físicas y bioquímicas de las fotoproteínas se pueden modificar a través de la alteración de la secuencia de aminoácidos. En la literatura se describen ejemplos de fotoproteínas mutageneizadas (documentos se 6.495.355; US 5.541.309; US 5.093.240; Shimomura y col., 1986).

10 Las fotoproteínas mencionadas anteriormente generan luz oxidando la coelenterazina (Haddock y col., 2001; Jones y col., 1999).

15 Markeva SV y col., Biochemistry, Volumen 41, N° 7, 19 de febrero de 2002, páginas 2227-2236, divulgan la clonación, el análisis de la secuencia y la expresión de la proteína obelina del hidroide pelagial bioluminiscente *Obelia geniculata*. El documento WO 91/01305 describe proteínas bioluminiscentes y su uso como marcadores/indicadores, entre otras, las fotoproteínas acuorina y obelina (página 7, líneas 17-21). El documento también describe la posibilidad de unión de las proteínas mencionadas anteriormente a un péptido señal para el transporte al interior de los orgánulos celulares, tales como, por ejemplo, la mitocondria o el retículo endoplásmico (página 8, líneas 9-26).

20 Dunstan SL y col., Journal of Biological Chemistry, Volumen 275, N° 13, 31/3/2000, páginas 9403-9409, divulga la fotoproteína folasina de *Pholas dactylus*, que contiene un péptido señal natural con 20 aminoácidos para la secreción de la proteína (resumen, página 9407, columna de la derecha, líneas 14-16).

Sistemas indicadores

El término gen indicador se refiere, en general, a genes cuyos productos génicos pueden detectarse fácilmente usando sencillos procedimientos bioquímicos o histoquímicos. Se puede distinguir entre al menos 2 tipos de genes indicadores.

25 1. Genes de resistencia. La expresión genes de resistencia se refiere a genes cuya expresión confiere, sobre una célula, resistencia a antibióticos u otras sustancias cuya presencia en el medio de crecimiento produce la muerte de la célula si el gen de resistencia no está.

30 2. Genes indicadores. En la manipulación genética, los productos de los genes indicadores se usan en forma de indicadores condensados o no condensados. Entre los genes indicadores más usados se incluyen los de la beta-galactosidasa (Alam y col., 1990), fosfatasa alcalina (Yang y col., 1997; Cullen y col., 1992), luciferasas y otras fotoproteínas (Shinomura, 1985; Phillips GN, 1997; Snowdowne y col., 1984).

La luminiscencia se refiere a la emisión de fotones en el intervalo del espectro visible, efectuándose mediante moléculas emisoras excitadas. En contraste con la fluorescencia, aquí, la energía no se suministra desde el exterior en forma de radiación de una longitud de onda más corta.

35 Se establece una distinción entre quimioluminiscencia y bioluminiscencia. Una reacción química que tiene como resultado una molécula excitada que brilla cuando los electrones excitados vuelven al estado basal se denomina quimioluminiscencia. Si esta reacción es catalizada por una enzima, el fenómeno se denomina bioluminiscencia. Las enzimas implicadas en la reacción se denominan, en general, luciferasas.

Clasificación de la especie *Clytia gregaria*

40 Cnidaria → Leptomedusae → Campanulariidae → *Clytia gregaria*

La especie *Clytia gregaria* pertenece a los cnidarios, específicamente a las medusas. El fenotipo bioluminiscente o fluorescente ya se describió en 1998 (Ward y col., 1998).

Aislamiento del ADNc

45 Para Investigar la actividad bioluminiscente de la especie *Clytia gregaria*, se obtuvieron especímenes en el Mar Blanco (Estación Biológica de Kartesh, Rusia) y se almacenaron en nitrógeno líquido. Para establecer las bibliotecas de ADNc de *Clytia gregaria*, se aisló el poli(a)+ARN con la ayuda del procedimiento de aislamiento "Straight A" de Novagen (EE.UU.).

Para preparar en ADNc se llevó a cabo una PCR-RT. Con este fin, se incubó 1 µg de ARN con la transcriptasa inversa (Superscript Gold II) de acuerdo con el esquema siguiente:

50

5	PCR	1.	30	segundos	95 °C
		2.	6	minutos	68 °C
		3.	10	segundos	95 °C
		4.	6	minutos	68 °C
			17	ciclos de la etapa 4 después de la etapa 3	

Para inactivar la polimerasa, los productos de reacción se incubaron durante 30 minutos con proteinasa K a 37 °C y el ADNc se precipitó con etanol. La expresión de la biblioteca de ADNc se llevó a cabo con la ayuda del "kit de construcción de bibliotecas de ADNc SMART" de Clontech (EE.UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADNc se clonó en el vector de expresión pTriplEx2 (Clontech; EE.UU.). Los vectores de expresión se transformaron mediante electroporación en bacterias de la cepa E. coli XL1-Blue.

Las bacterias se sembraron en placas con medio nutritivo LB sólido y se incubaron durante 24 horas a 37 °C. Después, se repitió la siembra en placas transfiriendo las bacterias a otra placa con medio nutritivo sólido usando un filtro de nitrocelulosa. La placa duplicada, a su vez, se incubó durante 24 horas a 37 °C y las colonias bacterianas que habían crecido se transfirieron a medio líquido LB. Después de la adición de IPTG (concentración final 0,1 mM), las bacterias se incubaron durante 4 horas a 37 °C en un agitador. Las bacterias se recogieron mediante centrifugación y la biomasa bacteriana se resuspendió a 0 °C en 0,5 ml de tampón de alteración (EDTA 5 mM, Tris-HCl 20 mM, pH 9,0) a 0 °C. Las bacterias se rompieron después mediante sonicación.

Tras la adición de coelenterazina (concentración final 10E-07 M), los lisados se incubaron durante 3 horas a 4 °C. Después, se midió la bioluminiscencia usando un luminómetro, tras la adición de cloruro cálcico (concentración final 20 mM).

Se identificó una fotoproteína. La fotoproteína se denominó mtClitina. La fotoproteína mtClitina se describe con detalle más adelante en el presente documento.

Con una identidad del 87 %, la fotoproteína mtClitina muestra el grado más elevado de homología a nivel de aminoácidos con la clitina de *Clytia gregaria*, y una identidad del 77 % con obelina de *Obelia geniculata* (mostrado en el ejemplo 8, Figura 8). La homología del 87 %, en relación con la clitina, se revela en el extremo C de la proteína, identificándose múltiples sustituciones de aminoácidos, distribuida por toda la proteína. A nivel de ácido nucleico, la identidad es inferior al 30 % (mostrado en el Ejemplo 7; Figura 7). Para comparar la secuencia se usó el procedimiento BLAST (Altschul y col., 1997).

La fotoproteína mtClitina tiene un péptido señal que puede conducir a la translocación de la fotoproteína al interior de las mitocondrias. El péptido señal se identificó mediante el programa informático MITOPROT (Claros y col., 1996) (mostrado en el Ejemplo 10). El péptido señal identificado mediante MITOPROT se muestra en la SEC ID N° 3. La fotoproteína mtClitina es la primera fotoproteína en la que se identificó un péptido señal natural para la translocación a las mitocondrias.

También se describen equivalentes funcionales de la mtClitina. Equivalentes funcionales son las proteínas que tienen propiedades fisicoquímicas comparables y que tienen una homología de al menos un 70 % con la SEC ID N° 2. Se prefiere una homología de al menos un 80 % o un 90 %. Especialmente preferida es una homología de al menos un 95 %.

La fotoproteína mtClitina es adecuada como gen indicador para los sistemas celulares, específicamente para receptores, canales iónicos, transportadores, factores de transcripción o para sistemas inducibles.

Como fusión con genes indicadores, el péptido señal de la mtClitina es también adecuado como gen indicador condensado para los sistemas celulares, específicamente para receptores, canales iónicos, transportadores, factores de transcripción o para sistemas inducibles.

La fotoproteína mtClitina también es adecuada como gen indicador mediante marcaje, identificación y caracterización de orgánulos celulares, especialmente para mitocondrias.

La fotoproteína mtClitina también es adecuada como gen indicador para determinar parámetros dentro y fuera de orgánulos celulares, específicamente mitocondrias, específicamente las concentraciones de calcio.

La fotoproteína mtClitina es adecuada como gen indicador en sistemas bacterianos y eucariotas, específicamente en células de mamífero, en bacterias, en levaduras, en baculovirus, en plantas.

La fotoproteína mtClitina es adecuada como gen indicador para sistemas celulares en combinación con sistemas bioluminiscentes o quimioluminiscentes, específicamente sistemas con luciferasas, con oxigenasas, con fosfatasa.

Como proteína de fusión, la fotoproteína mtClitina es adecuada específicamente para receptores, canales iónicos, transportadores, factores de transcripción, proteinasas, quinasas, fosfodiesterasas, hidrolasas, peptidasas, transferasas, proteínas de membrana y glicoproteínas.

5 La fotoproteína mtClitina es adecuada para su inmovilización, específicamente mediante anticuerpos, mediante biotina o mediante soportes magnéticos o magnetizables.

La fotoproteína mtClitina es adecuada como proteína para sistemas de transferencia de energía, especialmente sistemas FRET (transferencia de energía por resonancia de fluorescencia), BRET (transferencia de energía por resonancia de bioluminiscencia), FET (transistores de efecto de campo), FP (polarización de fluorescencia), HTRF (fluorescencia resuelto por tiempo homogéneo).

10 La fotoproteína mtClitina es adecuada para marcar sustratos o ligandos, específicamente para proteasas, para quinasas, para transferasas.

La fotoproteína mtClitina es adecuada para expresar en sistemas bacterianos, específicamente para la determinación de títulos, como sustrato para sistemas bioquímicos, específicamente para proteinasas y quinasas.

15 La fotoproteína mtClitina es adecuada como marcador, específicamente acoplado a anticuerpos, acoplado a enzimas, acoplado a receptores, acoplado a canales iónicos y a otras proteínas.

La fotoproteína mtClitina es adecuada como gen indicador en la búsqueda de compuestos farmacológicos activos, específicamente en HTS (detección selectiva de alto rendimiento).

20 La fotoproteína mtClitina es adecuada como componente de sistemas de detección, específicamente para ensayos ELISA (ensayo de inmunosorción ligado a enzimas), para inmunohistoquímica, para transferencias de tipo Western, para microscopia confocal.

La fotoproteína mtClitina es adecuada como marcador para analizar las interacciones, específicamente para interacciones proteína-proteína, para interacciones ADN-proteína, para interacciones ADN-ARN, para interacciones ARN-ARN, para interacciones ARN-proteínas (ADN: Ácido desoxirribonucleico; ARN: ácido ribonucleico).

25 La fotoproteína mtClitina es adecuada como marcador o proteína de fusión para su expresión en organismos transgénicos, específicamente en ratones, en ratas, en hámsteres, en otros mamíferos, en primates, en peces, en gusanos, en plantas.

La fotoproteína mtClitina es adecuada como marcador o proteína de fusión para analizar el desarrollo embrionario.

La fotoproteína mtClitina es adecuada como marcador a modo de un mediador de acoplamiento, específicamente mediante biotina, mediante NHS (N-hidroxisulfosuccimida), mediante CN-Br.

30 La fotoproteína mtClitina es adecuada como indicador que está acoplado a ácidos nucleicos, específicamente a ADN o ARN.

La fotoproteína mtClitina es adecuada como indicador que está acoplado a proteínas o péptidos.

La fotoproteína mtClitina es adecuada como indicador para medir las concentraciones de calcio intracelulares o extracelulares.

35 La fotoproteína mtClitina es adecuada para caracterizar cascadas de señales en sistemas celulares.

La fotoproteína mtClitina, acoplada a ácidos nucleicos o péptidos, es adecuada como sonda, específicamente para transferencias de tipo Northern, para transferencias de tipo Southern, para transferencias de tipo Western, para ELISA, para secuenciación de ácido nucleico, para análisis de proteínas o para análisis en circuitos.

40 La fotoproteína mtClitina es adecuada para marcar formulaciones farmacológicas, específicamente agentes infecciosos, anticuerpos, "moléculas pequeñas".

La fotoproteína mtClitina es adecuada para investigaciones geológicas, especialmente para aguas pelágicas, aguas subterráneas y corrientes fluviales.

45 La fotoproteína mtClitina es adecuada para su expresión en sistemas de expresión, específicamente en sistemas de traducción in vitro, en sistemas bacterianos, en sistemas de levaduras, en sistemas de baculovirus, en sistemas víricos, en sistemas eucarióticos.

La fotoproteína mtClitina es adecuada para visualizar tejidos o células en relación con intervenciones quirúrgicas, específicamente en el caso de intervenciones invasivas, no invasivas, mínimamente invasivas.

La fotoproteína mtClitina es también adecuada para marcar tejidos tumorales y otros tejidos alterados fenotípicamente, específicamente en investigación hidrológica y en relación con intervenciones quirúrgicas

También se describe la purificación de la fotoproteína mtClitina, específicamente como la proteína silvestre, como una proteína de fusión, como proteína mutageneizada.

También se describe la purificación del péptido señal de mtClitina, específicamente como la proteína silvestre, como una proteína de fusión, como proteína mutageneizada.

- 5 También se describe el uso de la fotoproteína mtClitina en el campo de la cosmética, específicamente aditivos para el baño, lociones, jabones, pinturas corporales, pasta de dientes, polvos corporales.

También se describe el uso de la fotoproteína mtClitina para pigmentar específicamente colorantes alimentarios, aditivos para baño, tinta, materiales textiles y plásticos.

- 10 También se describe el uso de la fotoproteína mtClitina para pigmentar papel, específicamente tarjetas de felicitación, productos de papel, papel de empapelar y artículos artesanía.

También se describe el uso de la fotoproteína mtClitina para pigmentar líquidos, específicamente para pistolas de agua, fuentes, bebidas, hielo.

También se describe el uso de la fotoproteína mtClitina para la producción de juguetes, específicamente pintura para dedos y maquillaje.

- 15 La invención se refiere a moléculas de ácido nucleico que codifican el polipéptido divulgado por la SEC ID N° 2.

La invención se refiere al polipéptido con la secuencia de aminoácidos divulgada en la SEC ID N° 2.

También se describen moléculas de ácido nucleico seleccionadas del grupo que consiste en

- 20 a) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que contiene la secuencia de aminoácidos divulgada por la SEC ID N° 2;
- b) las moléculas de ácido nucleico que contienen la secuencia representada por la SEC ID N 1;
- c) las moléculas de ácido nucleico cuya hebra complementaria hibrida con una molécula de ácido nucleico de a) o b) en condiciones rigurosas y que codifican un polipéptido que exhibe la función biológica de una fotoproteína;
- 25 Se puede efectuar una hibridación rigurosa de moléculas de ácido nucleico en, por ejemplo, una solución acuosa que comprende 0,2 x SSC (1 x solución salina estándar-citrato= NaCl 150 mM, citrato trisódico 15 mM) a 68 °C (Sambrook y col., 1989).
- d) moléculas de ácido nucleico que difieren de las moléculas de ácido nucleico mencionadas en c) como resultado de la degeneración del código genético;
- 30 e) las moléculas de ácido nucleico que exhiben una homología de secuencia de al menos 95 % con la SEC ID N 1 y cuyo producto proteico tiene la función biológica de una fotoproteína; y
- f) las moléculas de ácido nucleico que tienen una homología de secuencia de al menos 65 % con la SEC ID N 1 y cuyo producto proteico tiene la función biológica de una fotoproteína.

- 35 También se describen moléculas de ácido nucleico que tienen una homología de secuencia de al menos 95 %, 90 %, 85 %, 80 %, 75 %, 70 %, 65 % o 60 % con la SEC ID N 1 y que codifican un polipéptido que tiene las propiedades de una fotoproteína.

La invención se refiere a las moléculas de ácido nucleico de acuerdo con la invención en las que la secuencia contiene un promotor funcional en 5' de la secuencia codificadora de la fotoproteína o de la secuencia de codificación de la secuencia líder, o secuencia señal.

- 40 La invención también se refiere a las moléculas de ácido nucleico de acuerdo con la invención, que son un componente de vectores de ADN o ARN recombinantes.

La invención se refiere a organismos no humanos que contienen dicho vector.

La invención se refiere a fotoproteínas que están codificadas por las secuencias de nucleótidos de acuerdo con la invención.

- 45 La invención se refiere a procedimientos de expresión de los polipéptidos de fotoproteína de acuerdo con la invención en bacterias, en células eucariotas o en sistemas de expresión in vitro.

Se describen péptidos que tienen más de 5 aminoácidos consecutivos que son reconocidos inmunológicamente por anticuerpos contra las fotoproteínas de acuerdo con la invención.

- 50 La invención se refiere al uso de los ácidos nucleicos que codifican fotoproteínas de acuerdo con la invención como genes marcadores o genes indicadores, en particular para buscar compuestos farmacológicos activos y para diagnóstico.

La invención se refiere al uso de las fotoproteínas de acuerdo con la invención o a un ácido nucleico que codifica la fotoproteína de acuerdo con la invención como marcador o indicador o como gen marcador o gen indicador.

5 La invención se refiere al uso de la fotoproteína mtClitina (SEC ID N° 2) o al uso de un ácido nucleico que codifica la fotoproteína mtClitina como marcador o indicador, o como gen marcador o gen indicador, en particular para buscar compuestos farmacológicos activos y para diagnóstico.

La invención se refiere al uso del ácido nucleico mostrado en la SEC ID N° 1 como gen marcador o indicador, en particular para buscar compuestos farmacológicos activos y diagnósticos.

También se describen anticuerpos policlonales o monoclonales que reconocen un polipéptido de acuerdo con la invención.

10 También se describen anticuerpos policlonales o monoclonales que reconocen un la fotoproteína mtClitina (SEC ID N° 2).

Expresión de las fotoproteínas de acuerdo con la invención

15 Expresión se refiere a la generación de una molécula que, después de que se ha introducido el gen en una célula huésped adecuada, permite que el gen heterólogo que se clona en un vector de expresión se transcriba y se traduzca. Los vectores de expresión contienen las señales control requeridas para expresar genes en células procariontas o eucariotas.

20 En principio, los vectores de expresión se pueden interpretar de dos modos diferentes. En el caso de lo que se denomina fusiones de transcripción, la proteína codificada por el gen heterólogo clonado se sintetiza como una proteína auténtica biológicamente activa. Con este fin, el vector de expresión porta todas las señales de control en 5' y 3' para expresión.

25 En el caso de lo que se denomina fusiones de traducción, la proteína codificada por el gen heterólogo clonado se expresa como proteína híbrida junto con otra proteína que se puede detectar fácilmente. Las señales control en 5' y 3', que son necesarias para la expresión, incluido el codón de iniciación y, posiblemente, algunas de las secuencias que codifican las regiones en N-terminal de la proteína híbrida que se va a formar, se originan del vector. El resto proteico insertado adicional, en muchos casos, no solo estabilizará la proteína codificada por el gen heterólogo clonado contra la degradación por acción de las proteasas celulares, sino también se puede usar para detectar y aislar la proteína híbrida formada. La expresión puede tener lugar de forma temporal o estable. Los organismos huésped adecuados no solo son bacterias, levaduras y virus, sino también sistemas eucarióticos.

Purificación de las fotoproteínas de acuerdo con la invención

30 El aislamiento de las proteínas (incluido después de su sobreexpresión) con frecuencia se denomina purificación de proteínas. Se dispone de un gran número de técnicas y procedimientos establecidos para purificar proteínas.

35 La separación de sólidos/líquidos es una operación básica en relación con el aislamiento de las proteínas. Esta etapa del procedimiento es necesaria para separar las células del medio de cultivo, para aclarar el extracto bruto después de la rotura de las células y eliminación de los residuos celulares y para separar los sedimentos después de las precipitaciones, y similares. Se realiza mediante centrifugación y filtración.

Para obtener proteínas intracelulares, la pared celular se debe destruir o hacer permeable. Con este fin se usan homogeneizadores de presión alta o molinos de bolas con agitación o molinos de esferas de cristal, en función de la escala y del organismo. Los tratamientos de integración celular mecánica y de sonicación se usan, entre otras, a escala de laboratorio.

40 Tanto en el caso de proteínas extracelulares como en el caso de proteínas intracelulares (tras la rotura de la célula), varios procedimientos de precipitación que usan sales (en particular sulfato amónico) o disolventes orgánicos (alcoholes o acetonas) representan procedimientos rápidos y eficientes para concentrar proteínas. Cuando se purifican proteínas intracelulares, es deseable eliminar los ácidos nucleicos solubles (precipitación con, por ejemplo, sulfato de estreptomina o sulfato de protamina). Cuando se aíslan proteínas extracelulares, con frecuencia se añaden transportadores (por ejemplo almidón, kieselguhr) antes de añadir los agentes de precipitación con el fin de obtener precipitados que sean más fáciles de manipular.

45 Se dispone de numerosos procedimientos cromatográficos y procedimientos de reparto (Cromatografía de absorción, cromatografía de intercambio iónico, filtración en gel, cromatografía de afinidad, electroforesis) para purificación de alto grado. La cromatografía en columna también se usa a escala industrial. La cromatografía de afinidad, que hace posible factores de purificación de hasta varias centenas por etapa, es especialmente importante para las operaciones a escala de laboratorio.

Las proteínas extracelulares se generan en soluciones relativamente diluidas. Como las proteínas extracelulares, deben concentrarse antes de usar. Además de los procedimientos que ya se han mencionado, se ha demostrado que la ultrafiltración era valiosa, incluida a escala industrial.

Sales inorgánicas que acompañan a las proteínas son, con frecuencia, indeseables para aplicaciones específicas. Se pueden eliminar mediante, entre otros, filtración en gel, diálisis y diafiltración.

Un gran número de proteínas se usan como preparaciones secas. Procedimientos de secado importantes son secado al vacío, liofilizado y secado por pulverización.

5 **Secuencias de nucleótidos y aminoácidos**

La fotoproteína de mtClitina está codificada por la siguiente secuencia de nucleótidos (SEC ID N° 1):

```

5'-
gaçagataaaaaattcactccttagattatgttgaataagagaaaaaaggataaagaatcaag
atgcaaaggtttacaatcgtcttcttccatgctggctttacgtgcaagatcaagattgcaacgc
acggcaaattttcacaccagcactactcttggtacagattcaaaatacgcgggtcaaactcgatcct
gattttgcaaatccaaatggatcaacagacacaaatattatgttcaactttttggacataaacggt
aaggggaaaatcacattagatgaaatcgtctccaaagcttcagacgacatttgtgctaaactggat
gcaacaccagaacagaccaaacgctcaccaggatgctggtgaagcctttttcaagaaaatgggcatg
gattatggtaaaagaagttgcattcccagaatattattaagggatgggaagagttggcgaacacgac
ttggaactctggctctcaaaàcaaaagtacattgatccgtgaatggggagatgctgttttcgacatt
ttcgacaaagacgcaagtggtcaatcagtttagacgaatggaaggcttacggacgaatctctgga
atctgtccatcagacgaagacgctgagaagacgttcaaacattgtgatttggacaacagtggcaaa
cttgatggtgatgagatgaccaggcaacatttaggcttctggtacacattggatccaacttctgat
ggtctttatggcaattttgttcctaàgaagcgttcagttaaaaacgctaaacattgttcagttgt
aaaattatattcattttcatttcgtaaaattagtatataaaatttgtatcataaattgtatccat
gttgtagactaaataagactcggcaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa -3'

```

Esto conduce a una secuencia de aminoácidos de (SEC ID N° 2):

```

MQRFTNRLLSMSALRARSRLQRTANFHITSILLATDSKYAVKLDPDFANPKWINRHKFMFN
FLDINGK GKITLDEIVSKASDDICAKLDATPEQTKRHQDAVEAFFKMGMDYGEVAFPE
FIKGWEELAEHDLELWSQNKSTLIREWGDVFDIFDKDASGSISLDEWKAYGRISGICPSDE
DAEKTFKHCDLNSGKLDVDEMTRQHLGFWYTLDPDSDGLYGNFVP

```

10 El supuesto péptido señal de la fotoproteína mtClitina tiene la siguiente secuencia (SEC ID N° 3):

MQRFTNRLLSMSALRA

y la siguiente secuencia de ácidos nucleicos:

5'- atgcaaaggtttacaatcgtcttcttccatgctggctttacgtgca - 3' (SEQ ID NO 4)

Estas secuencias también se encuentran en el listado de secuencias.

15 **Breve descripción de las figuras**

- Figura 1: La Figura 1 muestra el mapa plasmídico del vector pTrip1EX2-mtClitina.
- Figura 2: La Figura 2 muestra el mapa plasmídico del vector pcDNA3-mtClitina.
- Figura 3: La Figura 3 muestra el resultado de la expresión bacteriana de metclitina y la actividad de bioluminiscencia de la mtClitina tras la expresión bacteriana. (Y = ULR: unidades lumínicas relativas; X) dilución; barras negras= mtClitina; barras grises= lisado control).
- 20 Figura 4: La Figura 4 muestra el resultado de la expresión eucariótica de mtClitina y la actividad de bioluminiscencia de la mtClitina tras la expresión en células CHO. (Y = ULR: unidades lumínicas relativas; X= ATP (representación logarítmica en mol/l)).
- Figura 5: La Figura 5 muestra el análisis cinético de la bioluminiscencia de la mtClitina (Y= ULR: unidades lumínicas relativas; X= tiempo [segundos]).
- 25

Figura 6: La Figura 6 muestra el análisis cinético de la bioluminiscencia de la obelina (Y= ULR: unidades lumínicas relativas; X= tiempo [segundos]).

Figura 7: La Figura 7 muestra la alineación de clitina y mtClitina a nivel de aminoácidos.

Figura 8: La Figura 8 muestra la alineación de clitina y mtClitina a nivel de ácido nucleico.

5 Figura 9: La Figura 9 muestra la alineación de clitina, mtClitina y clitina-2 a nivel de aminoácidos.

Ejemplos

Ejemplo 1

10 El vector usado para la preparación de la construcción mostrada más adelante en el presente documento fue el plásmido pTrip1EX2 de Clontech. El derivado del vector se designó pTrip1EX2-mtClitina. El vector pTrip1EX2-mtClitina se usó para expresar mtClitina en sistemas bacterianos.

La Figura 1 muestra el mapa plasmídico del vector pTrip1EX2-mtClytin.

Ejemplo 2

15 El vector usado para la preparación de la construcción mostrada más adelante en el presente documento fue el plásmido pcDNA3.1(+) de Clontech. El derivado del vector se designó pcDNA3-mtClitina. El vector pcDNA3-mtClitina se usó para expresar mtClitina en sistemas eucarióticas.

La Figura 2 muestra el mapa plasmídico del vector pcDNA3-mtClytin.

Ejemplo 3

Expresión bacteriana

20 La expresión bacteriana se realizó en la cepa de E. coli BL21(DE3) transformando las bacterias con los plásmidos de expresión pTrip1EX2-mtClitina y pTrip1EX2. Las bacterias transformadas se incubaron durante 3 horas en medio LB a 37 °C y se indujo la expresión durante 4 horas añadiendo IPTG hasta una concentración final de 1 mM. Las bacterias inducidas se recogieron mediante centrifugación, se resuspendieron en Tris/HCl 50 mM (pH 9,0) + EDTA 5 mM y se rompieron mediante sonicación. El lisado se centrifugó después durante 15 minutos a 13.000 revoluciones por minuto (16.000 rcf) y se eliminó el sobrenadante. El sobrenadante (diluciones 1:5; 1:10; 1:20 y 1:50 con Tris/HCl pH 9,0) se incubó con celenterazina (celentereazina 10E-07 M en Tris/HCl pH 9,0) durante 3 horas en oscuridad. Directamente después de la adición de cloruro cálcico 5 mM, se midió la bioluminiscencia en un luminómetro. El tiempo de integración de la medición fue de 40 segundos.

La Figura 3 muestra los resultados de medir la bioluminiscencia de la mtClitina en bacterias.

Ejemplo 4

30 Expresión eucariótica

35 La expresión eucariótica constitutiva se llevó a cabo en células CHO transfeccionando las células con los plásmidos de expresión pcDNA3-mtClytin y pcDNA3.1(+) en experimentos transitorios. Con este fin, 10.000 células se sembraron en placas por pocillo en medio DMEM-F12, en placas de microtitulación de 96 pocillos y las placas se incubaron durante la noche a 37 °C. La transfección se realizó usando el kit Fugene 6 (Roche) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las células transfeccionadas se incubaron durante la noche en medio DMEM-F12 a 37 °C. Después, el medio se retiró y sustituyó con 50 µl de celenterazina (celenterazina 10E-07M en PBS). Las células se incubaron durante 3 horas a 37 °C y, después, se añadió ATP (adenosina trifosfato) hasta una concentración final de 1 µM. La medición en el luminómetro se inició directamente después de la adición. El tiempo de integración fue de 1 segundo, con un tiempo de medición total de 60 segundos.

40 La Figura 4 muestra los resultados de medir la bioluminiscencia de la mtClitina en células CHO.

Ejemplo 5

BLAST

Resultado de un análisis BLAST de mtClitina a nivel de aminoácidos.

>emb|CAD87655.1| unnamed protein product [Clytia gregaria], Length = 198, Score = 368 bits (945), Expect = e-101, Identities = 171/195 (87%), Positives = 182/195 (92%)
 >sp|Q08121|CLYT_CLYGR Clytin precursor (Phialidin), pir||S28860 clytin - hydromedusa (Clytia gregarium), emb|CAA49754.1| clytin [Clytia gregaria], gb|AAA28293.1| apoclytin, Length = 198, Score = 368 bits (945), Expect = e-101, Identities = 171/195 (87%), Positives = 182/195 (92%)
 >emb|CAD87658.1| unnamed protein product [synthetic construct], Length = 198, Score = 367 bits (943), Expect = e-101, Identities = 170/195 (87%), Positives = 182/195 (93%)
 >sp|Q27709|OBL_OBELO Obelin precursor (OBL), pdb|1EL4|A Chain A, Structure Of The Calcium-Regulated Photo-protein Obelin, Determined By Sulfur Sas, gb|AAA67708.1| unnamed protein product, Length = 195, Score = 327 bits (837), Expect = 1e-88, Identities = 150/193 (77%), Positives = 170/193 (87%)
 >emb|CAD87674.1| unnamed protein product [synthetic construct], Length = 195, Score = 326 bits (835), Expect = 2e-88, Identities = 149/193 (77%), Positives = 170/193 (87%)
 >emb|CAD87672.1| unnamed protein product [synthetic construct], Length = 195, Score = 325 bits (834), Expect = 3e-88, Identities = 149/193 (77%), Positives = 170/193 (87%)
 >emb|CAD87673.1| unnamed protein product [synthetic construct], Length = 195, Score = 325 bits (833), Expect = 4e-88, Identities = 149/193 (77%), Positives = 170/193 (87%)
 >pdb|1JF0|A Chain A, The Crystal Structure Of Obelin From Obelia Geniculata At 1.82 A Resolution, gb|AAL86372.1|AF394688.1 apobelin [Obelia geniculata], Length = 195, Score = 325 bits (833), Expect = 4e-88, Identities = 149/193 (77%), Positives = 168/193 (86%)

Ejemplo 6

BLAST

Resultado de un análisis BLAST de mtClitina a nivel de ácido nucleico:

>emb|AX702125.1| Sequence 23 from Patent WO03006497, Length = 597, Score = 669 bits (348), Expect = 0.0, Identities = 504/582 (86%)
 >emb|AX702119.1| Sequence 17 from Patent WO03006497, Length = 597, Score = 669 bits (348), Expect = 0.0, Identities = 504/582 (86%)
 >emb|X70221.1|CGCLYTIN C.gregaria mRNA for clytin, Length = 747, Score = 669 bits (348), Expect = 0.0, Identities = 504/582 (86%)
 >gb|L13247.1|CY1APOCLYT Clytia gregarium apoclytin mRNA, complete cds, Length = 747, Score = 669 bits (348), Expect = 0.0, Identities = 504/582 (86%)
 >emb|AX702187.1| Sequence 85 from Patent WO03006497, Length = 597, Score = 664 bits (345), Expect = 0.0, Identities = 503/582 (86%)
 >emb|AX702185.1| Sequence 83 from Patent WO03006497, Length = 597, Score = 664 bits (345), Expect = 0.0, Identities = 503/582 (86%)
 >emb|AX702183.1| Sequence 81 from Patent WO03006497, Length = 597, Score = 664 bits (345), Expect = 0.0, Identities = 503/582 (86%)
 >emb|AX702181.1| Sequence 79 from Patent WO03006497, Length = 597, Score = 664 bits (345), Expect = 0.0, Identities = 503/582 (86%)
 5 >emb|AX702179.1| Sequence 77 from Patent WO03006497, Length = 597, Score = 664 bits (345), Expect = 0.0, Identities = 503/582 (86%)
 >emb|AX702131.1| Sequence 29 from Patent WO03006497, Length = 597, Score = 664 bits (345), Expect = 0.0, Identities = 503/582 (86%)
 >emb|AX702129.1| Sequence 27 from Patent WO03006497, Length = 597, Score = 664 bits (345), Expect = 0.0, Identities = 503/582 (86%)

Ejemplo 7

La Figura 7 muestra la alineación de mtClitina y clitina (Clytia gregaria) a nivel de ácido nucleico.

Ejemplo 8

10 La Figura 8 muestra la alineación de mtClitina y clitina (Clytia gregaria) a nivel de aminoácidos.

Ejemplo 9

Análisis cinético de mtClitina

5 Para llevar a cabo el análisis cinético de la bioluminiscencia de mtClitina, las células CHO se transfeccionaron de forma transitoria con pcDNA3-mtClitina o pcDNA-obelina o pcDNA3 (sin ADNc integrado). La transfección y la medición se llevaron a cabo como se ha descrito para el Ejemplo 4, Las lecturas se tomaron en un periodo de 60 segundos, con un tiempo de integración de 1 segundo.

Las Figuras 5 y 6 muestran los resultados del análisis cinético de mtClitina y obelina.

Ejemplo 10

Análisis MITOPROT

10 Se usó el programa informático MITOPROT para analizar el péptido señal de mtClitina (Claros y col., 1996). Se analizaron las siguientes fotoproteínas: obelina (Q27709), aecurina (P07164), clitina (Q08121) y mtClitina (SEC ID N° 2).

Resultados de los análisis:

Obelina:

15 Nombre de la secuencia: OBELINA

Longitud de la secuencia inicial: 196 aa

VALORES DE LOS PARÁMETROS COMPUTADOS

Carga neta de la secuencia de búsqueda:	-11
Región analizada:	11
Número de residuos básicos en la secuencia destino:	3
Número de residuos ácidos en la secuencia destino:	0
Sitio de escisión:	no predecible
Secuencia escindida:	-

ESCALA HIDROFÓBICA USADA

	GES	KD	GVH1	ECS
H17:	-0.624	0.259	-0.30S	0.295

ESCALA HIDROFÓBICA USADA

	GES	KD	GVH1	ECS
MesoH :	-1,573	-0,241	-0,642	0,060
MuHd_075:	14,019	3,641	4,408	1,523
MuHd_095:	7,994	7,898	3,285	1,838
MuHd_100:	13,734	9,836	5,597	2,742
MuHd_105:	21,195	11,755	7,339	4,117
Hrnax_075 :	-9,450	-2,800	4,008	1 132
Hrnax_095 :	-0,963	1,837	-1,971	1,103
Hrnax_100 :	0,400	1,300	-1,942	2,240
Hmax_105 :	10,617	6,067	0,733	3,127

ES 2 375 610 T3

PROBABILIDAD

de exportación a la mitocondria: 0,1479

Aecuorina:

Nombre de la secuencia: AECUORINA

Longitud de la secuencia inicial: 196 aa

VALORES DE LOS PARÁMETROS COMPUTADOS

Carga neta de la secuencia de búsqueda:	-13
Región analizada:	3
Número de residuos básicos en la secuencia destino:	0
Número de residuos ácidos en la secuencia destino:	0
Sitio de escisión:	no predecible
Secuencia escindida:	-

ESCALA HIDROFÓBICA USADA

	GES	KD	GVH1	ECS
H17:	0,006	0,794	-0,263	0,368
MesoH :	-1,673	-0,382	-0,703	0,048
MuHd_075:	24,326	4,153	5,947	2,450
MuHd_095:	12,638	7 213	4,218	1,796
MuHd_100 :	13,748	8,827	4,477	2,427
MuHd_105:	16,581	11,426	5,056	3,463
Hmax_075 :	0,438	0,233	-2,490	1,692
Hmax_095 :	0,525	-1,400	-2,394	0,674
Hmax_100 :	-0,100	-1,200	-2,292	1,550
H max_105:	0,500	-0,000	-2,164	1,540

PROBABILIDAD

de exportación a la mitocondria: 0,0148

Clitina:

Nombre de la secuencia: CLITINA

Longitud de la secuencia inicial: 198 aa

VALORES DE LOS PARÁMETROS COMPUTADOS

Carga neta de la secuencia de búsqueda:	-11
Región analizada:	11
Número de residuos básicos en la secuencia destino:	3

VALORES DE LOS PARÁMETROS COMPUTADOS

Número de residuos ácidos en la secuencia destino:	0
Sitio de escisión:	no predecible

ES 2 375 610 T3

Secuencia escindida:

ESCALA HIDROFÓBICA USADA

	GES	KD	GVH1	ECS
H17:	-0,624	0,259	-0,308	0,295
MesoH :	-1,573	-0,241	-0,642	0,060
MuHd_075	14,019	3,641	4,408	1,523
MuHd_095	7,994	7,698	3,285	1,638
MuHd_100	13,734	9,836	5,597	2,742
MuHd_105	21,195	11,755	7,339	4,117
Hmax_075	-9,450	-2,800	-4,008	1,132
Hmax_095	-0,963	1,837	-1,971	1,103
Hmax_100	0,400	1,300	-1,942	2,240
Hmax_105	10,617	6,067	0,733	3,127

PROBABILIDAD

de exportación a la mitocondria: 0,1479

Aecuorina:

Nombre de la secuencia: AECUORINA

Longitud de la secuencia inicial: 196 aa

VALORES DE LOS PARÁMETROS COMPUTADOS

Carga neta de la secuencia de búsqueda:	-13
Región analizada:	3
Número de residuos básicos en la secuencia destino:	0
Número de residuos ácidos en la secuencia destino:	0
Sitio de la escisión:	no predecible
Secuencia escindida:	

ESCALA HIDROFÓBICA USADA

	GES	KD	GVH1	ECS
H17:	0,006	0,794	-0,263	0,368
MesoH :	-1,673	-0,382	-0,703	0,048
MuHd_075	24,326	4,153	5,947	2,450
MuHd_095	12,638	7,213	4,218	1,796
MuHd_100	13,748	8,827	4,477	2,427
MuHd_105	16,581	11,426	5,056	3,453
Hmax_075	0,438	0,233	-2,490	1,692
Hmax_095	-0,525	-1,400	-2,394	0,674
Hmax_100	-0,100	-1,200	-2,292	1,560

ES 2 375 610 T3

Hmax_105 0,500 -0,000 -2,164 1,540

PROBABILIDAD

de exportación a la mitocondria: 0,0148

Clitina:

Nombre de la secuencia: CLITINA

Longitud de la secuencia inicial: 198 aa

VALORES DE LOS PARÁMETROS COMPUTADOS

Carga neta de la secuencia de búsqueda:	-9
Región analizada:	32
Número de residuos básicos en la secuencia destino:	6
Número de residuos ácidos en la secuencia destino:	2
Sitio de la escisión: no predecible	
Secuencia escindida:	

ESCALA HIDROFÓBICA USADA

	GES	KD	GVH1	ECS
H17:	-0,429	0,341	-0,313	0,313
MesoH :	-1,778	-0,307	-0,718	0,053
MuHd_075	32,928	17,509	7,351	5,708
MuHd_095	30,874	20,344	9,074	5,834
MuHd_100	36,596	22,666	10,051	6,762
MuHd_105	39,174	19,336	10,379	7,609
Hmax_075	4,900	7,087	-1,223	3,684
Hmax_095	13,600	10,100	1,261	4,390
H max_100	14,000	12,600	1,601	5,060
Hmax_105	6,650	13,067	-0,468	3,920

PROBABILIDAD

de exportación a la mitocondria: 0,2047

Clitina-2:

Nombre de la secuencia: CLITINA-2

Longitud de la secuencia inicial: 198 aa

VALORES DE LOS PARÁMETROS COMPUTADOS

Carga neta de la secuencia de búsqueda:	-7
Región analizada:	16
Número de residuos básicos en la secuencia destino:	3
Número de residuos ácidos en la secuencia destino:	1
Sitio de la escisión: no predecible	

ES 2 375 610 T3

Secuencia escindida:

ESCALA HIDROFÓBICA USADA

	GES	KD	GVH1	ECS
H17:	-0,288	0,341	-0,213	0,313
MesoH :	-1,519	-0,206	-0,681	0,081
MuHd_075	32,594	15,092	8,192	4,075
MuHd_095	36,090	19,707	8,836	6,716
MuHd_100	38,617	20,269	9,682	6,851
MuHd_105	30,267	16,082	8,229	5,470
Hmax_075	6,533	6,417	-0,793	2,508
Hmax_095	13,600	10,100	1,251	4,390
Hmax_100	13,600	10,100	1,251	4,390
Hmax_105	13,417	10,150	1,612	3,862

PROBABILIDAD

de exportación a la mitocondria: 0,3974

mtClitina:

Nombre de la secuencia: mtClitina

Longitud de la secuencia inicial: 228 aa

VALORES DE LOS PARÁMETROS COMPUTADOS

Carga neta de la secuencia de búsqueda:	-8
Región analizada:	34
Número de residuos básicos en la secuencia destino:	6
Número de residuos ácidos en la secuencia destino:	0
Sitio de la escisión:	17
Secuencia escindida:	MQRFTNRLLSMSALRA

ESCALA HIDROFÓBICA USADA

	GES	KD	Gvm	ECS
H17:	-0,135	0,453	-0,343	0,309
MesoH :	-1,623	-0,215	-0,701	0,073
MuHd_075:	33,394	19,322	8,634	7,593
MuHd_095:	34,726	19,634	8,110	8,861
MuHd_100:	32,825	16,596	7,376	7,520
MuHd_105 :	28,005	19,893	7,410	7,865
Hmax_075 :	16,683	17,733	2,861	5,763
Hmax_095 :	13,125	13,388	2,299	4,314
Hmax_100 :	8,300	11,500	1,845	3,830

Hmax_105 : 1,700 9,500 -1,171 2,390

PROBABILIDAD

de exportación a la mitocondria: 0,9974

La probabilidad de que el péptido analizado se transloque a la mitocondria aumenta a medida que el factor calculado se aproxima a 1.

5 El análisis de las secuencias proteicas de obelina, aecurina, clitina, clitina-2 y mtClitina ha revelado que sólo la mtClitina tiene las características de una proteína que puede ser transportada al interior de la mitocondria.

Ejemplo 11

La Figura 9 muestra la alineación de mtClitina, clitina (Clytia gregaria) y clitina de tipo 2 a nivel de aminoácidos.

Bibliografía/Patentes

US 6,495,355

US 5,541,309

US 5,093,240

US-0908909

US 6,152,358

JP-0176125

GB-0024357

WO03006497

WO200168824

Alam J, Cook JL. Reporter genes: application to the study of mammalian gene transcription. *Annal Biochem.* 1990 Aug.1;188(2):245-54

Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schäffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997); Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs;

Nucleic Acids Res. 25:3389-3402

Chiesa A, Rapizzi E, Tosello V, Pinton P, de Virgilio M, Fogarty KE, Rizzuto R. Recombinant aequorin and green fluorescent protein as valuable tools in the study of cell signalling. *Biochem. J.* 2001 Apr. 1;355(Pt 1):1-12.

Claros, M.G., Vincens, P. (1996); Computational method to predict mitochondrially imported proteins and their targeting sequences. *Eur. J. Biochem.* 241, 779-786.

Cullen Bryan R., Malim Michael H., Secreted placental alkaline phosphatase as a eukaryotic reporter gene. *Methods in Enzymology.* 216:362ff

Fagan TF, Ohmiya Y, Blinks JR, Inouye S, Tsuji FI. Cloning, expression and sequence analysis of cDNA for the Ca(2+)-binding photoprotein, mitrocomin. *FEBS Lett.* 1993 Nov. 1;333(3):30.1-5

Hastings, J.W. and Morin, J.G. (1969) Comparative biochemistry of calcium-activated photoproteins from the ctenophore, Mnemiopsis and the coelenterates Aequorea, Obelia, and Pelagia. *Biol. Bull.* 137, 402.

Haddock SH, Rivers TJ, Robison BH. Can coelenterates make coelenterazine? Dietary requirement for luciferin in cnidarian bioluminescence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2001 Sep. 25;98(20):11148-51

Inouye S, Tsuji FI. (1994) Aequorea green fluorescent protein. Expression of the gene and fluorescence characteristics of the recombinant protein. *FEBS Lett* 1994 Mar. 21;341(2-3):277-80

Inouye S, Tsuji FI. Cloning and sequence analysis of cDNA for the Ca(2+)-activated photoprotein, clytin. *FEBS Lett.* 1993 Jan. 11;315(3):343-6.

Illarionov BA, Bondar VS, Illarionova VA, Vysotski ES. Sequence of the cDNA encoding the Ca(2+)-activated photoprotein obelin from the hydroid polyp Obelia longissima. *Gene.* 1995 Feb. 14;153(2):273-4.

Jones K, Hibbert F, Keenan M. Glowing jellyfish, luminescence and a molecule called coelenterazine. *Trends Biotechnol* 1999 Dec;17(12):477-81

Johnson, F.H., Shimomura, O., Saiga, Y., Gershman, L.C., Reynolds, G.T., and Waters, J.R. (1962) Quantum efficiency of Cypridina luminescence, with a note on that of Aequorea. *J. Cell. Comp. Physiol.* 60, 85-103.

Morin, J.G. and Hastings, J.W. (1971) Biochemistry of the bioluminescence of colonial hydroids and other coelenterates. *J. Cell. Physiol.* 77, 305-311.

Phillips GN, Structure and dynamics of green fluorescent protein. *Curr Opin Struct Biol.* 1997 Dec. ;7(6):821-7

Sambrook, J., Fritsch, E. Maniatis, T. 1989, *Molecular cloning. A laboratory manual* Vol 1-3, Cold Spring Harbor, New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press

Shimomura O, Johnson FH. Properties of the bioluminescent protein aequorin. *Biochemistry.* 1969 Oct. ;8(10):3991-7

Shimomura O., Bioluminescence in the sea: photoprotein systems. *Symp Soc Exp Biol.* 1985;39:351-72

Shimomura O. Isolation and properties of various molecular forms of aequorin. *Biochem. J.* 1986 Mar. 1;234(2):271-7.

Snowdowne KW, Borle AB. Measurement of cytosolic free calcium in mammalian cells with aequorin. *Am J Physiol.* 1984 Nov;247(5 Pt 1):C396-408.

Ward, W.W. (1998) Biochemical and physical properties of green fluorescent protein. In: *Green Fluorescent Protein: Properties, Applications, and Protocols* (Chalfie, M. and Kain, S., eds) pp. 45-70. Wiley-Liss, Inc.

Yang Te-Tuan, Sinai Parisa, Kitts Paul A. Kain Seven R., Quantification of gene expression with a secreted alkaline phosphatase reporter system. *Biotechnology.* 1997 23(6) 1110ff

ES 2 375 610 T3

LISTADO DE SECUENCIAS

[0111]

<110> Bayer AG, BHC

<120> Isolated photoprotein mtClytin, and its use

<130> Le A 36 839

<160> 6

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 912

<212> DNA

<213> Clytia gregaria

<400> 1

```

gacagataaa aaattcactc cttagattat ttagtgaata agagaaaaa aggataagaa      60
atcaagatgc aaaggtttac aaatcgtcct ctttccatgt cggctttacg tgcaagatca     120
agattgcaac gcacggcaaa ttttcacacc agcatactct tggctacaga ttcaaaatac     180
gcggtcaaac tcgatcctga ttttgcaaat ccaaaatgga tcaacagaca daaatztatg     240
ttcaactttt tggacataaa cggtaagggg aaaatcacat tagatgaaat cgtctccaaa     300
gcttcagacg acatttgtgc taaactggat gcaacaccag aacagaccaa acgtcaccag     360
gatgctgttg aagccttttt caagaaaatg ggcattggatt atggtaaaga agttgcattc     420
ccagaattta ttaagggatg ggaagagttg gccgaacacg acttggaact ctggtctcaa     480
aacaaaagta cattgatccg tgaatgggga gatgctgttt tcgacatttt cgacaaagac     540
gcaagtggct caatcagttt agacgaatgg aaggcttacg gacgaatctc tggaatctgt     600
ccatcagacg aagacgctga gaagacgttc aaacattgtg atttgacaa cagtggtgcaa     660
cttgatgttg atgagatgac caggcaacat ttaggcttct ggtacacatt ggatccaact     720
tctgatggtc tttatggcaa ttttgttccc taagaagcgt tcagttaaaa acgctaaaca     780
ttgttcagtt gtaaaattat attcattttc atttcgtaaa attagtattt ataaatttgt     840
atcataaatt gtatccatgt tgtagactaa ataagaactcg gcaaaaaaaaa aaaaaaaaaa     900
aaaaaaaaaa aa                                                                912

```

<210> 2

<211> 228

<212> PRT

<213> Clytia gregaria

<400> 2

ES 2 375 610 T3

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

<210> 3
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Clytia gregaria

<400> 3

Met Gln Arg Phe Thr Asn Arg Leu Leu Ser Met Ser Ala Leu Arg Ala
 1 5 10 15

<210> 4
 <211> 48
 <212> DNA
 <213> Clytia gregaria

<400> 4

ES 2 375 610 T3

atgcaaaggt ttacaaatcg tctctttcc atgtoggctt tacgtgca 48

<210> 5
 <211> 791
 <212> DNA
 <213> *Clytia gregaria*

<400> 5

```

gatctcagct caacttgcaa taagtatcag atcaaatttt gcaactcaaa gcaaatcadc 60
aacttcatca taatgactga cactgcttca aaatacgtcg tcaaactcaa gaccaacttt 120
gaagatccaa aatgggtcaa cagacacaaa tttatgttca actttttgga cattaacggc 180
aacggaaaaa tcacttttga tgaattgtc tccaaagctt cggatgacat ttgcgccaaa 240
cttgagctca caccagctca aaccacaagt catcaggaag ctgttgaagc tttcttcaag 300
aagattgggt tggattatgg caagaagtc gaattcccag ctttcgttaa cggatggaaa 360
gaactggcca aacatgactt gaaactttgg tcccaaaaaca agaaatcttt gatccgcaat 420
tggggagaag ctgtattoga cattttcgac aaggacggaa gtggctcaat cagtttggac 480
gaatggaaaa catacggagg aatctctgga atctgtccat cagacgaaga cgctgaaaag 540
accttcaaac attgcgattt ggacaacagt ggcaaacttg atgttgaoga gatgaccaga 600
caacatttgg gattctggtg caccttggac cctaacgctg atggctctta tggcaacttt 660
gtcccttaaa aacttttttt gctgtaaatt ctttaogggg tattttttca taattgtcat 720
ttgattttta ctttgtttct gaaaatgaaa aatattcttt attcagaaaa aaaaaaaaaa 780
aaaaaaaaaa a 791
    
```

<210> 6
 <211> 198
 <212> PRT
 <213> *Clytia gregaria*

<400> 6

```

Met Thr Asp Thr Ala Ser Lys Tyr Ala Val Lys Leu Lys Thr Asn Phe
1           5           10           15
Glu Asp Pro Lys Trp Val Asn Arg His Lys Phe Met Phe Asn Phe Leu
20           25           30
Asp Ile Asn Gly Asn Gly Lys Ile Thr Leu Asp Glu Ile Val Ser Lys
35           40           45
Ala Ser Asp Asp Ile Cys Ala Lys Leu Gly Ala Thr Pro Ala Gln Thr
50           55           60
Gln Arg His Gln Glu Ala Val Glu Ala Phe Phe Lys Lys Ile Gly Leu
65           70           75           80
    
```


REIVINDICACIONES

1. Una molécula de ácido nucleico seleccionada del grupo constituido por:
 - a) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que contiene la secuencia de aminoácidos divulgada por la SEC ID N° 2; y
 - b) moléculas de ácido nucleico que contienen la secuencia representada por la SEC ID N 1 :
2. Ácido nucleico según la reivindicación 1, que contiene un promotor funcional en 5' de la secuencia de codificación.
3. Vectores de ADN o de ARN recombinantes que contienen ácidos nucleicos de acuerdo con la reivindicación 2.
4. Organismos no humanos que contienen un vector de acuerdo con la reivindicación 3.
5. Un péptido o polipéptido, que está codificado por una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 1.
6. Un procedimiento para expresar los polipéptidos de acuerdo con la reivindicación 5 en bacterias, sistemas víricos, levaduras o células eucarióticas o en sistemas de expresión in vitro.
7. Un procedimiento para purificar/aislar un polipéptido de fotoproteína de acuerdo con la reivindicación 6.
8. El uso de un ácido nucleico de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 3 como gen marcador o gen indicador.
9. El uso de un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 5 como indicador o marcador.
10. El uso de un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 5 como proteína indicadora para buscar principios activos farmacológicos.
11. El uso de un ácido nucleico de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2 como gen indicador para buscar principios activos farmacológicos.

20

Fig. 1

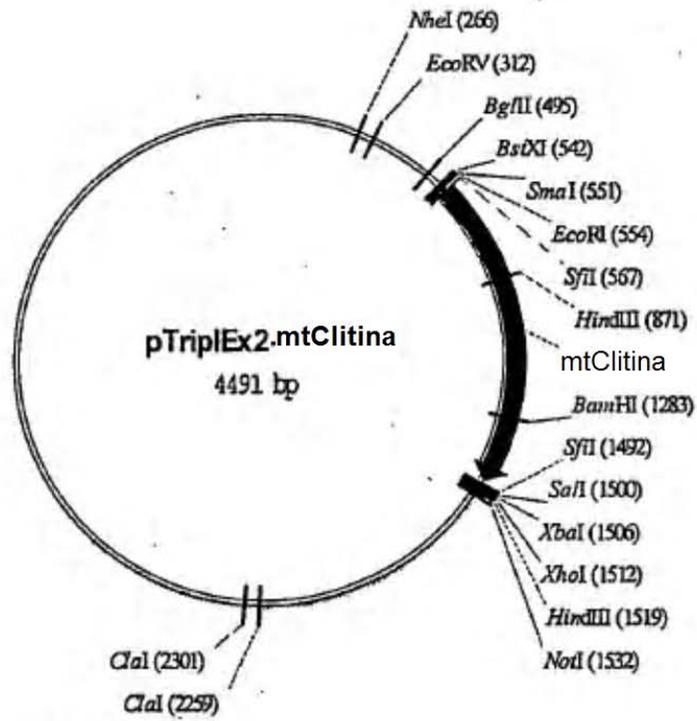


Fig. 2

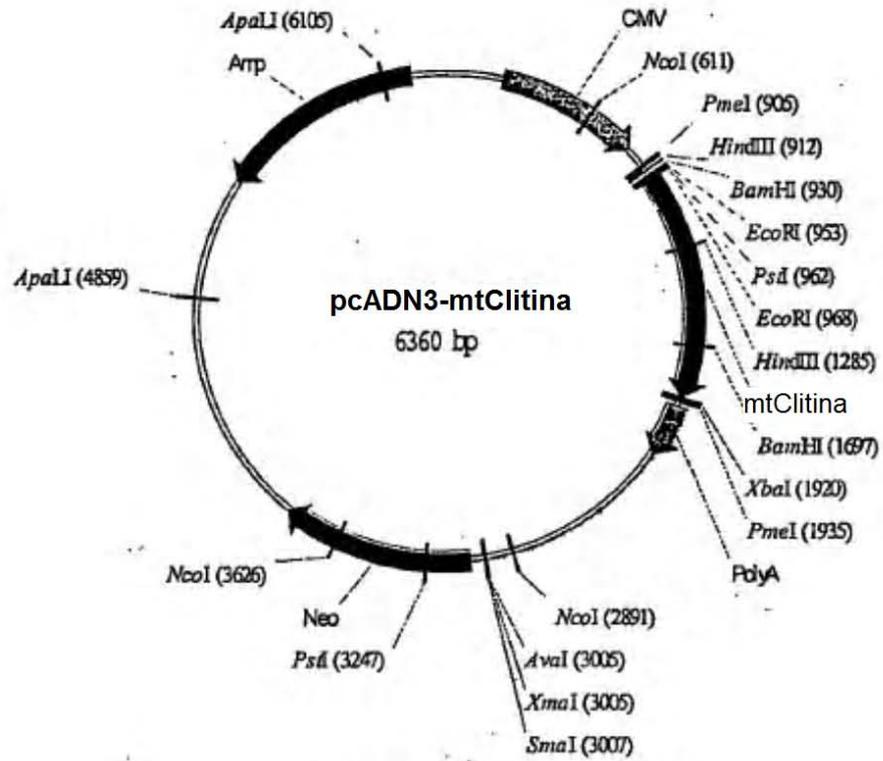


Fig. 3

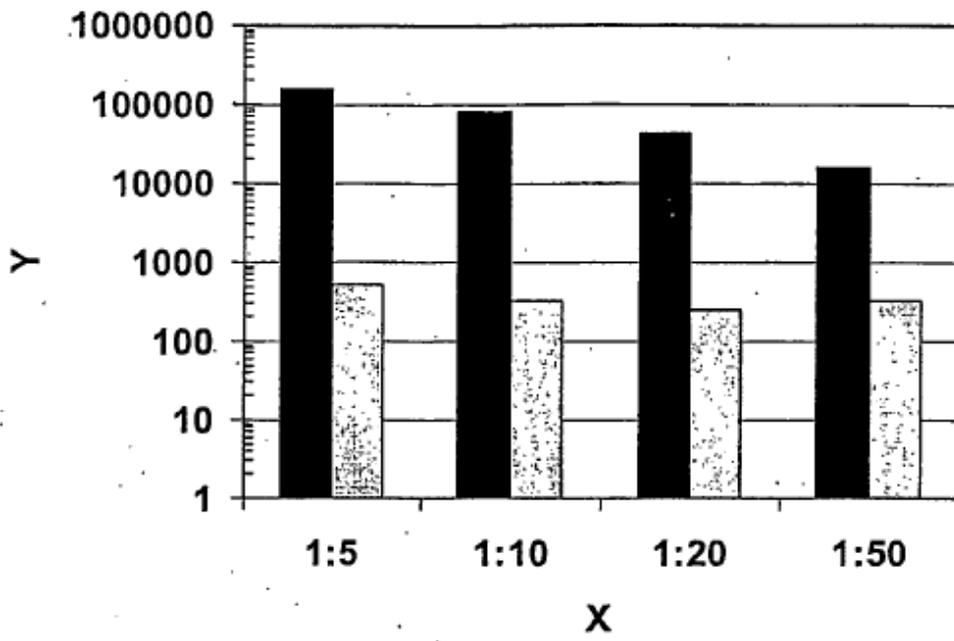


Fig. 4

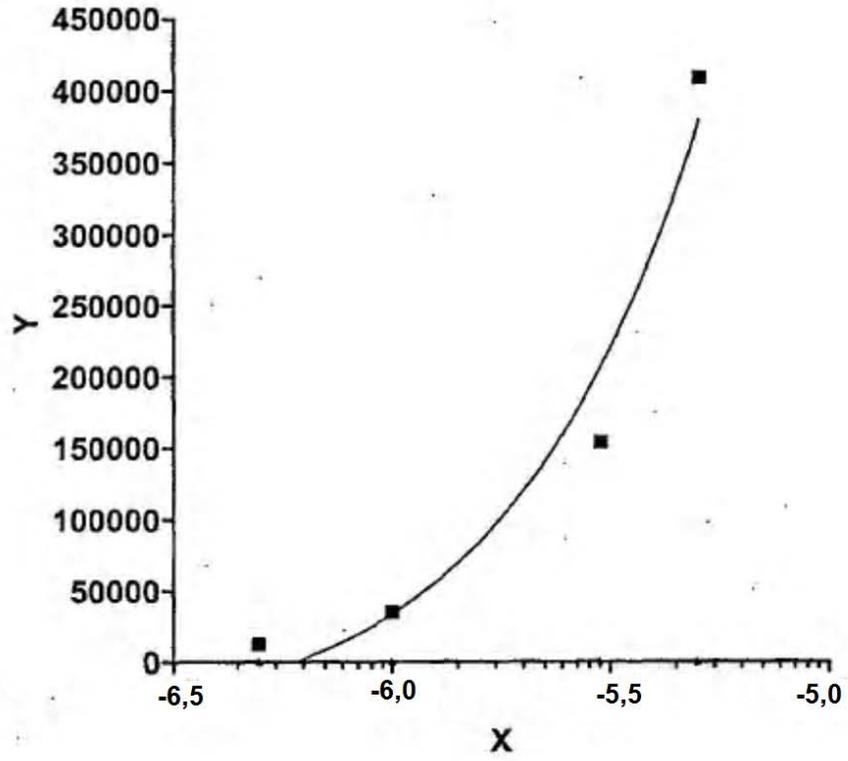


Fig. 5

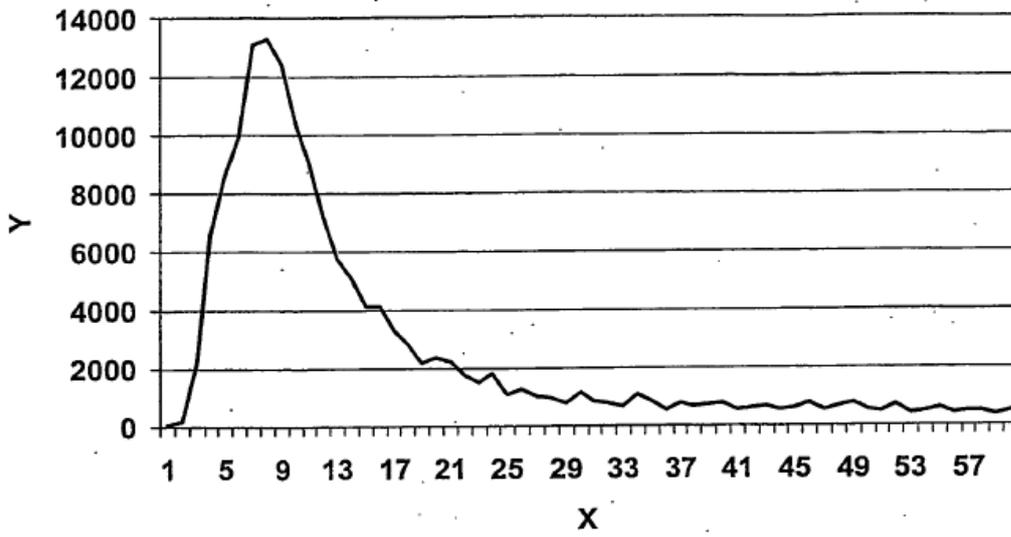


Fig. 6

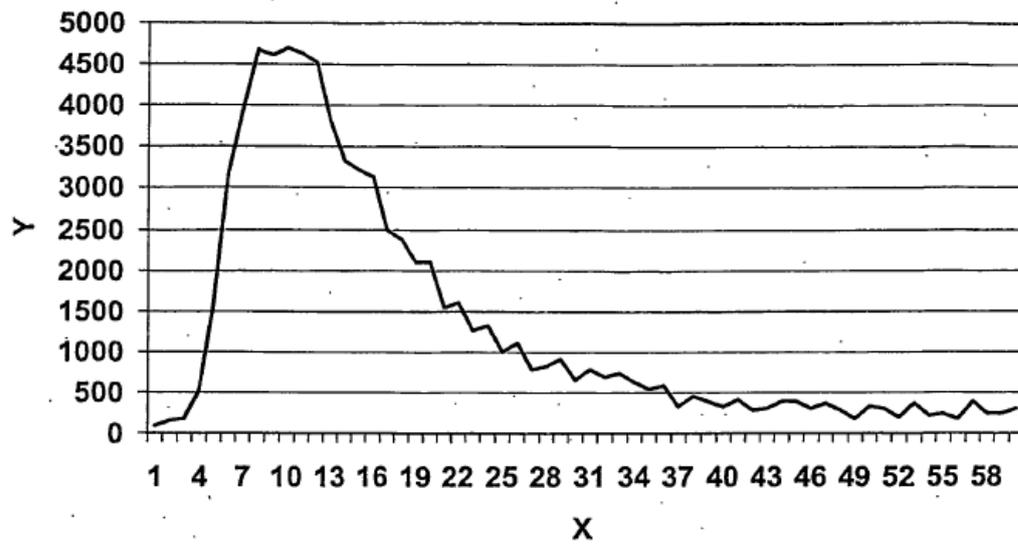


Fig. 7

1					50
Clitina
mtClitina	GACAGATAAA	AAATTCACTC	CTTAGATTAT	TTAGTGAATA	AGAGAAAAAA
	51				100
Clitina
mtClitina	AGGATAAGAA	ATCAAGATGC	AAAGGTTTAC	AAATCGTCTT	CITTCCATGT
	101				150
ClitinaATCA	ACTTTTGCAA	CTCAAAGCAA	ATTTCAAAC
mtClitina	CGGCTTTACG	TGCAAGATCA	AGATT.GCAA	CGCACGGCAA	ATTTTCACAC
	151				200
Clitina	TTCAACATGG	CTGAC.ACTG	CATCAAATA	CGCCGTCAA	CTCAGACCCA
mtClitina	CAGCATACTC	TTGGCTACAG	ATCAAATA	CGCCGTCAA	CTCGATCCTG
	201				250
Clitina	ACTTCGACAA	CCCAAAATGG	GTCAACAGAC	ACAAATTAT	GTTCAACTTT
mtClitina	ATTTTGCAA	TCCAAAATGG	ATCAACAGAC	ACAAATTAT	GTTCAACTTT
	251				300
Clitina	TTGGACATTA	ACGGCGACGG	AAAATCACT	TTGGATGAAA	TCGTCTCCAA
mtClitina	TTGGACATAA	ACGGTAAGGG	GAAATCACA	TTAGATGAAA	TCGTCTCCAA
	301				350
Clitina	AGCTTCGGAT	GACATTTGCG	CCAACTTGG	AGCAACACCA	GAACAGACCA
mtClitina	AGCTTCAGAC	GACATTTGTG	CTAACTGGA	TGCAACACCA	GAACAGACCA
	351				400
Clitina	AACGTCACCA	GGATGCTGTC	GAAGCTTCT	TCAAAAAGAT	TGGTATGGAT
mtClitina	AACGTCACCA	GGATGCTGTT	GAAGCCTTT	TCAAGAAAAT	GGGCATGGAT
	401				450
Clitina	TATGGTAAAG	AAGTCGAATT	CCCAGCTTTT	GTTGATGGAT	GGAAAGAACT
mtClitina	TATGGTAAAG	AAGTTGCATT	CCCAGAATTT	ATTAAGGGAT	GGGAAGAGTT
	451				500
Clitina	GGCCAATTAT	GACTTGAAC	TTGGTCTCA	AAACAAGAAA	TCTTTGATCC
mtClitina	GGCCGAACAC	GACTTGAAC	TCTGGTCTCA	AAACAAAAGT	ACATTGATCC
	501				550
Clitina	GCGACTGGGG	AGAAGCTGTT	TTCGACATTT	TTGACAAAGA	CGGAAGTGGC
mtClitina	GTGAATGGGG	AGATGCTGTT	TTCGACATTT	TCGACAAAGA	CGCAAGTGGC
	551				600
Clitina	TCAATCAGTT	TGGACGAATG	GAAGCTTAT	GGACGAATCT	CTGGAATCTG

ES 2 375 610 T3

```

mtClitina TCAATCAGTT TAGACGAATG GAAGGCTTAC GGACGAATCT CTGGAATCTG

        601                                650
Clitina   CTCATCAGAC GAAGACGCCG AAAAGACCTT CAAACATTGC GATTTGGACA
mtClitina TCCATCAGAC GAAGACGCTG AGAAGACGTT CAAACATTGT GATTTGGACA

        651                                700
Clitina   ACAGTGGCAA ACTTGATGTT GATGAGATGA CCAGACAACA TTTGGGATTC
mtClitina ACAGTGGCAA ACTTGATGTT GATGAGATGA CCAGGCAACA TTTAGGCTTC

        701                                750
Clitina   TGGTACACCT TGGACCCCAA CGCTGATGGT CTTTACGGCA ATTTTGTTC
mtClitina TGGTACACAT TGGATCCAAC TTCTGATGGT CTTTATGGCA ATTTTGTTC

        751                                800
Clitina   TTAAACATCG ...AAACAAA AGCCCAAAG AAGTTTGGGA AGAATTATT
mtClitina CTAAGAAGCG TTCAGTAAA AACGCTAAC ATTGTTCAGT TGTAATAA

        801                                850
Clitina   GATAC..TAT CATTG.... ..TTACTATT TCGTAACATG CT..ATATT
mtClitina TATTCATTTT CATTTCGTAA AATTAGTATT TATAAATTG TATCATAAAT

        851                                900
Clitina   TGTAAC.ATG CTATATT.TA AATAATTTT. ....
mtClitina TGTATCCATG TTGTAGACTA AATAAGACTC GGCAAAAAAA AAAAAAAA

        901                                913
Clitina   .....
mtClitina AAAAAAAA AAA

```