

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la  
Propiedad Intelectual  
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional  
16 de enero de 2014 (16.01.2014)

WIPO | PCT

(10) Número de Publicación Internacional  
WO 2014/009590 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes:  
C07K 14/435 (2006.01) G01N 33/52 (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:  
PCT/ES2013/070503

(22) Fecha de presentación internacional:  
12 de julio de 2013 (12.07.2013)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:  
P201231104 13 de julio de 2012 (13.07.2012) ES

(71) Solicitante: UNIVERSIDAD DE VALLADOLID  
[ES/ES]; Plaza de Santa Cruz, 8, E-47002 Valladolid (ES).

(72) Inventores: ALONSO ALONSO, M<sup>a</sup> Teresa; Santo Domingo de Guzmán, 17, 2<sup>o</sup>, E-47003 Valladolid (ES).  
GARCÍA-SANCHO MARTÍN, Javier; Cervantes, 22, E-47003 Tudela de Duero (ES).

(74) Mandatario: ARIAS SANZ, Juan; Avda. de Burgos, 16D, Edificio EUROMOR, E-28036 Madrid (ES).

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN,

BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible):  
ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Publicada:**

- con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))
- antes de la expiración del plazo para modificar las reivindicaciones y para ser republicada si se reciben modificaciones (Regla 48.2(h))

(54) Title: APOAEQUORIN MUTANTS AND METHODS FOR THE USE THEREOF

(54) Título : MUTANTES DE APOACUORINA Y METODOS PARA SU USO

(57) Abstract: The invention relates to a sensor based on the protein apoaequorin, wherein position 119 and positions 24 and/or 157 have been modified, and to fusion proteins comprising said sensor. The invention also relates to methods for detecting calcium in samples and the concentration of intracellular calcium.

(57) Resumen: La invención proporciona un sensor de calcio basado en la proteína apoacuorina, en donde se han modificado la posición 119 y las posiciones 24 y/o 157, así como proteínas de fusión que comprenden dicho sensor. La invención también proporciona métodos para detectar calcio en muestras y la concentración de calcio intracelular.



WO 2014/009590 A1

## MUTANTES DE APOACUORINA Y METODOS PARA SU USO

### CAMPO DE LA TÉCNICA

La presente invención se relaciona con sensores de calcio libre intracelular ( $\text{Ca}^{2+}$ ) codificados genéticamente y, en particular, con mutantes de apoacuorina. También se relaciona con métodos para la detección de  $\text{Ca}^{2+}$  mediante el uso de sensores de calcio.

### ANTECEDENTES

El calcio iónico intracelular ( $\text{Ca}^{2+}$ ) es la molécula señalizadora más ubicua en los organismos vivos y regula una gran cantidad de procesos celulares como la contracción muscular, la secreción de neurotransmisores y hormonas, la expresión génica, la división celular, la diferenciación y la apoptosis. Por su importante papel en todas estas funciones, el  $\text{Ca}^{2+}$  está finamente regulado y alteraciones en su homeostasis pueden conducir a situaciones patológicas relevantes en ciertas enfermedades como la enfermedad de Alzheimer, la diabetes, el cáncer o la migraña.

Para poder estudiar estas funciones es esencial poder monitorizar el Ca en el lumen de las organelas de alto contenido de calcio de forma fiable. El retículo endoplásmico (RE, también llamado sarcoplásmico en las células musculares) es el principal reservorio intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ , aunque el complejo de Golgi y los lisosomas también son capaces, en menor medida, de almacenar y liberar  $\text{Ca}^{2+}$ . Esto requiere disponer de un sensor que pueda dirigirse específicamente al lumen de esas organelas y cuya afinidad esté en el rango apropiado para poder detectar cambios de  $\text{Ca}^{2+}$  en su interior. Además, otras propiedades de un sensor óptimo como un amplio rango dinámico, y una buena relación señal/ruido también son deseables. Actualmente se dispone de un amplio repertorio de indicadores de  $\text{Ca}^{2+}$ , tanto sintéticos como codificados genéticamente (GECIs, *Genetically Encoded  $\text{Ca}^{2+}$  Indicators*) (Zhang et al., 2002, Nat Rev Mol Cell Biol 3:906-18).

Los indicadores sintéticos ofrecen muchas ventajas para monitorizar la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en el citosol ya que pueden introducirse en las células de forma rápida y sencilla (en su forma acetoximetilester), atravesando la membrana y quedando atrapados en el interior celular gracias a las esterasas citosólicas. A pesar de disponer de varios indicadores de baja afinidad, requeridos para medir de forma directa en organelas de alto contenido de calcio, su uso para medir en el interior de las organelas es bastante más limitado, debido a la dificultad de que el indicador se cargue de forma específica en una organela concreta. Se han descrito algunos trucos experimentales para remediar esta limitación, como son la incubación del indicador a 37 °C, en lugar de a 25 °C, como es habitual, para favorecer su compartimentalización en organelas con alta [ $\text{Ca}^{2+}$ ]. Sin embargo, esto no resuelve el problema de la especificidad, pudiendo cargarse el colorante en distintos compartimentos de alto contenido  $\text{Ca}^{2+}$  como por ejemplo, el complejo de Golgi o las vesículas de secreción, y permaneciendo una gran fracción del colorante en el citosol. Esta última debe eliminarse permeabilizando la membrana plasmática, lo cual podría alterar las propiedades del RE e imposibilitaría su uso en células intactas, limitando así enormemente las posibilidades de la técnica. Otros métodos alternativos de carga como la microinyección también aducen de la misma

limitación. Precisamente el método pionero empleado para medir la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en el lumen del RE ( $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$ ) utilizó el indicador fluorescente de baja afinidad Mag-Fura 2 en células permeabilizadas (Hofer and Machen, 1993, Proc Natl Acad Sci USA 90:2598-2602). En los últimos años se han descrito intentos originales para enriquecer la fracción de indicador atrapado en el interior de las organelas mediante la sobreexpresión de esterases en el lumen del RE, favoreciendo de esta forma la carga del colorante de calcio en el interior de esta organela.

Al contrario de los indicadores de  $\text{Ca}^{2+}$  sintéticos, la principal ventaja de los GECIs es que, al ser proteínas, pueden dirigirse a compartimentos subcelulares mediante su fusión con péptidos de direccionamiento. Por esta razón, al contrario que las medidas en el citosol, para medir en las organelas son mucho más ampliamente utilizados que los indicadores sintéticos. Los GECIs pueden ser proteínas bioluminiscentes o fluorescentes. Entre los primeros, la fotoproteína acuorina, procedente de la medusa *Aequorea victoria*, fue el primer sensor de calcio proteico y actualmente sigue siendo el sensor más utilizado para medir  $\text{Ca}^{2+}$  en organelas. Al igual que otras proteínas de celenterados como la obelina y la mnemiopsina, es una proteína quimioluminiscente que emite fotones cuando se une al  $\text{Ca}^{2+}$ . La acuorina contiene en su estructura tres dominios funcionales de unión a  $\text{Ca}^{2+}$  del tipo hélice-giro-hélice denominadas “manos EF” con una gran homología con los dominios de otras proteínas fijadoras de  $\text{Ca}^{2+}$  de la misma familia como la calmodulina, la troponina y la parvalbúmina. La unión de 3 átomos de  $\text{Ca}^{2+}$  provoca un cambio conformacional en la apoproteína que resulta en una reacción intramolecular de peroxidación del subgrupo prostético, la celenterazina, al que está unido covalentemente, produciendo celenteramida y emitiendo luz azul ( $\lambda = 470$  nm) y  $\text{CO}_2$ . La acuorina nativa es capaz de medir  $[\text{Ca}^{2+}]$  comprendidas entre 0.1 y 10  $\mu\text{M}$ . Desde su clonación en 1985, la acuorina se ha dirigido a distintas organelas, incluyendo a las de alto contenido de  $\text{Ca}^{2+}$  como el RE, el complejo de Golgi y la vesícula de secreción. Para poder medir el contenido de  $\text{Ca}^{2+}$  en estos casos se ha reducido la afinidad de la acuorina por el  $\text{Ca}^{2+}$  mediante la sustitución del residuo aspartato 119 por alanina (Kendall et al., 1992, Biochem Biophys Res Commun 187:1091-7; Montero et al., 1995, EMBO J 14:5467-75).

Las medidas de bioluminiscencia basadas en la acuorina poseen muchas ventajas como son la excelente señal/ruido debido a que el fondo es muy bajo ya que las células de mamífero no expresan proteínas bioluminiscentes de forma natural. Además, a diferencia de los indicadores fluorescentes, no se necesita luz de excitación, por lo que no existen problemas de fototoxicidad. La principal desventaja de la acuorina reside en la baja emisión de luz, debido a que cada molécula de acuorina emite un solo fotón, en contraste con los indicadores sintéticos fluorescentes, que pueden emitir hasta  $10^4$  fotones antes de apagarse. Por otra parte, la reacción de oxidación y emisión de luz de la acuorina es prácticamente irreversible, lo que hace que la apoproteína se consuma a medida que va uniendo calcio. Esto se agrava en el caso de su localización en organelas de alto  $\text{Ca}^{2+}$ , por lo que antes de reconstituir la apoacuorina con su co-factor celenterazina, debe vaciarse el RE completamente de todo su  $\text{Ca}^{2+}$ , impidiéndose de este modo las medidas basales. Además, estas limitaciones impiden registrar durante largos periodos de tiempo. Todos estos factores hacen que la acuorina sea un buen indicador para medir calcio en organelas, pero poco apropiado para estudios de imagen en célula

única en organelas de alto  $\text{Ca}^{2+}$ , requiriéndose en este caso un equipamiento altamente especializado.

Entre los GECIs fluorescentes se distinguen los basados en la transferencia de energía de resonancia de Förster (FRET) y los que sufren un cambio del espectro de emisión o excitación en función de la  $[\text{Ca}^{2+}]$ . Los primeros consisten en dos proteínas fluorescentes (derivadas de la proteína verde fluorescente, o GFP, originaria de la medusa *Aequorea victoria*), en las que el espectro de emisión de una se solapa con el de excitación de la otra. La sensibilidad a  $\text{Ca}^{2+}$  la concede la calmodulina y un péptido de unión a calmodulina (el péptido M13) (Miyawaki et al., 1997, Nature 388:882-7). En el caso de la familia más emblemática de este grupo, los camaleones, la calmodulina y el M13 se sitúan entre las dos proteínas fluorescentes, de manera que cuando la calmodulina se une al  $\text{Ca}^{2+}$ , esta sufre un cambio conformacional que la permite, a su vez, engarzar al péptido M13 (asemejándose a una lengua), acercando de este modo las proteínas fluorescentes y favoreciendo que haya FRET.

Dentro de la familia de los camaleones, la versión más optimizada es la proteína DIRE, que consta de las proteínas fluorescentes ciano (CFP) y citrina (Palmer et al., 2004, Proc Natl Acad Sci USA 101:17404-9). Se ha dirigido al RE y la baja afinidad por el  $\text{Ca}^{2+}$  se ha logrado rediseñando la región de interacción entre la calmodulina y su péptido de unión. Esto solventa una de las limitaciones del camaleón original, la afectación del sensor por la calmodulina endógena, aunque no soluciona su pequeño rango dinámico. La última versión del camaleón es el D3 en la que la citrina se ha sustituido por la proteína fluorescente venus permutada circularmente (Palmer et al., 2006, Chem Biol 13:521-30, Palmer and Tsien, 2006, Nat Protoc 1:1057-65). En esta variante la primera mitad se sitúa en el extremo C-terminal de la proteína y la segunda se convierte en el extremo N-terminal, ambos separados por un pequeño péptido espaciador. cpD3 resultó en una mejora del rango dinámico entre 5 a 8 veces respecto a versiones anteriores. El cpD3 se ha dirigido al complejo de Golgi donde se han registrado cambios en la fluorescencia, aunque todavía modestos.

Los sensores no basados en FRET son fusiones de una única molécula fluorescente y una proteína fijadora de calcio y cuyos módulos pueden disponerse entre sí de distintas formas. Los cambios de fluorescencia dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  pueden darse, tanto en su espectro de excitación como en el de emisión, y se basan en un cambio conformacional que altera el estado de protonación del cromóforo de la proteína fluorescente. Este tipo de sensores pueden clasificarse en dos familias. La primera es la familia de los canguros (Camgaroos), que consisten en la proteína amarilla fluorescente (YFP) dividida en dos mitades unidas por la calmodulina (Baird et al., 1999, Proc Natl Acad Sci USA 96:11241-6). La segunda familia es la de los pericam, consistente en la YFP permutada circularmente (Nagai et al., 2001, Proc Natl Acad Sci USA 98:3197-202). Los nuevos extremos se unen, a su vez, al péptido M13 en su extremo N-terminal y a la calmodulina en el C-terminal. Análogamente a los camaleones, en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  la calmodulina se une al M13, provocando el cambio de fluorescencia. Diversas mutaciones introducidas en la secuencia han generado 3 variantes del pericam. En uno de ellos la unión del  $\text{Ca}^{2+}$  modifica el espectro de excitación, permitiendo así las medidas ratiométricas. Este pericam es apropiado para medir  $[\text{Ca}^{2+}]$  bajas ( $K_d = 1,7 \mu\text{M}$ ) y se ha dirigido con éxito al núcleo y a la mitocondria, siendo actualmente el sensor proteico

fluorescente más popular para realizar medidas en esta organela (Nagai et al., 2001; Robert et al., 2001, EMBO J 20:4998-5007). Sin embargo, aunque se han generado mutantes de pericam de 1 orden menor de afinidad, no se ha conseguido dirigirlo al RE porque al fusionarlo disminuye drásticamente la intensidad de la fluorescencia (resultados de nuestro grupo no publicados).

Dentro de la familia de los pericam destacan los GCaMPs (Nakai et al., 2001, Nat Biotechnol 19:137-41), que se han ido perfeccionando en los últimos años hasta poder medir los cambios de calcio citosólicos asociados a un único potencial de acción (Tian et al., 2009, Nat Methods 6:875-81). Este sensor se ha utilizado principalmente sin direccionar, y hasta la fecha no se han descrito derivados para medir en orgánulos con alto contenido de calcio.

Recientemente ha surgido una nueva clase de GECIs que utiliza la propia EGFP como sensor de  $\text{Ca}^{2+}$  sin fusionarla a una proteína fijadora de  $\text{Ca}^{2+}$  (Tang et al., 2011, Proc Natl Acad Sci USA 108:16265-70). Esta proteína llamada CatchRE, en referencia a su capacidad de “atrapar” todo el  $\text{Ca}^{2+}$  del RE (muchos GECIs no pueden hacerlo debido a su alta afinidad por este ión). La sensibilidad al  $\text{Ca}^{2+}$  la confiere un sitio artificial, del tipo mano EF, creado en una región cercana al cromóforo y conformado por cinco residuos con carga negativa resultantes de cinco mutaciones.

Por lo tanto, existe una necesidad en la técnica para obtener una molécula con una afinidad baja por el  $\text{Ca}^{2+}$  para poder medir la  $[\text{Ca}^{2+}]$  en organelas con alto contenido en calcio.

### **COMPENDIO DE LA INVENCION**

En un primer aspecto, la invención se relaciona con un polipéptido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 1 (apoacuorina), en donde

- (i) en una primera posición 119 de SEQ ID NO: 1 el aminoácido es cualquier aminoácido excepto Asp, y
- (ii) en una segunda posición 24 de SEQ ID NO: 1 el aminoácido es cualquier aminoácido excepto Asp y/o en posición 157 de SEQ ID NO: 1 es cualquier aminoácido excepto Ser.

En un segundo aspecto, la invención se relaciona con una proteína de fusión que comprende

- (i) un primer polipéptido según la invención, y
  - (ii) un segundo polipéptido fluorescente,
- en donde dichos primer y segundo dominios se encuentran unidos a través de un péptido enlazador flexible.

En un tercer aspecto, la invención se relaciona con un ácido nucleico que codifica para el polipéptido de la invención o la proteína de fusión según la invención.

En un cuarto aspecto, la invención se relaciona con un casete de expresión que comprende el ácido nucleico de la invención, donde dicho ácido nucleico se encuentra bajo control de un sistema de transcripción y/o traducción apropiado.

En un quinto aspecto, la invención se relaciona con un plásmido que comprende el ácido nucleico según la invención o el casete de expresión según la invención.

En un sexto aspecto, la invención se relaciona con una célula hospedadora que comprende el ácido nucleico según la invención, el casete de expresión según la invención o el plásmido según la invención.

En un séptimo aspecto, la invención se relaciona con el uso del polipéptido según la invención o la proteína de fusión según la invención para la detección de  $\text{Ca}^{2+}$  en una muestra.

En un octavo aspecto, la invención se relaciona con un método para la determinación de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en una muestra que comprende

- (i) poner en contacto dicha muestra con un polipéptido según la invención,
- (ii) poner en contacto dicho polipéptido con un co-factor específico para el mismo,
- (iii) detectar la luminiscencia emitida por dicho polipéptido, y
- (iv) determinar la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  a partir de la variación en la intensidad de la luminiscencia con respecto a la intensidad de la luminiscencia en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$ .

En un noveno aspecto, la invención se relaciona con un método para la determinación de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en una muestra que comprende

- (i) poner en contacto dicha muestra con una proteína de fusión que comprende un primer polipéptido y un segundo polipéptido según la invención,
- (ii) detectar la luminiscencia emitida por dicho primer polipéptido en respuesta a la puesta en contacto dicha proteína de fusión con un co-factor específico para dicho primer polipéptido, o, alternativamente detectar la fluorescencia emitida por dicho segundo polipéptido en respuesta a la excitación de la muestra a una longitud de onda correspondiente a la longitud de onda de excitación de dicho segundo polipéptido, y
- (iii) determinar la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  a partir de la variación en la intensidad de la luminiscencia o fluorescencia con respecto a la intensidad de la luminiscencia o fluorescencia en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$ .

En un décimo aspecto, la invención se relaciona con un método para la detección intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  en una célula o población celular que comprende un polipéptido según la invención, en donde dicho método comprende

- (i) poner en contacto dicho polipéptido con un co-factor específico del mismo, y
- (ii) detectar la luminiscencia emitida por dicho polipéptido,

en donde una variación en la intensidad de la luminiscencia emitida por la célula o población celular con respecto a un valor de referencia es indicativo de la presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  en la célula o población celular.

En un undécimo aspecto, la invención se relaciona con un método para la detección intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  en una célula o población celular que comprende una proteína de fusión que comprende un primer polipéptido y un segundo polipéptido según la invención, en donde dicho método comprende

- (a) detectar la luminiscencia emitida por dicho primer polipéptido en respuesta a la puesta en contacto dicha proteína de fusión con un co-factor específico para dicho primer polipéptido,  
o alternativamente
- (b) detectar la fluorescencia emitida por dicho segundo polipéptido en respuesta a la excitación de la célula o población celular a una longitud de onda correspondiente a la longitud de onda de excitación de dicho segundo polipéptido

en donde una variación en la intensidad de la luminiscencia o fluorescencia emitida por la célula o población celular con respecto a un valor de referencia es indicativo de la presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  en la célula o población celular.

En un duodécimo aspecto, la invención se relaciona con método para la detección de variaciones en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en una célula o población celular a lo largo del tiempo que comprende

- (i) proporcionar una célula o población celular en donde dicha célula o células comprenden un polipéptido según la invención,
- (ii) poner en contacto dicho polipéptido con un co-factor específico del mismo,
- (iii) determinar a un primer tiempo la luminiscencia emitida por la célula o población celular, y
- (iv) determinar a un segundo tiempo la luminiscencia emitida por la célula o población celular

en donde una variación en la intensidad de la señal emitida en (iv) con respecto a la intensidad de la señal emitida en (iii) es indicativo de una variación en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en la célula o población celular.

En un decimotercer aspecto, la invención se relaciona con un método para la detección de variaciones en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en una célula o población celular a lo largo del tiempo que comprende

- (iii) proporcionar una célula o población celular en donde dicha célula o células comprenden una proteína de fusión que comprende un primer polipéptido y un segundo polipéptido según la invención,
- (ii.a) determinar a un primer tiempo la luminiscencia emitida por la célula o población celular en respuesta a la puesta en contacto dicha proteína de fusión con un co-factor específico para dicho primer polipéptido, y
- (iii.a) determinar a un segundo tiempo la luminiscencia emitida por la célula o población celular en respuesta a la puesta en contacto dicha proteína de fusión con un co-factor específico para dicho primer polipéptido,

o alternativamente

- (ii.b) determinar a un primer tiempo la fluorescencia emitida por la célula o población celular en respuesta a una excitación de dicha célula o población a una longitud de onda correspondiente a la longitud de onda de excitación de dicho segundo polipéptido y
- (iii.b) determinar a un segundo tiempo la fluorescencia emitida por la célula o población celular en respuesta a una excitación de dicha célula o población a una longitud de onda correspondiente a la longitud de onda de excitación de dicho segundo polipéptido

en donde una variación en la intensidad de la señal emitida en (iii.a) con respecto a la intensidad de la señal emitida en (ii.a) o una variación en la intensidad de la señal emitida en (iii.b) con respecto a la intensidad de la señal emitida en (ii.b) es indicativo de una variación en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en la célula o población celular.

En un decimocuarto aspecto, la invención se relaciona con un método de identificación de un compuesto con capacidad de modulación de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en una célula o población celular, que comprende

- (i) poner en contacto un compuesto candidato con una célula o población celular en donde dicha célula o células comprenden un polipéptido según la invención,
- (ii) determinar la luminiscencia emitida por la célula o población celular en respuesta a la puesta en contacto dicho polipéptido con un co-factor específico para dicho polipéptido,

en donde una alteración en la intensidad de luminiscencia determinada en la etapa (ii) con respecto a la intensidad de luminiscencia emitida en ausencia de dicho compuesto candidato es indicativo de que dicho compuesto es capaz de modular la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$ .

En un decimoquinto aspecto, la invención se relaciona con un método de identificación de un compuesto con capacidad de modulación de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en una célula o población celular, que comprende

- (i) poner en contacto un compuesto candidato con una célula o población celular en donde dicha célula o células comprenden una proteína de fusión que comprende un primer polipéptido y un segundo polipéptido según la invención,
- (ii) determinar la luminiscencia emitida por la célula o población celular en respuesta a la puesta en contacto dicha proteína de fusión con un co-factor específico para dicho primer polipéptido,

o alternativamente

determinar la fluorescencia emitida por la célula o población celular en respuesta a una excitación de dicha célula o población a una longitud de onda correspondiente a la longitud de onda de excitación de dicho segundo polipéptido,

en donde una alteración en la intensidad de luminiscencia o fluorescencia determinada en la etapa (ii) con respecto a la intensidad de fluorescencia emitida en ausencia de dicho compuesto candidato es indicativo de que dicho compuesto es capaz de modular la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$ .

### **BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS**

Figura 1. Sensibilidad a  $\text{Ca}^{2+}$  de los mutantes de GAP. Las medidas de fluorescencia a 390 y 485 nm de excitación (emisión a 535 nm) se realizaron con 1  $\mu\text{l}$  de proteína (en el rango de 3.5  $\mu\text{g}$  para cada variante) en PBS a tres concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$ : a 0 (con 100  $\mu\text{M}$  EGTA), a 100  $\mu\text{M}$  y a 1 mM para cada uno de los 10 mutantes. Los residuos mutados siguen la secuencia primaria de la proteína de la acuorina (no del gen completo de GAP). La columna Ratio se ha calculado según  $(F_{485}/F_{390})_{\text{Ca}^{2+}}/(F_{485}/F_{390})_{\text{EGTA}}$ . Cada valor es la media de 3 medidas independientes.

Figura 2. Representación esquemática de las distintas construcciones de GAP2.2 utilizadas para su expresión en procariontas y en eucariotas. El vector de expresión bacteriano (His-GAP2.2) contiene un péptido de 6 histidinas ( $\text{His}_6$ ). La construcción utilizada en células de mamífero porta la secuencia consenso Kozak (kz) que facilita su óptima expresión. La direccionalidad al RE se obtuvo (1) mediante la fusión al péptido del gen de la cadena pesada de la Ig- $\gamma$ -2b (erGAP2.2); y (2) fusionando el péptido señal de la calreticulina al extremo 5' de GAP, y la secuencia KDEL de retención en el RE a su extremo 3' (crGAP2.2).

Figura 3. Curva de titulación de GAP2.2 para calcio. En cada muestra se añadieron 3.5  $\mu\text{g}$  de la proteína GAP2.2 en tampón MOPS 20 mM, 140 mM KCl y 1 mM  $\text{MgCl}_2$  a pH 7.2. La fluorescencia se registró a 390 y 485 nm de excitación y a 535 nm de emisión. Las concentraciones de calcio utilizadas fueron: EGTA 100  $\mu\text{M}$  ( $\text{Ca}^{2+}$  0) para obtener la  $F_{\text{min}}$ , no adiciones ( $\text{Ca}^{2+}$  nominal, 20  $\mu\text{M}$  aproximadamente), 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 200  $\mu\text{M}$ , 500  $\mu\text{M}$ , 1 mM, 2 mM, 5 mM, 10 mM y 50 mM como valor de  $F_{\text{max}}$ . Cada punto representa la media  $\pm$  desviación estándar de 3 valores independientes. La curva es el mejor ajuste para una ecuación de Hill con valores de  $V_{\text{max}} = 1.01 \pm 0.018 \text{ M}$ ;  $k = 0.33 \pm 0.02 \text{ mM}$  y  $n = 0.975 \pm 0.05$ .

Figura 4. Expresión bacteriana y purificación de la proteína GAP2.2. La proteína se indujo y se extrajo según lo descrito en Materiales y Métodos y se sometió a electroforesis en gel del 12% de poliacrilamida en condiciones reductoras (SDS-PAGE). Carril 1, extracto bacteriano crudo; carril 2, primera elución tras la incubación con las bolas de  $\text{Ni}^{2+}$  (8  $\mu\text{g}$ ); carril 3, segunda elución tras la incubación con las bolas de  $\text{Ni}^{2+}$ ; carril 4, marcadores de peso molecular indicados en kDa (10  $\mu\text{l}$ , Bio-Rad); carril 5, elución tras la incubación con el tampón de unión a las bolas de  $\text{Ni}^{2+}$ ; carril 6, primer lavado; carril 7, segundo lavado.

Figura 5. Espectros de excitación y de emisión de GAP2.2. Las medidas se realizaron con 8.5  $\mu\text{g}$  de la proteína GAP2.2 en un medio de MOPS 20 mM, KCl 150 mM y  $\text{MgCl}_2$  1 mM en presencia de 1 mM  $\text{CaCl}_2$  (trazo verde) ó de 1 mM EGTA (trazo rojo).

Figura 6. Medidas de la  $[Ca^{2+}]_{RE}$  en el clon estable de HeLa para crGAP2.2. (A) Efecto del ATP (100  $\mu$ M) + Histamina (100  $\mu$ M) en 1  $CaCl_2$  o en ausencia de  $CaCl_2$  (con 0.1 mM EGTA) en presencia de terbutilhidroquinona (10  $\mu$ M TBH). El trazado es la media de 23 células en el campo. (B) Efecto de la tapsigargina (1  $\mu$ M). El trazado es la media de 37 células en el campo. (C) Imagen de fluorescencia de crGAP2.2 tomada en un microscopio confocal del clon estable de HeLa.

Figura 7. Cuantificación del nivel de fluorescencia en células HeLa transfectadas con los plásmidos que expresan GAP3.5 y GAP3.7.

## **DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION**

### Polipéptido de la invención

Los autores de la presente invención han observado que la modificación de determinados residuos de la apoacuorina da lugar a un polipéptido en el que la capacidad de unión a iones de  $Ca^{2+}$  se mantiene aunque con una afinidad reducida. Así, esta observación permite el desarrollo de sensores de calcio con una afinidad baja por el  $Ca^{2+}$  para poder medir la  $[Ca^{2+}]$  en organelas con alto contenido en calcio.

Por tanto, en un primer aspecto, la invención se relaciona con un polipéptido, en adelante “polipéptido de la invención”, que comprende la secuencia SEQ ID NO: 1 (apoacuorina), en donde

- (i) en una primera posición 119 de SEQ ID NO: 1 el aminoácido es cualquier aminoácido excepto Asp, y
- (ii) en una segunda posición 24 de SEQ ID NO: 1 el aminoácido es cualquier aminoácido excepto Asp y/o en posición 157 de SEQ ID NO: 1 es cualquier aminoácido excepto Ser.

El término “polipéptido”, según se usa en la presente invención, usado aquí indistintamente con proteína, se refiere a una cadena de aminoácidos de cualquier longitud en donde los distintos aminoácidos se encuentran unidos entre sí mediante enlaces peptídicos o por puentes disulfuro.

El término “apoacuorina”, según se usa en la presente invención, se refiere a una proteína que aparece en la naturaleza en medusas luminiscentes del género *Aequorea* (por ejemplo, *Aequorea victoria*) y de una variedad de otros organismos marinos. La apoacuorina comprende tres dominios funcionales del tipo de mano EF que funcionan como sitios de unión a  $Ca^{2+}$ . La apoacuorina forma acuorina mediante su unión a una molécula de celenterazina, que es una luciferina que actúa de grupo prostético. Los dos componentes de la acuorina se reconstituyen de manera espontánea, formando la proteína funcional. Mientras que la apoacuorina en ausencia de celenterazina no tiene actividad fluorescente, la unión a iones de  $Ca^{2+}$  resulta en un cambio conformacional de la proteína que resulta a su vez en la oxidación del grupo prostético celenterazina en celenteramida excitada y  $CO_2$ . A medida que el celenteramida excitada se relaja a su estado basal, se emite luz azul ( $\lambda = 469$  nm). En el contexto de la presente invención, se utilizan los términos apoacuorina y acuorina de manera indistinta.

El polipéptido de la invención comprende la secuencia de aminoácidos de la apoacurina (SEQ ID NO: 1), en donde en una primera posición 119 de SEQ ID NO: 1 el aminoácido es cualquier aminoácido excepto Asp, y en una segunda posición 24 de SEQ ID NO: 1 el aminoácido es cualquier aminoácido excepto Asp y/o en posición 157 de SEQ ID NO: 1 es cualquier aminoácido excepto Ser.

En un modo de realización particular, en una primera posición 119 de SEQ ID NO: 1 el aminoácido es cualquier aminoácido excepto Asp, y en una segunda posición 24 de SEQ ID NO: 1 el aminoácido es cualquier aminoácido excepto Asp.

En otra forma de realización particular, en una primera posición 119 de SEQ ID NO: 1 el aminoácido es cualquier aminoácido excepto un aminoácido con carga negativa, y en una segunda posición 24 de SEQ ID NO: 1 el aminoácido es cualquier aminoácido excepto Asp.

En otra forma de realización particular, en una primera posición 119 de SEQ ID NO: 1 el aminoácido es un aminoácido con carga neutra, y en una segunda posición 24 de SEQ ID NO: 1 el aminoácido es cualquier aminoácido excepto Asp.

En otra forma de realización particular, en una primera posición 119 de SEQ ID NO: 1 el aminoácido es Ala, y en una segunda posición 24 de SEQ ID NO: 1 el aminoácido es cualquier aminoácido excepto Asp.

En otra forma de realización particular, en una primera posición 119 de SEQ ID NO: 1 el aminoácido es cualquier aminoácido excepto Asp, y en una segunda posición 24 de SEQ ID NO: 1 el aminoácido es cualquier aminoácido excepto un aminoácido con carga negativa.

En otra forma de realización particular, en una primera posición 119 de SEQ ID NO: 1 el aminoácido es cualquier aminoácido excepto un aminoácido con carga negativa, y en una segunda posición 24 de SEQ ID NO: 1 el aminoácido es cualquier aminoácido excepto un aminoácido con carga negativa.

En otra forma de realización particular, en una primera posición 119 de SEQ ID NO: 1 el aminoácido es un aminoácido con carga neutra, y en una segunda posición 24 de SEQ ID NO: 1 el aminoácido es cualquier aminoácido excepto un aminoácido con carga negativa.

En otra forma de realización particular, en una primera posición 119 de SEQ ID NO: 1 el aminoácido es Ala, y en una segunda posición 24 de SEQ ID NO: 1 el aminoácido es cualquier aminoácido excepto un aminoácido con carga negativa.

En otra forma de realización particular, en una primera posición 119 de SEQ ID NO: 1 el aminoácido es cualquier aminoácido excepto Asp, y en una segunda posición 24 de SEQ ID NO: 1 el aminoácido es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Asn, Glu y Gln.

En otra forma de realización particular, en una primera posición 119 de SEQ ID NO: 1 el aminoácido es cualquier aminoácido excepto un aminoácido con carga negativa, y en una segunda posición 24 de SEQ ID NO: 1 el aminoácido es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Asn, Glu y Gln.

En otra forma de realización particular, en una primera posición 119 de SEQ ID NO: 1 el aminoácido es un aminoácido con carga neutra, y en una segunda posición 24 de SEQ ID NO: 1 el aminoácido es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Asn, Glu y Gln.

En otra forma de realización particular, en una primera posición 119 de SEQ ID NO: 1 el aminoácido es Ala, y en una segunda posición 24 de SEQ ID NO: 1 el aminoácido es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Asn, Glu y Gln.

En otra forma de realización particular, en una primera posición 119 de SEQ ID NO: 1 el aminoácido es cualquier aminoácido excepto Asp, y en una segunda posición 24 de SEQ ID NO: 1 el aminoácido es Asn.

En otra forma de realización particular, en una primera posición 119 de SEQ ID NO: 1 el aminoácido es cualquier aminoácido excepto un aminoácido con carga negativa, y en una segunda posición 24 de SEQ ID NO: 1 el aminoácido es Asn.

En otra forma de realización particular, en una primera posición 119 de SEQ ID NO: 1 el aminoácido es un aminoácido con carga neutra, y en una segunda posición 24 de SEQ ID NO: 1 el aminoácido es Asn.

En una forma de realización preferida, en una primera posición 119 de SEQ ID NO: 1 el aminoácido es Ala, y en una segunda posición 24 de SEQ ID NO: 1 el aminoácido es Asn.

En otra forma de realización particular, en una primera posición 119 de SEQ ID NO: 1 el aminoácido es cualquier aminoácido excepto Asp, y en una segunda posición 157 de SEQ ID NO: 1 es cualquier aminoácido excepto Ser.

En otra forma de realización particular, en una primera posición 119 de SEQ ID NO: 1 el aminoácido es cualquier aminoácido excepto un aminoácido con carga negativa, y en una segunda posición 157 de SEQ ID NO: 1 es cualquier aminoácido excepto Ser.

En otra forma de realización particular, en una primera posición 119 de SEQ ID NO: 1 el aminoácido es un aminoácido con carga neutra, y en una segunda posición 157 de SEQ ID NO: 1 es cualquier aminoácido excepto Ser.

En otra forma de realización particular, en una primera posición 119 de SEQ ID NO: 1 el aminoácido es Ala, y en una segunda posición 157 de SEQ ID NO: 1 es cualquier aminoácido excepto Ser.

En otra forma de realización particular, en una primera posición 119 de SEQ ID NO: 1 el aminoácido es cualquier aminoácido excepto Asp, y en una segunda posición 157 de SEQ ID NO: 1 es cualquier aminoácido excepto un aminoácido con carga negativa.

En otra forma de realización particular, en una primera posición 119 de SEQ ID NO: 1 el aminoácido es cualquier aminoácido excepto un aminoácido con carga negativa, y en una segunda posición 157 de SEQ ID NO: 1 es cualquier aminoácido excepto un aminoácido con carga negativa.

En otra forma de realización particular, en una primera posición 119 de SEQ ID NO: 1 el aminoácido es un aminoácido con carga neutra, y en una segunda posición 157 de SEQ ID NO: 1 es cualquier aminoácido excepto un aminoácido con carga negativa.

En otra forma de realización particular, en una primera posición 119 de SEQ ID NO: 1 el aminoácido es Ala, y en una segunda posición 157 de SEQ ID NO: 1 es cualquier aminoácido excepto un aminoácido con carga negativa.

En otra forma de realización particular, en una primera posición 119 de SEQ ID NO: 1 el aminoácido es cualquier aminoácido excepto Asp, y en una segunda posición 157 de SEQ ID NO: 1 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Asn, Glu y Gln.

En otra forma de realización particular, en una primera posición 119 de SEQ ID NO: 1 el aminoácido es cualquier aminoácido excepto un aminoácido con carga negativa, y en una segunda posición 157 de SEQ ID NO: 1 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Asn, Glu y Gln.

En otra forma de realización particular, en una primera posición 119 de SEQ ID NO: 1 el aminoácido es un aminoácido con carga neutra, y en una segunda posición 157 de SEQ ID NO: 1 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Asn, Glu y Gln.

En otra forma de realización particular, en una primera posición 119 de SEQ ID NO: 1 el aminoácido es Ala, y en una segunda posición 157 de SEQ ID NO: 1 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Asn, Glu y Gln.

En otra forma de realización particular, en una primera posición 119 de SEQ ID NO: 1 el aminoácido es cualquier aminoácido excepto Asp, y en una segunda posición 157 de SEQ ID NO: 1 es Asn.

En otra forma de realización particular, en una primera posición 119 de SEQ ID NO: 1 el aminoácido es cualquier aminoácido excepto un aminoácido con carga negativa, y en una segunda posición 157 de SEQ ID NO: 1 es Asn.

En otra forma de realización particular, en una primera posición 119 de SEQ ID NO: 1 el aminoácido es un aminoácido con carga neutra, y en una segunda posición 157 de SEQ ID NO: 1 es Asn.

En otra forma de realización preferida, en una primera posición 119 de SEQ ID NO: 1 el aminoácido es Ala, y en una segunda posición 157 de SEQ ID NO: 1 es Asn.

En otra forma de realización particular, en una primera posición 119 de SEQ ID NO: 1 el aminoácido es cualquier aminoácido excepto Asp, y en una segunda posición 24 de SEQ ID NO: 1 el aminoácido es cualquier aminoácido excepto Asp y en posición 157 de SEQ ID NO: 1 es cualquier aminoácido excepto Ser.

En otra forma de realización particular, en una primera posición 119 de SEQ ID NO: 1 el aminoácido es cualquier aminoácido excepto un aminoácido con carga negativa, y en una segunda posición 24 de SEQ ID NO: 1 el aminoácido es cualquier aminoácido excepto Asp y en posición 157 de SEQ ID NO: 1 es cualquier aminoácido excepto Ser.

En otra forma de realización particular, en una primera posición 119 de SEQ ID NO: 1 el aminoácido es un aminoácido con carga neutra, y en una segunda posición 24 de SEQ ID NO: 1 el aminoácido es cualquier aminoácido excepto Asp y en posición 157 de SEQ ID NO: 1 es cualquier aminoácido excepto Ser.

En otra forma de realización particular, en una primera posición 119 de SEQ ID NO: 1 el aminoácido es Ala, y en una segunda posición 24 de SEQ ID NO: 1 el aminoácido es cualquier aminoácido excepto Asp y en posición 157 de SEQ ID NO: 1 es cualquier aminoácido excepto Ser.

En otra forma de realización particular, en una primera posición 119 de SEQ ID NO: 1 el aminoácido es cualquier aminoácido excepto Asp, y en una segunda posición 24 de SEQ ID NO: 1 el aminoácido es cualquier aminoácido excepto Asp y en posición 157 de SEQ ID NO: 1 es cualquier aminoácido excepto Ser.

En otra forma de realización particular, en una primera posición 119 de SEQ ID NO: 1 el aminoácido es cualquier aminoácido excepto un aminoácido con carga negativa, y en una segunda posición 24 de SEQ ID NO: 1 el aminoácido es cualquier aminoácido excepto un aminoácido con carga negativa y en posición 157 de SEQ ID NO: 1 es cualquier aminoácido excepto Ser.

En otra forma de realización particular, en una primera posición 119 de SEQ ID NO: 1 el aminoácido es un aminoácido con carga neutra, y en una segunda posición 24 de SEQ ID NO: 1 el aminoácido es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Asn, Glu y Gln y en posición 157 de SEQ ID NO: 1 es cualquier aminoácido excepto Ser.

En otra forma de realización particular, en una primera posición 119 de SEQ ID NO: 1 el aminoácido es Ala, y en una segunda posición 24 de SEQ ID NO: 1 el aminoácido es Asn y en posición 157 de SEQ ID NO: 1 es cualquier aminoácido excepto Ser.

En otra forma de realización particular, en una primera posición 119 de SEQ ID NO: 1 el aminoácido es cualquier aminoácido excepto Asp, y en una segunda posición 24 de SEQ ID NO: 1 el aminoácido es cualquier aminoácido excepto Asp y en posición 157 de SEQ ID NO: 1 es cualquier aminoácido excepto un aminoácido con carga negativa.

En otra forma de realización particular, en una primera posición 119 de SEQ ID NO: 1 el aminoácido es cualquier aminoácido excepto un aminoácido con carga negativa, y en una segunda posición 24 de SEQ ID NO: 1 el aminoácido es cualquier aminoácido excepto un aminoácido con carga negativa y en posición 157 de SEQ ID NO: 1 es cualquier aminoácido excepto un aminoácido con carga negativa.

En otra forma de realización particular, en una primera posición 119 de SEQ ID NO: 1 el aminoácido es un aminoácido con carga neutra, y en una segunda posición 24 de SEQ ID NO: 1 el aminoácido es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Asn, Glu y Gln y en posición 157 de SEQ ID NO: 1 es cualquier aminoácido excepto un aminoácido con carga negativa.

En otra forma de realización particular, en una primera posición 119 de SEQ ID NO: 1 el aminoácido es Ala, y en una segunda posición 24 de SEQ ID NO: 1 el aminoácido es Asn y en posición 157 de SEQ ID NO: 1 es cualquier aminoácido excepto un aminoácido con carga negativa.

En otra forma de realización particular, en una primera posición 119 de SEQ ID NO: 1 el aminoácido es cualquier aminoácido excepto Asp, y en una segunda posición 24 de SEQ ID NO: 1 el aminoácido es cualquier aminoácido excepto Asp y en posición 157 de SEQ ID NO: 1 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Asn, Glu y Gln.

En otra forma de realización particular, en una primera posición 119 de SEQ ID NO: 1 el aminoácido es cualquier aminoácido excepto un aminoácido con carga negativa, y en una segunda posición 24 de SEQ ID NO: 1 el aminoácido es cualquier aminoácido excepto un aminoácido con carga negativa y en posición 157 de SEQ ID NO: 1 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Asn, Glu y Gln.

En otra forma de realización particular, en una primera posición 119 de SEQ ID NO: 1 el aminoácido es un aminoácido con carga neutra, y en una segunda posición 24 de SEQ ID NO: 1 el aminoácido es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Asn, Glu y Gln y en posición 157 de SEQ ID NO: 1 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Asn, Glu y Gln.

En otra forma de realización particular, en una primera posición 119 de SEQ ID NO: 1 el aminoácido es Ala, y en una segunda posición 24 de SEQ ID NO: 1 el aminoácido es Asn y en posición 157 de SEQ ID NO: 1 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Asn, Glu y Gln.

En otra forma de realización particular, en una primera posición 119 de SEQ ID NO: 1 el aminoácido es cualquier aminoácido excepto Asp, y en una segunda posición 24 de SEQ ID NO: 1 el aminoácido es cualquier aminoácido excepto Asp y en posición 157 de SEQ ID NO: 1 es Asn.

En otra forma de realización particular, en una primera posición 119 de SEQ ID NO: 1 el aminoácido es cualquier aminoácido excepto un aminoácido con carga negativa, y en

una segunda posición 24 de SEQ ID NO: 1 el aminoácido es cualquier aminoácido excepto un aminoácido con carga negativa y en posición 157 de SEQ ID NO: 1 es Asn.

En otra forma de realización particular, en una primera posición 119 de SEQ ID NO: 1 el aminoácido es un aminoácido con carga neutra, y en una segunda posición 24 de SEQ ID NO: 1 el aminoácido es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Asn, Glu y Gln y en posición 157 de SEQ ID NO: 1 es Asn.

En otra forma de realización particular, en una primera posición 119 de SEQ ID NO: 1 el aminoácido es Ala, y en una segunda posición 24 de SEQ ID NO: 1 el aminoácido es Asn y en posición 157 de SEQ ID NO: 1 es Asn.

En el contexto de la presente invención, los polipéptidos de la invención están derivados de la secuencia de apoacurina (SEQ ID NO: 1), en donde se modifican los aminoácidos en la posición 119 y en la posición 24 y/o 157 de dicha secuencia, presentan una afinidad por  $\text{Ca}^{2+}$  reducida con respecto a la afinidad de la apoacurina. Los polipéptidos de la invención tendrán preferiblemente una afinidad relativa a la afinidad de la acurina de al menos 10,000 veces menos, al menos 1,000 veces menos, al menos 500 veces menos, al menos 400 veces menos, al menos 300 veces menos, al menos 200 veces menos, al menos 100 veces menos, al menos 30 veces menos, al menos 60 veces menos, al menos 50 veces menos, al menos 45 veces menos, al menos 40 veces menos, al menos 35 veces menos, al menos 30 veces menos, al menos 25 veces menos, al menos 24 veces menos, al menos 23 veces menos, al menos 22 veces menos, al menos 21 veces menos o al menos 20 veces menos. Métodos para determinar la afinidad de dichas variantes o fragmentos de acurina son bien conocidos en la técnica e incluyen, sin limitación, experimentos de competición utilizando ligandos marcados radiactivamente, resonancia de superficie de plasmón, termoforesis a microescala, calorimetría de titulación isotermal. Métodos adecuados para determinar la capacidad de una proteína de unir  $\text{Ca}^{2+}$  incluyen, por ejemplo, el método descrito en el ejemplo de la presente invención.

En una forma de realización preferida, el polipéptido de acuerdo a la presente invención comprende al menos un péptido de localización que permite dirigir el polipéptido a diferentes localizaciones celulares. Esto es potencialmente beneficioso para la detección de  $\text{Ca}^{2+}$  en distintos lugares subcelulares de manera específica. Por tanto, en otra realización particular, la proteína de fusión de la invención comprende además un péptido de localización en posición amino-terminal y un péptido de localización en posición carboxilo-terminal.

El término "péptido de localización", "péptido señal de localización" o "péptido señal", según se usa en la presente invención, se refiere a un péptido corto (3-60 aminoácidos de longitud) que dirige el transporte de una proteína a un determinado compartimento intracelular. El término "péptido de localización", según se usa en la presente invención, se refiere tanto a secuencias que promueven activamente el transporte de una proteína fusionada a dicha secuencia a un determinado compartimento intracelular (en cuyo caso se conocen como péptido señal de localización" o "péptido señal) como a una secuencia que impide que una proteína fusionada a ella escape de un determinado compartimento

intracelular una vez que dicha proteína se encuentra en dicho compartimento, en cuyo caso se conocen como péptido o señal de retención.

Los péptidos de localización se pueden encontrar en posición amino o carboxilo-terminal o en el interior de la secuencia de la proteína. En una realización preferida, el péptido de localización está en posición amino-terminal. En otra realización preferida, el péptido de localización está en posición carboxilo-terminal.

Péptidos de localización adecuados para su uso en la presente invención incluyen, sin limitación, péptidos de localización capaces de dirigir una proteína a la membrana de la célula, al núcleo, a la membrana nuclear, a la matriz mitocondrial, a la membrana mitocondrial, al retículo endoplásmico o sarcoplásmico, al citoplasma, al complejo de Golgi, al cloroplasto, al apoplasto o al peroxisoma.

En una forma preferida de realización, el péptido de localización es un péptido de localización nuclear. Ejemplos ilustrativos de péptido de localización nuclear incluyen PKKKRKV (SEQ ID NO: 2), PQKKIKS (SEQ ID NO: 3), PPKKKRKV (SEQ ID NO: 4), QPKKP (SEQ ID NO: 5), RKKR (SEQ ID NO: 6), RKKRRQRRRAHQ (SEQ ID NO: 7), RQARRNRRRWRERQR (SEQ ID NO: 8), MPLTRRRPAASQALAPPTP (SEQ ID NO: 9), GAALTILV (SEQ ID NO: 10) y GAALTLLG (SEQ ID NO: 11). En una forma de realización aún más preferida, la secuencia de localización nuclear comprende la secuencia de nucleoplasmina de *Xenopus laevis* (SEQ ID NO: 12).

En una forma preferida de realización, la secuencia de localización es una secuencia de localización al complejo de Golgi. En una forma de realización más preferida, la secuencia de localización al complejo de Golgi comprende la secuencia de localización en el complejo de Golgi de galactosiltransferasa (SEQ ID NO: 13).

En una forma preferida de realización, la secuencia de localización es una secuencia de localización al citoplasma. En una forma de realización más preferida, la secuencia de localización al citoplasma es la secuencia de la luciferasa (SEQ ID NO: 14).

En una forma preferida de realización, el péptido de localización es un péptido que dirige la proteína a la matriz mitocondrial. Secuencias capaces de dirigir una proteína a la mitocondria incluyen, sin limitación, la secuencia RRIVVLHGYGAVKEVLLNHK (SEQ ID NO: 15), la secuencia que comprende los aminoácidos 74-95 del citocromo P450 2E1 (CYP2E1) de rata (SRRIVVLHGYKAVKEVLLNHKN; SEQ ID NO: 16) (Neve and Ingelman-Sundberg, *J. Biol. Chem.* 2001, 276:11317-22), la secuencia del precursor de la citocromo c oxidasa IV de levadura (MLSLRQDIRFFKPATRTLCSRR; SEQ ID NO: 17) (Maarse et al., *EMBO J.* 1984, 3:2831-37 y Hurt et al., *FEBS* 1984, 178:306-310); la secuencia de transporte mitocondrial de la proteína PB2 protein de los virus de la gripe (Carr et al., *Virology* 2006, 344:492-508); la secuencia de transporte mitocondrial presente en las hemo líasas (Diekert et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1999, 96:11752-57); la secuencia señal de la enzima de la matriz mitocondrial ornitina transcarbamilasa (OTC) (Horwich et al., *EMBO J.* 1985, 4:1129-35; Hay et al., *Biochim. Biophys. Acta* 1984, 779:65-87; Fujiwara et al., *Genome Inform. Ser. Workshop, Genome Inform.* 1997, 8:53-60) y el péptido de direccionamiento mitocondrial de la proteína Noxa humana (KLLNLISKLF; SEQ ID NO: 18). En una

forma más preferida de realización, la secuencia de localización es una secuencia de localización a la mitocondria comprende la secuencia de localización mitocondrial de la citocromo c oxidasa VIII humana. En otra forma preferida de realización, el péptido de localización mitocondrial comprende la secuencia MLFNLRXXLNNAAFRHGHNFMRNFRFCGQPLX (SEQ ID NO: 19).

En una realización preferida, la proteína de fusión comprende una primera secuencia señal de direccionamiento a la ruta secretora y una segunda señal de retención en el retículo endoplásmico.

Ejemplos no limitantes de secuencias de direccionamiento a la ruta secretora incluyen las secuencias señal que aparecen en las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I y II, secuencias señal de citoquinas o inmunoglobulinas, secuencias señal de la cadena invariante o de las proteínas Lampl, Tapasin, Erp57, Calreticulin, Calnexin. Preferiblemente, la secuencia de direccionamiento a la ruta secretora se selecciona del grupo consistente en:

- la secuencia MMSFVSLLL VGILFWATEAEQLTKCEVFQ (SEQ ID NO: 20);
- el péptido señal de PTH1R humana (H<sub>2</sub>N-MGTARIAPGLALLLCCPVLSSAYAL-, SEQ ID NO: 21);
- secuencia de localización mitocondrial de la citocromo c oxidasa VIII humana (H<sub>2</sub>N-MSVLTPLLLRGLTGSARRLPVPRAK- SEQ ID NO: 22);
- el péptido señal de mGluR5 humana (H<sub>2</sub>N-MVLLLILSVLLLKEDVRGSA-, SEQ ID NO: 23);
- el péptido señal de GABA<sub>B2</sub>R humana (H<sub>2</sub>N-MASPRSSGQGP PPPPPPPARLLLLLLLPLLLPLAPG-, SEQ ID NO: 24);
- el péptido señal de la calreticulina humana (H<sub>2</sub>N-MLLSVPLLLGLLGLAVA-, SEQ ID NO: 25);
- el péptido señal de la cadena pesada de Iγ2b humana, (H<sub>2</sub>N-MGWSCHILFLVATATGKGLTVAGLRSGHIYG-, SEQ ID NO: 26); y

en donde dichas secuencias se encuentran en posición N-terminal en la proteína de fusión.

Ejemplos no limitantes de secuencias de retención en el retículo endoplásmico incluyen un péptido de retención en el retículo endoplásmico en posición carboxilo terminal y una secuencia de interacción con BiP.

En una realización más preferida, el péptido de retención en el retículo endoplásmico incluyen las secuencias KDEL (SEQ ID NO: 27), DDEL (SEQ ID NO: 28), DEEL (SEQ ID NO: 29), QEDL (SEQ ID NO: 30), RDEL (SEQ ID NO: 31), and GQNLSTSN (SEQ ID NO: 32), en donde dichas secuencias se localizan en posición C-terminal.

En una realización más preferida, el péptido de retención en el retículo endoplásmico es una secuencia de interacción con BiP. En una forma de realización aún más preferida, la secuencia de interacción con BiP comprende los dominios VDJ y CH1 de la cadena pesada de la inmunoglobulina Iγ2b.

En una forma preferida de realización, el polipéptido de la invención comprende la secuencia señal de calreticulina en el extremo N-terminal, y la secuencia de retención KDEL (SEQ ID NO: 27) en el extremo C-terminal. En otra forma de realización, el polipéptido ha perdido la secuencia señal tras ser traslocado al retículo endoplásmico y comprende la secuencia de retención KDEL (SEQ ID NO: 27) en el extremo C-terminal.

En otra forma de preferida de realización, la invención se refiere a un polipéptido que comprende el péptido señal de I $\gamma$ 2b, los dominios VDJ y CH1 de la cadena pesada de la inmunoglobulina I $\gamma$ 2b en el extremo N-terminal. En otra forma de realización, el polipéptido ha perdido la secuencia señal tras ser traslocado al retículo endoplásmico y comprende los dominios VDJ y CH1 de la cadena pesada de la inmunoglobulina I $\gamma$ 2b en el extremo N-terminal.

Los polipéptidos de acuerdo a la presente invención pueden contener una o más etiquetas que permitan su detección o purificación. Etiquetas de detección/purificación adecuadas incluyen hexahistidinas (resto de quelato metálico), etiquetas que muestran afinidad por glutatión (glutatión S-transferasa), péptido de unión a calmodulina (CBP), etiqueta de estreptomycin, dominio de unión a celulosa, proteína de unión a maltosa, etiqueta de S-péptido, etiqueta de unión a quitina, epítomos inmunorreactivos, etiquetas de epítipo, E2tag, etiqueta de epítipo HA, epítipo Myc, epítipo FLAG, epítomos AU1 y AU5, epítipo Glu-Glu, epítipo KT3, epítipo IRS, epítipo Btag, epítipo de proteína quinasa-C, epítipo de VSV o cualquier otra etiqueta siempre que la etiqueta no afecte a la estabilidad de la proteína. En una forma preferida de realización la etiqueta es una etiqueta de hexahistidina.

#### Proteína de fusión de la invención

El polipéptido de la invención requiere de la interacción con su grupo prostético, celenterazina, para emitir luz en respuesta a la unión de Ca<sup>2+</sup>. Como el experto en la materia apreciará, la fusión del polipéptido de la invención a un segundo polipéptido que permita la detección de la unión de Ca<sup>2+</sup> independientemente de la presencia de celenterazina, como por ejemplo un polipéptido fluorescente, puede ser ventajosa en entornos donde la celenterazina no está presente de manera natural.

Por lo tanto, en un segundo aspecto, la invención se relaciona con una proteína de fusión, en adelante “proteína de fusión de la invención”, que comprende

- (i) un primer polipéptido según el primer aspecto de la invención y de cualquiera de sus realizaciones, y
- (ii) un segundo polipéptido fluorescente,

en donde dichos primer y segundo dominios se encuentran unidos a través de un péptido enlazador flexible.

El primer polipéptido está definido en el apartado “polipéptido de la invención”. Las formas de realización del mismo relativas a las variaciones en las posiciones 119, 24 y 157 de SEQ ID NO: 1 son aplicables a la proteína de fusión del segundo aspecto de la invención.

El segundo polipéptido de la proteína de fusión de la invención es un polipéptido fluorescente. El término “polipéptido fluorescente” o “proteína fluorescente”, según se usa en la presente invención, se refiere un polipéptido con capacidad de emitir luz en respuesta a una absorción de luz o de otra radiación electromagnética. Prácticamente cualquier proteína o proteína fluorescente puede emplearse. Ejemplos no limitativos de dominios y proteínas fluorescentes son la proteína verde fluorescente (GFP o wtGFP), variantes de GFP para diferentes longitudes de onda de emisión, intensidad de emisión y/o estabilidad de la proteína tales como la Superfolder GFP, variantes de EGFP para distintas longitudes de onda de emisión (colores) como la proteína fluorescente azul (EBFP), cyan (ECFP), y amarilla (YFP), GFPuv (caracterizado por presentar las mutaciones F99S, M153T y V163A en la secuencia de GFP; SEQ ID NO: 33), Emerald, mPlum, mCherry, tdTomato, mStrawberry, J-Red, , mOrange, mKO, YFP, EYFP, mCitrine, Venus, YPet, CyPet, CFP, ECFP, mCFPm, Cerulean, y T-Sapphire. Otros polipéptidos fluorescentes incluyen la proteína roja fluorescente (RFP), DsRed y sus variantes DsRed2, DsRed-Express, RedStar, HcRed1, Kaede, EosFP, y la proteína fluorescente Kindling (KFP).

En una forma particular de realización, el polipéptido fluorescente es cualquier polipéptido fluorescente.

En una forma preferida de realización, el polipéptido fluorescente es GFPuv o una variante funcionalmente equivalente del mismo.

El término “GFPuv” (SEQ ID NO: 33), según se usa en la presente invención, se refiere a una variante de la proteína verde fluorescente (GFP) caracterizada por presentar las mutaciones F99S, M153T y V163A con respecto a la secuencia de GFP de *A. victoria* (Número de acceso en GenBank P42212.1 en la versión de 17 de diciembre de 2011). Esta proteína se caracteriza por mostrar una expresión más rápida, por ser 18 veces más brillante que la GFP y por presentar dos máximos de excitación (403 nm y 470 nm) y uno de emisión (510 nm).

El término “GFP”, según se usa en la presente invención, se refiere a una proteína compuesta de 238 aminoácidos, con un peso molecular de 26.9 kDa y que presenta fluorescencia verde brillante cuando se expone a la luz azul ultravioleta. A pesar de muchos otros organismos marinos tienen proteínas verdes fluorescentes similares, GFP tradicionalmente se refiere a la primera proteína aislada de la medusa *A. victoria*. La GFP de *A. victoria* tiene un máximo de excitación principal a una longitud de onda de 395 nm y uno menor a 475 nm. Su máximo de emisión es a 509 nm. El rendimiento de fluorescencia cuántica de la GFP es de 0,79. En *A. victoria*, la GFP transduce la quimioluminiscencia azul de la acorina a luz verde fluorescente mediante una transferencia de energía.

En el contexto de la presente invención, el término “variante de GFPuv (SEQ ID NO: 33)” o “variante funcionalmente activa de GFPuv (SEQ ID NO: 33)”, se refiere a (i) una variante de SEQ ID NO: 33 (GFPuv) en la que uno o más aminoácidos se han sustituido por aminoácidos conservados o no conservados, y codificados por el código genético o no, o (ii) variantes que comprenden una inserción o una delección de uno o más

aminoácidos, en donde dichas variantes (i) y (ii) mantienen dos máximos en su espectro de excitación y al menos un máximo en su espectro de emisión. Por tanto, para identificar variantes funcionalmente activas de GFPuv será evidente para el experto en la materia la necesidad de determinar el espectro de emisión y el espectro de excitación de las mismas. En un experimento típico, el máximo de la longitud de onda de emisión se determina excitando el polipéptido fluorescente a la longitud de onda correspondiente al máximo de excitación. Se utiliza un monocromador (dispositivo que permite el paso de bandas estrechas de longitud de onda de luz) para analizar la intensidad de emisión de fluorescencia en toda la serie de longitudes de onda de emisión. La intensidad relativa de la fluorescencia se mide a diferentes longitudes de onda para trazar el espectro de emisión. El espectro de excitación se determina de manera similar mediante el control de emisión de fluorescencia a la longitud de onda de máxima intensidad, mientras que el fluoróforo se excita a través de un grupo de longitudes de onda consecutivos. Se escoge la longitud de onda de emisión máxima y sólo se permite el paso de luz emitida en esa longitud de onda hacia el detector. La excitación es inducida (generalmente por medio de un monocromador) a longitudes de onda de excitación diferentes y la intensidad de la fluorescencia emitida se mide en función de la longitud de onda. Como resultado se obtiene un gráfico o curva que representa la intensidad relativa de fluorescencia producida por la excitación de todo el espectro de longitudes de onda de excitación. Ejemplos no limitativos de instrumentos adecuados para la detección de fluorescencia incluyen espectrofluorómetros y lectores de microplacas, microscopios de fluorescencia, escáneres de fluorescencia, incluyendo lectores de microarrays y citómetros de flujo.

En el contexto de la presente invención, se entiende por “actividad de GFPuv” o “actividad de cualquiera de las variantes de GFPuv” a la capacidad de excitarse a al menos dos longitudes de onda correspondientes a aproximadamente los máximos de longitudes de onda de excitación de dichas proteínas, y a la capacidad de emitir luz a una longitud de onda correspondiente a aproximadamente el máximo de longitud de onda de emisión de dichas proteínas. Las variantes funcionalmente activas de GFPuv según la invención tendrán preferiblemente una identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 33 de al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90%, al menos el 91%, al menos el 92%, al menos el 93%, al menos el 94%, al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98% o al menos el 99%. Asimismo, las variantes funcionalmente activas según la invención tendrán preferiblemente una actividad de al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90%, al menos el 91%, al menos el 92%, al menos el 93%, al menos el 94%, al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98% o al menos el 99% de la actividad de la GFPuv de SEQ ID NO: 33.

En una forma preferida de realización, el polipéptido fluorescente es el polipéptido de secuencia SEQ ID NO: 33 (GFPuv) en donde

- el aminoácido en posición 15 es Gln,
- el aminoácido en posición 167 es Val,
- el aminoácido en posición 175 es Gly, y
- el aminoácido en posición 180 es Tyr,

En otra forma preferida de realización, el polipéptido fluorescente es el polipéptido de secuencia SEQ ID NO: 33 (GFPuv) en donde

- el aminoácido en posición 15 es Gln,
- el aminoácido en posición 167 es Val,
- el aminoácido en posición 175 es Gly,
- el aminoácido en posición 180 es Tyr, y
- el aminoácido en posición 153 es Lys.

A lo largo de la descripción, las posiciones 15, 167, 175, 180 y 153 se definen por referencia a al polipéptido de secuencia SEQ ID NO:33, independientemente de que el polipéptido de SEQ ID NO;33 aparezca en posición N- o C-terminal en la proteína de fusión.

La proteína de fusión de la invención comprende además un péptido flexible que une el primer dominio y el segundo dominio de la misma de manera covalente. El término “péptido flexible”, “péptido espaciador”, “péptido linker” o “péptido conector”, según se usa en la presente invención, se refiere a un péptido que une de manera covalente dichos primer y segundo dominios, que no forma parte ni del primer ni del segundo dominios, permitiendo el movimiento de un dominio con respecto del otro, sin causar sustancialmente un detrimento en la función de uno de los dominios unidos y permitiendo que la proteína de fusión sufra un cambio conformacional que modifique las propiedades fluorescentes del segundo polipéptido en respuesta a la unión de  $\text{Ca}^{2+}$  al primer polipéptido. En una realización preferida, dicho péptido flexible une los dominios sin causar sustancialmente un detrimento en la función de ninguno de los dos dominios unidos. No es necesario que el primer y segundo dominios estén dispuestos en ese orden y, en este caso, la invención contempla proteínas de fusión en las que el primer dominio está situado en posición amino-terminal con respecto al segundo, y en donde el primer dominio está situado en posición carboxilo-terminal con respecto al segundo.

El péptido flexible comprende al menos un aminoácido, al menos dos aminoácidos, al menos tres aminoácidos, al menos cuatro aminoácidos, al menos cinco aminoácidos, al menos seis aminoácidos, al menos siete aminoácidos, al menos ocho aminoácidos, al menos nueve aminoácidos, al menos 10 aminoácidos, al menos 12 aminoácidos, al menos 14 aminoácidos, al menos 16 aminoácidos, al menos 18 aminoácidos, al menos 20 aminoácidos, al menos 25 aminoácidos, al menos 30 aminoácidos, al menos 35 aminoácidos, al menos 40 aminoácidos, al menos 45 aminoácidos, al menos 50 aminoácidos, al menos 60 aminoácidos, al menos 70 aminoácidos, al menos 80 aminoácidos, al menos 90 aminoácidos, o aproximadamente 100 aminoácidos.

Péptidos flexibles adecuados para su uso en la presente invención son todos aquellos que han sido descritos con anterioridad como adecuados para unir dos dominios polipeptídicos y que permiten que dichos dominios polipeptídicos conserven sustancialmente su estructura nativa y actividad, tales como los descritos en el documento WO2009150284. En una forma preferida de realización, el péptido enlazador está formado mayoritariamente por restos de glicina, serina y/o prolina. Péptidos enlazadores adecuados para su uso en la presente invención incluyen péptidos que comprenden las secuencias  $(\text{Gly-Ser})_n$ ,  $(\text{Gly}_m\text{Ser})_n$  o  $(\text{Ser}_m\text{Gly})_n$ , en donde m es 1 a

6, en particular 1 a 4 y típicamente 2 a 4 y n es 1 a 30 o 1 a 10 y, típicamente, 1 a 4 y que, opcionalmente, comprenden algunos restos de glutámico (Glu) o lisina (Lys) repartidos a lo largo de la secuencia para mejorar la solubilidad (véase, por ejemplo, WO 96/06641, que proporciona ejemplos de péptidos enlazadores). Péptidos enlazadores ejemplares incluyen, sin limitación, péptidos que comprenden la secuencia GGSSRSSSSGGGGSGGGG (SEQ ID NO: 34), GSGRSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 35), EGSSGSGSESKST (SEQ ID NO: 36), EGKSSGSGSESKSTQ (SEQ ID NO: 37), EGKSSGSGSESKVD (SEQ ID NO: 38), GSTSGSGKSSEGKG (SEQ ID NO: 39), KESGSVSSEQLAQFRSLD (SEQ ID NO: 40) y ESGSVSSEELAFRSLD (SEQ ID NO: 41).

Otros ejemplos no limitativos de péptidos flexibles incluyen los siguientes:

- el péptido de secuencia TATPATTPTTAPTAGT (SEQ ID NO: 42);
- el péptido de secuencia TATPATTPTTAPTAGTTATPATTPTTAPTAGT (SEQ ID NO: 43);
- el péptido de secuencia GTKVHMK (SEQ ID NO: 44) formado por los residuos 53-56 y 57-59 de tetranectina (Nielsen et al., 1997, "Crystal structure of tetranectin, a trimeric plasminogen-binding protein with an alpha-helical coiled coil." FEBS Lett 412:388-396);
- la hebra conectora 3 de la fibronectina humana (SEQ ID NO: 45), correspondiente a los aminoácidos 1992-2102 (numeración SWISSPROT, entrada P02751);
- la subsecuencia PGTSGQQPSVGQQ (SEQ ID NO: 46) correspondiente al número de aminoácidos 2037-2049 de la fibronectina, y dentro de esa subsecuencia el fragmento GTSGQ (SEQ ID NO: 47) correspondiente a los aminoácidos 2038-2042;
- la secuencia de 10 aminoácidos de la región de la bisagra superior de la IgG3 murina (PKPSTPPGSS, SEQ ID NO: 48);
- el péptido de secuencia APAETKAEPMT (SEQ ID NO: 49);
- el péptido de secuencia GAP;
- el péptido de secuencia SGGSGSGGQ (SEQ ID NO: 50); y
- el péptido de secuencia GGSSRSSS (SEQ ID NO: 51).

En una realización preferida, el péptido flexible es un péptido con secuencia SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43 o SEQ ID NO: 51, o variantes o fragmentos del mismo que mantienen sustancialmente su actividad. En una realización aún más preferida, el péptido flexible es un péptido con secuencia SEQ ID NO: 42.

El experto en la materia apreciará que la disposición relativa del primer y segundo polipéptido puede variar siempre que la proteína de fusión mantenga la propiedad de sufrir un cambio en las propiedades fluorescentes del segundo polipéptido en respuesta a la unión de  $\text{Ca}^{2+}$  al primer polipéptido. Así, en una forma preferida de realización, el extremo C-terminal del primer polipéptido se encuentra asociado al péptido enlazador que a su vez se encuentra unido al segundo polipéptido a través del extremo N-terminal de éste. En otra forma preferida de realización, el extremo C-terminal del segundo polipéptido se encuentra asociado al péptido enlazador que a su vez se encuentra unido al primer polipéptido a través del extremo N-terminal de éste.

El término “propiedades fluorescentes”, según se usa en la presente invención, se refiere a las características del espectro de excitación y el espectro de emisión del segundo polipéptido. La fluorescencia es una forma de luminiscencia en la que la emisión de luz por una sustancia que ha absorbido luz o radiación electromagnética de otro tipo. En la mayoría de los casos, la luz emitida tiene una longitud de onda más larga, y por lo tanto, la energía más baja, de la radiación absorbida. Sin embargo, cuando la radiación electromagnética absorbida es intensa, es posible que un electrón pueda absorber dos fotones; esta absorción de dos fotones puede conducir a la emisión de radiación de longitud de onda más corta que la radiación absorbida. La radiación emitida puede ser también de la misma longitud de onda que la radiación absorbida, denominada fluorescencia de resonancia.

Una sustancia, elemento o polipéptido fluorescente se caracteriza por sus espectros de excitación y de emisión. El término “espectro de emisión” se refiere al rango de longitudes de onda específicas necesarias para excitar una molécula fluorescente para emitir luz. Comúnmente se suele representar en un gráfico la excitancia de fotones del espectro frente a la longitud de onda de la excitación. El término “espectro de emisión” se refiere al rango de longitudes de onda de la radiación electromagnética emitida por los átomos del elemento o las moléculas del compuesto cuando se devuelven a un estado energético más bajo o de reposo. Comúnmente se suele representar en un gráfico de la emisión espectral de potencia radiante (excitancia radiante espectral) o de la irradiancia espectral de fotones emitidos (excitancia fotones del espectro) frente a la longitud de onda.

Métodos para determinar el espectro de emisión y el espectro de excitación de un polipéptido fluorescente son bien conocidos en el estado de la técnica. En un experimento típico, la longitud de onda de máxima absorción (por lo general el mismo que el máximo de excitación) se determina mediante la excitación usando un monocromador (dispositivo que permite el paso de bandas estrechas de longitud de onda de luz) en toda la serie de longitudes de onda. La intensidad relativa de la fluorescencia se mide a diferentes longitudes de onda para trazar el espectro de emisión. El espectro de excitación se determina de manera similar mediante el control de emisión de fluorescencia a la longitud de onda de máxima intensidad, mientras que el fluoróforo se excita a través de un grupo de longitudes de onda consecutivos. Se escoge la longitud de onda de emisión máxima y sólo se permite el paso de luz emitida en esa longitud de onda hacia el detector. La excitación es inducida (generalmente por medio de un monocromador) a longitudes de onda de excitación diferentes y la intensidad de la fluorescencia emitida se mide en función de la longitud de onda. Como resultado se obtiene un gráfico o curva que representa la intensidad relativa de fluorescencia producida por la excitación de todo el espectro de longitudes de onda de excitación.

En una forma preferida de realización, la proteína de fusión de acuerdo a la presente invención comprende al menos un péptido de localización que permite dirigir la proteína de fusión a diferentes localizaciones celulares. Esto es potencialmente beneficioso para la detección de  $\text{Ca}^{2+}$  en distintos lugares subcelulares de manera específica. Por tanto, en otra realización particular, la proteína de fusión de la invención comprende además un péptido de localización en posición amino-terminal y un péptido de localización en posición carboxilo-terminal.

Los péptidos de localización se pueden encontrar en posición amino o carboxilo-terminal o en el interior de la secuencia de la proteína. En una realización preferida, el péptido de localización está en posición amino-terminal. En otra realización preferida, el péptido de localización está en posición carboxilo-terminal.

Péptidos de localización adecuados para su uso en la presente invención incluyen, sin limitación, péptidos de localización capaces de dirigir una proteína a la membrana de la célula, al núcleo, a la membrana nuclear, a la matriz mitocondrial, a la membrana mitocondrial, al retículo endoplásmico o sarcoplásmico, al citoplasma, al complejo de Golgi, al cloroplasto, al apoplasto o al peroxisoma.

En una forma preferida de realización, el péptido de localización es un péptido de localización nuclear. Ejemplos ilustrativos de péptido de localización nuclear incluyen PKKKRKV (SEQ ID NO: 2), PQKKIKS (SEQ ID NO: 3), PPKKKRKV (SEQ ID NO: 4), QPKKP (SEQ ID NO: 5), RKKR (SEQ ID NO: 6), RKKRRQRRRAHQ (SEQ ID NO: 7), RQARRNRRRRWRERQR (SEQ ID NO: 8), MPLTRRRPAASQALAPPTP (SEQ ID NO: 9), GAALTILV (SEQ ID NO: 10) y GAALTLLG (SEQ ID NO: 11). En una forma de realización aún más preferida, la secuencia de localización nuclear comprende la secuencia de de nucleoplasmina de *Xenopus laevis* (SEQ ID NO: 12).

En una forma preferida de realización, la secuencia de localización es una secuencia de localización al complejo de Golgi. En una forma de realización más preferida, la secuencia de localización al complejo de Golgi comprende la secuencia de localización en el complejo de Golgi de galactosiltransferasa (SEQ ID NO: 13).

En una forma preferida de realización, la secuencia de localización es una secuencia de localización al citoplasma. En una forma de realización más preferida, la secuencia de localización al citoplasma es la secuencia de la luciferasa (SEQ ID NO: 14).

En una forma preferida de realización, el péptido de localización es un péptido que dirige la proteína a la matriz mitocondrial. Secuencias capaces de dirigir una proteína a la mitocondria incluyen, sin limitación, la secuencia RRIVVLHGYGAVKEVLLNHK (SEQ ID NO: 15), la secuencia que comprende los aminoácidos 74-95 del citocromo P450 2E1 (CYP2E1) de rata (SRRIVVLHGYKAVKEVLLNHKN; SEQ ID NO: 16) (Neve and Ingelman-Sundberg, *J. Biol. Chem.* 2001, 276:11317-22), la secuencia del precursor de la citocromo c oxidasa IV de levadura (MLSLRQDIRFFKPATRTLCSRR; SEQ ID NO: 17) (Maarse et al., *EMBO J.* 1984, 3:2831-37 y Hurt et al., *FEBS* 1984, 178:306-310); la secuencia de transporte mitocondrial de la proteína PB2 protein de los virus de la gripe (Carr et al., *Virology* 2006, 344:492-508); la secuencia de transporte mitocondrial presente en las hemo liasas (Diekert et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1999, 96:11752-57); la secuencia señal de la enzima de la matriz mitocondrial ornitina transcarbamilasa (OTC) (Horwich et al., *EMBO J.* 1985, 4:1129-35; Hay et al., *Biochim. Biophys. Acta* 1984, 779:65-87; Fujiwara et al., *Genome Inform. Ser. Workshop, Genome Inform.* 1997, 8:53-60) y el péptido de direccionamiento mitocondrial de la proteína Noxa humana (KLLNLISKLF; SEQ ID NO: 18). En una forma más preferida de realización, la secuencia de localización es una secuencia de localización a la mitocondria comprende la secuencia de localización mitocondrial de la

citocromo c oxidasa VIII humana. En otra forma preferida de realización, el péptido de localización mitocondrial comprende la secuencia MLFNLRXXLNNAAFRHGHNFMRNFRCGQLX (SEQ ID NO: 19).

En una realización preferida, la proteína de fusión comprende una primera secuencia señal de direccionamiento a la ruta secretora y una segunda señal de retención en el retículo endoplásmico.

Ejemplos no limitantes de secuencias de direccionamiento a la ruta secretora incluyen las secuencias señal que aparecen en las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I y II, secuencias señal de citoquinas o inmunoglobulinas, secuencias señal de la cadena invariante o de las proteínas Lampl, Tapasin, Erp57, Calreticulín, Calnexin. Preferiblemente, la secuencia de direccionamiento a la ruta secretora se selecciona del grupo consistente en:

- la secuencia MMSFVSLLLVGILFWATEAEQLTKCEVFQ (SEQ ID NO: 20);
- el péptido señal de PTH1R humana (H<sub>2</sub>N-MGTARIAPGLALLLCCPVLSSAYAL-, SEQ ID NO: 21);
- secuencia de localización mitocondrial de la citocromo c oxidasa VIII humana (H<sub>2</sub>N-MSVLTPLLLRGLTGSARLPVPRAK- SEQ ID NO: 22);
- el péptido señal de mGluR5 humana (H<sub>2</sub>N-MVLLLILSVLLLKEDVRGSA-, SEQ ID NO: 23);
- el péptido señal de GABA<sub>B2</sub>R humana (H<sub>2</sub>N-MASPRSSGQPGPPPPPPPPARLLLLLLLPLLLPLAPG-, SEQ ID NO: 24);
- el péptido señal de la calreticulina humana (H<sub>2</sub>N-MLLSVPLLGLLGLAVA-, SEQ ID NO: 25);
- el péptido señal de la cadena pesada de Iγ2b humana, (H<sub>2</sub>N-MGWSCIILFLVATATGKGLTVAGLRSGHIYG-, SEQ ID NO: 26); y

en donde dichas secuencias se encuentran en posición N-terminal en la proteína de fusión.

Ejemplos no limitantes de secuencias de retención en el retículo endoplásmico incluyen un péptido de retención en el retículo endoplásmico en posición carboxilo terminal y una secuencia de interacción con BiP.

En una realización más preferida, el péptido de retención en el retículo endoplásmico incluyen las secuencias KDEL (SEQ ID NO: 27), DDEL (SEQ ID NO: 28), DEEL (SEQ ID NO: 29), QEDL (SEQ ID NO: 30), RDEL (SEQ ID NO: 31), and GQNLSTSN (SEQ ID NO: 32), en donde dichas secuencias se localizan en posición C-terminal.

En una realización más preferida, el péptido de retención en el retículo endoplásmico es una secuencia de interacción con BiP. En una forma de realización aún más preferida, la secuencia de interacción con BiP comprende los dominios VDJ y CH1 de la cadena pesada de la inmunoglobulina Iγ2b.

En una forma preferida de realización, el polipéptido de la invención comprende la secuencia señal de calreticulina en el extremo N-terminal, y la secuencia de retención KDEL (SEQ ID NO: 27) en el extremo C-terminal. En otra forma de realización, el

polipéptido ha perdido la secuencia señal tras ser traslocado al retículo endoplásmico y comprende la secuencia de retención KDEL (SEQ ID NO: 27) en el extremo C-terminal.

En otra forma de preferida de realización, la invención se refiere a un polipéptido que comprende el péptido señal de Iγ2b, los dominios VDJ y CH1 de la cadena pesada de la inmunoglobulina Iγ2b en el extremo N-terminal. En otra forma de realización, el polipéptido ha perdido la secuencia señal tras ser traslocado al retículo endoplásmico y comprende los dominios VDJ y CH1 de la cadena pesada de la inmunoglobulina Iγ2b en el extremo N-terminal.

En una forma preferida de realización, la proteína de fusión comprende, desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal, la secuencia señal de calreticulina, el polipéptido de la invención, el enlazador de secuencia SEQ ID NO: 42, GFPuv (SEQ ID NO: 33) y la secuencia de retención KDEL (SEQ ID NO: 27). En otra forma de realización, la proteína de fusión ha perdido la secuencia señal tras ser traslocada al retículo endoplásmico y comprende, desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal, el polipéptido de la invención, el enlazador de secuencia SEQ ID NO: 42, GFPuv (SEQ ID NO: 33) y la secuencia de retención KDEL (SEQ ID NO: 27).

En una forma preferida de realización, la proteína de fusión comprende, desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal, la secuencia señal de calreticulina, el polipéptido de la invención, el enlazador de secuencia SEQ ID NO: 42, una variante de GFPuv (SEQ ID NO: 33) en donde el aminoácido en posición 15 es Gln, el aminoácido en posición 167 es Val, el aminoácido en posición 175 es Gly, y el aminoácido en posición 180 es Tyr, y la secuencia de retención KDEL (SEQ ID NO: 27). En otra forma de realización, la proteína de fusión ha perdido la secuencia señal tras ser traslocada al retículo endoplásmico y comprende, desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal, el polipéptido de la invención, el enlazador de secuencia SEQ ID NO: 42, una variante de GFPuv (SEQ ID NO: 33) en donde el aminoácido en posición 15 es Gln, el aminoácido en posición 167 es Val, el aminoácido en posición 175 es Gly, y el aminoácido en posición 180 es Tyr, y la secuencia de retención KDEL (SEQ ID NO: 27).

En una forma preferida de realización, la proteína de fusión comprende, desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal, la secuencia señal de calreticulina, el polipéptido de la invención, el enlazador de secuencia SEQ ID NO: 42, una variante de GFPuv (SEQ ID NO: 33) en donde el aminoácido en posición 15 es Gln, el aminoácido en posición 167 es Val, el aminoácido en posición 175 es Gly, el aminoácido en posición 180 es Tyr, y el aminoácido en posición 153 es Lys, y la secuencia de retención KDEL (SEQ ID NO: 27). En otra forma de realización, la proteína de fusión ha perdido la secuencia señal tras ser traslocada al retículo endoplásmico y comprende, desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal, el polipéptido de la invención, el enlazador de secuencia SEQ ID NO: 42, una variante de GFPuv (SEQ ID NO: 33) en donde el aminoácido en posición 15 es Gln, el aminoácido en posición 167 es Val, el aminoácido en posición 175 es Gly, y aminoácido en posición 180 es Tyr, y el aminoácido en posición 153 es Lys, y la secuencia de retención KDEL (SEQ ID NO: 27).

En otra forma de preferida de realización, la invención se refiere a una proteína de fusión comprende, desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal, el péptido señal de I $\gamma$ 2b, los dominios VDJ y CH1 de la cadena pesada de la inmunoglobulina I $\gamma$ 2b, el polipéptido de la invención, el enlazador de secuencia SEQ ID NO: 42, GFPuv (SEQ ID NO: 33). En otra forma de realización, la proteína de fusión ha perdido la secuencia señal tras ser traslocada al retículo endoplásmico y comprende, desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal, los dominios VDJ y CH1 de la cadena pesada de la inmunoglobulina I $\gamma$ 2b, el polipéptido de la invención, el enlazador de secuencia SEQ ID NO: 42, GFPuv (SEQ ID NO: 33).

En otra forma de preferida de realización, la invención se refiere a una proteína de fusión comprende, desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal, el péptido señal de I $\gamma$ 2b, los dominios VDJ y CH1 de la cadena pesada de la inmunoglobulina I $\gamma$ 2b, el polipéptido de la invención, el enlazador de secuencia SEQ ID NO: 42, y una variante de GFPuv (SEQ ID NO: 33) en donde el aminoácido en posición 15 es Gln, el aminoácido en posición 167 es Val, el aminoácido en posición 175 es Gly, y el aminoácido en posición 180 es Tyr. En otra forma de realización, la proteína de fusión ha perdido la secuencia señal tras ser traslocada al retículo endoplásmico y comprende, desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal, los dominios VDJ y CH1 de la cadena pesada de la inmunoglobulina I $\gamma$ 2b, el polipéptido de la invención, el enlazador de secuencia SEQ ID NO: 42, y una variante de GFPuv (SEQ ID NO: 33) en donde el aminoácido en posición 15 es Gln, el aminoácido en posición 167 es Val, el aminoácido en posición 175 es Gly, y el aminoácido en posición 180 es Tyr.

En otra forma de preferida de realización, la invención se refiere a una proteína de fusión comprende, desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal, el péptido señal de I $\gamma$ 2b, los dominios VDJ y CH1 de la cadena pesada de la inmunoglobulina I $\gamma$ 2b, el polipéptido de la invención, el enlazador de secuencia SEQ ID NO: 42, y una variante de GFPuv (SEQ ID NO: 33) en donde el aminoácido en posición 15 es Gln, el aminoácido en posición 167 es Val, el aminoácido en posición 175 es Gly, el aminoácido en posición 180 es Tyr, y el aminoácido en posición 153 es Lys. En otra forma de realización, la proteína de fusión ha perdido la secuencia señal tras ser traslocada al retículo endoplásmico y comprende, desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal, los dominios VDJ y CH1 de la cadena pesada de la inmunoglobulina I $\gamma$ 2b, el polipéptido de la invención, el enlazador de secuencia SEQ ID NO: 42, y una variante de GFPuv (SEQ ID NO: 33) en donde el aminoácido en posición 15 es Gln, el aminoácido en posición 167 es Val, el aminoácido en posición 175 es Gly, el aminoácido en posición 180 es Tyr, y el aminoácido en posición 153 es Lys.

En una forma preferida de realización, la proteína de fusión comprende, desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal, la secuencia señal de calreticulina, GFPuv (SEQ ID NO: 33), el enlazador de secuencia SEQ ID NO: 42, el polipéptido de la invención, y la secuencia de retención KDEL (SEQ ID NO: 27). En otra forma de realización, la proteína de fusión ha perdido la secuencia señal tras ser traslocada al retículo endoplásmico y comprende, desde el extremo N-terminal al extremo C-

terminal, el polipéptido de la invención, el enlazador de secuencia SEQ ID NO: 42, GFPuv (SEQ ID NO: 33) y la secuencia de retención KDEL (SEQ ID NO: 27).

En una forma preferida de realización, la proteína de fusión comprende, desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal, la secuencia señal de calreticulina, una variante de GFPuv (SEQ ID NO: 33) en donde el aminoácido en posición 15 es Gln, el aminoácido en posición 167 es Val, el aminoácido en posición 175 es Gly, y el aminoácido en posición 180 es Tyr, el enlazador de secuencia SEQ ID NO: 42, el polipéptido de la invención, y la secuencia de retención KDEL (SEQ ID NO: 27). En otra forma de realización, la proteína de fusión ha perdido la secuencia señal tras ser traslocada al retículo endoplásmico y comprende, desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal, el polipéptido de la invención, el enlazador de secuencia SEQ ID NO: 42, una variante de GFPuv (SEQ ID NO: 33) en donde el aminoácido en posición 15 es Gln, el aminoácido en posición 167 es Val, el aminoácido en posición 175 es Gly, y el aminoácido en posición 180 es Tyr, y la secuencia de retención KDEL (SEQ ID NO: 27).

En una forma preferida de realización, la proteína de fusión comprende, desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal, la secuencia señal de calreticulina, una variante de GFPuv (SEQ ID NO: 33) en donde el aminoácido en posición 15 es Gln, el aminoácido en posición 167 es Val, el aminoácido en posición 175 es Gly, el aminoácido en posición 180 es Tyr, y el aminoácido en posición 153 es Lys, y la secuencia de retención KDEL (SEQ ID NO: 27). En otra forma de realización, la proteína de fusión ha perdido la secuencia señal tras ser traslocada al retículo endoplásmico y comprende, desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal, una variante de GFPuv (SEQ ID NO: 33) en donde el aminoácido en posición 15 es Gln, el aminoácido en posición 167 es Val, el aminoácido en posición 175 es Gly, y aminoácido en posición 180 es Tyr, y el aminoácido en posición 153 es Lys, el enlazador de secuencia SEQ ID NO: 42, el polipéptido de la invención, y la secuencia de retención KDEL (SEQ ID NO: 27).

En otra forma de preferida de realización, la invención se refiere a una proteína de fusión comprende, desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal, el péptido señal de Igy2b, los dominios VDJ y CH1 de la cadena pesada de la inmunoglobulina Igy2b, GFPuv (SEQ ID NO: 33), el enlazador de secuencia SEQ ID NO: 42, y el polipéptido de la invención. En otra forma de realización, la proteína de fusión ha perdido la secuencia señal tras ser traslocada al retículo endoplásmico y comprende, desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal, los dominios VDJ y CH1 de la cadena pesada de la inmunoglobulina Igy2b, GFPuv (SEQ ID NO: 33), el enlazador de secuencia SEQ ID NO: 42, y el polipéptido de la invención.

En otra forma de preferida de realización, la invención se refiere a una proteína de fusión comprende, desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal, el péptido señal de Igy2b, los dominios VDJ y CH1 de la cadena pesada de la inmunoglobulina Igy2b, una variante de GFPuv (SEQ ID NO: 33) en donde el aminoácido en posición 15 es Gln, el aminoácido en posición 167 es Val, el aminoácido en posición 175 es Gly, y el aminoácido en posición 180 es Tyr, el enlazador de secuencia SEQ ID NO: 42, y el polipéptido de la invención. En otra forma de realización, la proteína de fusión ha

perdido la secuencia señal tras ser traslocada al retículo endoplásmico y comprende, desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal, los dominios VDJ y CH1 de la cadena pesada de la inmunoglobulina Igy2b, una variante de GFPuv (SEQ ID NO: 33) en donde el aminoácido en posición 15 es Gln, el aminoácido en posición 167 es Val, el aminoácido en posición 175 es Gly, y el aminoácido en posición 180 es Tyr, el enlazador de secuencia SEQ ID NO: 42, y el polipéptido de la invención.

En otra forma de preferida de realización, la invención se refiere a una proteína de fusión comprende, desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal, el péptido señal de Igy2b, los dominios VDJ y CH1 de la cadena pesada de la inmunoglobulina Igy2b, una variante de GFPuv (SEQ ID NO: 33) en donde el aminoácido en posición 15 es Gln, el aminoácido en posición 167 es Val, el aminoácido en posición 175 es Gly, el aminoácido en posición 180 es Tyr, y el aminoácido en posición 153 es Lys, el enlazador de secuencia SEQ ID NO: 42, y el polipéptido de la invención. En otra forma de realización, la proteína de fusión ha perdido la secuencia señal tras ser traslocada al retículo endoplásmico y comprende, desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal, los dominios VDJ y CH1 de la cadena pesada de la inmunoglobulina Igy2b, una variante de GFPuv (SEQ ID NO: 33) en donde el aminoácido en posición 15 es Gln, el aminoácido en posición 167 es Val, el aminoácido en posición 175 es Gly, el aminoácido en posición 180 es Tyr, y el aminoácido en posición 153 es Lys, el enlazador de secuencia SEQ ID NO: 42, y el polipéptido de la invención.

Los polipéptidos de acuerdo a la presente invención pueden contener una o más etiquetas que permitan su detección o purificación. Etiquetas de detección/purificación adecuadas incluyen hexahistidinas (resto de quelato metálico), etiquetas que muestran afinidad por glutatión (glutatión S-transferasa), péptido de unión a calmodulina (CBP), etiqueta de estreptomycin, dominio de unión a celulosa, proteína de unión a maltosa, etiqueta de S-péptido, etiqueta de unión a quitina, epítopos inmunorreactivos, etiquetas de epítipo, E2tag, etiqueta de epítipo HA, epítipo Myc, epítipo FLAG, epítopos AU1 y AU5, epítipo Glu-Glu, epítipo KT3, epítipo IRS, epítipo Btag, epítipo de proteína quinasa-C, epítipo de VSV o cualquier otra etiqueta siempre que la etiqueta no afecte a la estabilidad de la proteína. En una forma preferida de realización la etiqueta es una etiqueta de hexahistidina.

#### Ácidos nucleicos, casetes de expresión, vectores y células de la invención

En un tercer aspecto, la presente invención se relaciona con un ácido nucleico que codifica para el polipéptido del primer aspecto de la invención o para la proteína de fusión del segundo aspecto de la invención y de cualquiera de sus realizaciones.

El término “ácido nucleico”, según se usa en la presente invención, se refiere a polímeros formados por la repetición de monómeros llamados nucleótidos, unidos mediante enlaces fosfodiéster.

Dicho ácido nucleico de la invención puede incorporar, operativamente unida, una secuencia reguladora de la expresión de las secuencias de nucleótidos que codifican para la proteína de fusión de la invención, constituyendo de este modo una construcción

génica. Según se utiliza en la presente invención, la expresión “operativamente unida” significa que el polipéptido de la proteína de fusión codificado por la secuencia de ácido nucleico de la invención, es expresado en el marco de lectura correcto bajo el control de las secuencias de control o reguladoras de expresión. Por tanto, en otro aspecto, la invención proporciona un casete de expresión que comprende la construcción génica de la invención operativamente unida a una secuencia de control de expresión. La construcción génica de la invención puede obtenerse mediante el empleo de técnicas ampliamente conocidas en el estado de la técnica [Sambrook *et al.*, “Molecular cloning, a Laboratory Manual”, 2<sup>nd</sup> ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y., 1989 Vol 1-3].

Las secuencias de control son secuencias que controlan y regulan la transcripción y, en su caso, la traducción de dicha proteína de fusión, e incluyen secuencias promotoras, secuencias codificantes para reguladores transcripcionales, secuencias de unión a ribosomas (RBS) y/o secuencias terminadoras de transcripción. El casete de expresión de la presente invención puede incluir además un potenciador, que puede estar adyacente o distante a la secuencia del promotor y puede funcionar aumentando la transcripción a partir del mismo. En una realización particular, dicha secuencia de control de expresión es funcional en células y organismos procariontes, por ejemplo, bacterias, etc., mientras que en otra realización particular, dicha secuencia de control de expresión es funcional en células y organismos eucariotes, por ejemplo, células de insecto, células vegetales, células de mamífero, etc.

Se puede usar cualquier promotor disponible en la presente metodología. En una forma de realización preferida de la presente invención, el promotor utilizado por la construcción de ácido nucleico de la presente invención es activo en la población celular específica transformada. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de promotores ubicuos que pueden estar presentes en el casete de expresión proporcionado por esta invención incluyen el promotor de citomegalovirus humano (hCMV), el promotor de SV40, el promotor para EF1-alfa, y el promotor de ubiquitina C. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de promotores específicos de tipo celular y/o específicos de tejido incluyen promotores tales como albúmina que es específico de hígado [Pinkert *et al.*, (1987) *Genes Dev.* 1:268-277], promotores linfoides específicos [Calame *et al.*; (1988) *Adv. Immunol.* 43:235-275]; en particular promotores de los receptores de células T [Winoto *et al.*, (1989) *EMBO J.* 8:729-733] e inmunoglobulinas; [Banerji *et al.* (1983) *Cell* 33:729-740], promotores específicos de neuronas tal como el promotor de neurofilamentos [Byrne *et al.* (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:5473-5477], promotores específicos de páncreas [Edlunch *et al.* (1985) *Science* 230:912-916] o promotores específicos de glándula mamaria tal como el promotor de suero de leche (patente de EE UU No. 4.873.316 y publicación de solicitud europea No. 264.166). El casete de expresión CAG-GS está compuesto de un elemento del enhancer CMV, el promotor de la  $\beta$ -actina de pollo y el elemento regulador postranscripcional (WPRE) del virus de la hepatitis de marmota (Woodchuck Hepatitis Virus, WHP) [Niwa *et al.* (1991) *Gene* 108: 193-9]. La combinación del promotor y este elemento favorece unos niveles de expresión del transgen *in vivo* altos.

Ventajosamente, dicho casete de expresión comprende, además, un marcador o gen que codifica para un motivo o para un fenotipo que permita la selección de la célula

hospedadora transformada con dicho casete de expresión. Ejemplos ilustrativos de dichos marcadores que podrían estar presentes en el casete de expresión de la invención incluyen genes de resistencia a antibióticos, genes de resistencia a compuestos tóxicos, y, en general, todos aquellos que permitan seleccionar a las plantas transformadas genéticamente.

La construcción génica de la invención, o el casete de expresión proporcionado por esta invención, pueden ser insertados en un vector apropiado. Así, en otro aspecto, la invención se relaciona con un vector, tal como un vector de expresión, que comprende dicha construcción de génica de la invención o dicho casete de expresión. La elección del vector dependerá de la célula hospedadora en la que se va a introducir posteriormente. A modo ilustrativo, el vector donde se introduce dicha secuencia de ácido nucleico puede ser un plásmido o un vector que, cuando se introduce en una célula hospedadora, se integra o no en el genoma de dicha célula. La obtención de dicho vector puede realizarse por métodos convencionales conocidos por los técnicos en la materia [Sambrook *et al.*, 1989, citado *supra*]. En una realización particular, dicho vector recombinante es un vector útil para transformar células animales.

Dicho vector puede ser utilizado para transformar, transfectar o infectar células susceptibles de ser transformadas, transfectadas o infectadas por dicho vector. Dichas células pueden ser procariontas o eucariotas. Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con una célula hospedadora transformada, transfectada o infectada con un vector proporcionado por esta invención. Dicha célula transformada, transfectada o infectada comprende, por tanto, una construcción génica de la invención, o bien dicho casete de expresión o vector proporcionado por esta invención.

Células transformadas, transfectadas o infectadas pueden ser obtenidas por métodos convencionales conocidos por los técnicos en la materia (Sambrook *et al.*, 1989, citado *supra*). Células adecuadas para llevar a cabo la invención, incluyen, sin limitación, células de mamíferos, plantas, insectos, de hongos y de bacterias. Células bacterianas incluyen, sin estar limitado, células de bacterias Gram positivas tales como especies del género *Bacillus*, *Streptomyces* y *Staphylococcus* y células de bacterias Gram negativas tales como células del género *Escherichia* y *Pseudomonas*. Células de hongos incluyen, preferiblemente, células de levaduras tales como *Saccharomyces*, *Pichia pastoris* y *Hansenula polymorpha*. Células de insectos incluyen, sin limitación, células de *Drosophila* y células Sf9. Células de plantas incluyen, entre otros, células de plantas de cultivos tales como cereales, plantas medicinales, ornamentales o de bulbos. Células de mamíferos adecuadas para en la presente invención incluyen líneas celulares epiteliales (porcinas, etc.), líneas celulares de osteosarcoma (humanas, etc.), líneas celulares de neuroblastoma (humanas, etc.), carcinomas epiteliales (humanos, etc.), células gliales (murinas, etc.), líneas celulares hepáticas (de mono, etc.). células CHO (Chinese Hamster Ovary), células COS, células BHK, células HeLa, 911, AT1080, A549, 293 o PER.C6, células ECCs humana NTERA-2, células D3 de la línea de mESCs, células troncales embrionarias humanas tales como HS293 y BGV01, SHEF1, SHEF2 y HS181, células NIH3T3, 293T, REH y MCF-7 y células hMSCs.

En una realización particular, dicha célula hospedadora es una célula animal transformada, transfectada o infectada con un vector apropiado, siendo dicha célula

animal transformada, transfectada o infectada capaz de expresar la proteína de fusión proporcionada por esta invención, por lo que dichos vectores pueden utilizarse para la expresión en células animales de la proteína de fusión proporcionada por esta invención.

El ácido nucleico, o casete de expresión, o vector o célula hospedadora de la invención pueden ser utilizados para producir:

- (a) un polipéptido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 1 (apoacuorina), según el primer aspecto de la invención, o
- (b) una proteína de fusión que comprende (i) un primer polipéptido según el primer aspecto de la invención, y (ii) un segundo polipéptido fluorescente, en donde dichos primer y segundo dominios se encuentran unidos a través de un péptido enlazador flexible, según el segundo aspecto de la invención.

Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con un método para producir dicha proteína de fusión proporcionada por esta invención que comprende crecer una célula u organismo proporcionado por esta invención bajo condiciones que permiten la producción de dicha proteína de fusión. Las condiciones para optimizar el cultivo de dicha célula u organismo dependerán de la célula u organismo utilizado. Si se desea, el método para producir un producto de interés proporcionado por esta invención incluye, además, el aislamiento y purificación de dicha proteína de fusión.

Uso del polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 y 15 a 20 o la proteína de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 20 para la detección de  $\text{Ca}^{2+}$  en una muestra.

#### Métodos para la determinación de la concentración de $\text{Ca}^{2+}$ en una muestra

En otro aspecto, la presente invención se relaciona con un método, en adelante “primer método de la invención”, para la determinación de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en una muestra que comprende

- (i) poner en contacto dicha muestra con un polipéptido según el primer aspecto de la invención,
- (ii) poner en contacto dicho polipéptido con un co-factor específico para el mismo,
- (iii) detectar la luminiscencia emitida por dicho polipéptido, y
- (iv) determinar la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  a partir de la variación en la intensidad de la luminiscencia con respecto a la intensidad de la luminiscencia en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$ .

El término “muestra”, según se usa en la presente invención, se refiere a una pequeña parte de un sujeto, representante de la totalidad de un órgano o tejido, y puede estar constituida por una biopsia o cultivo celular de las células que componen la misma. Por tanto, en otra realización particular, la célula o población celular comprende una biopsia o un cultivo celular de las células que componen la misma. Las biopsias son pequeñas piezas de tejido y pueden ser frescas, congeladas o fijadas, como, por ejemplo, en formalina y embebidas en parafina (FFPE). Las biopsias, por ejemplo, se pueden extirpar quirúrgicamente la extracción por hipodérmicas o de otros tipos de agujas, por

microdissección o por captura con láser. La muestra debe comprender la proteína de fusión para detectar  $\text{Ca}^{2+}$  según el método de la invención.

En una primera etapa, el primer método de la invención comprende poner en contacto dicha muestra con un polipéptido según el primer aspecto de la invención.

El término “polipéptido” se ha descrito en detalle en el contexto de los polipéptidos de la invención y se usan de la misma manera en los métodos de la invención.

En una realización particular, el polipéptido comprende la secuencia de la apoacurina (SEQ ID NO: 1), en donde en una primera posición 119 de SEQ ID NO: 1 el aminoácido es Ala, y en una segunda posición 24 de SEQ ID NO: 1 el aminoácido es Asn.

En otra realización particular, el polipéptido comprende la secuencia de la apoacurina (SEQ ID NO: 1), en donde en una primera posición 119 de SEQ ID NO: 1 el aminoácido es Ala, y en una segunda posición 157 de SEQ ID NO: 1 el aminoácido es Asn.

En una segunda etapa, el primer método de la invención comprende poner en contacto dicho polipéptido con un co-factor específico para el mismo.

El término “co-factor específico” o “factor postético”, según se usa en la presente invención, se refiere a la celenterazina o variantes funcionalmente equivalentes de la misma. La celenterazina es la luciferina, la molécula emisora de luz, que se encuentra en muchos organismos acuáticos a través de siete filos. Es el sustrato de muchas luciferasas y fotoproteínas, incluyendo la luciferasa de *Renilla reniformis* (Rluc), *Gaussia luciferasa* (Gluc), acurina y obelina. Por variantes funcionalmente equivalentes de la celenterazina incluyen, sin limitación, celenterazina i, celenterazina h y celenterazina n.

En una tercera etapa, el primer método de la invención comprende detectar la luminiscencia emitida por dicho polipéptido.

El término “luminiscencia”, según se usa en la presente invención, se refiere a bioluminiscencia y es la producción y emisión de luz por un organismo vivo. La bioluminiscencia es una forma natural de quimioluminiscencia donde la energía se libera en forma de fotones a partir de una reacción química.

El experto apreciará que la longitud de onda a la que se debe efectuar la detección dependerá de las propiedades del polipéptido. En el caso de la apoacurina (SEQ ID NO: 1), dicha longitud de onda de emisión es  $\lambda = 469$  nm. El experto en la materia podrá fácilmente determinar la longitud de onda correspondiente al máximo de emisión del polipéptido.

Aunque es preferible que la detección en la etapa (iii) se lleve a cabo a una longitud de onda correspondiente al máximo de emisión del polipéptido, la invención contempla la posibilidad de que la etapa (iii) se lleve a cabo usando longitudes de onda distintas a las

máximas de emisión del polipéptido siempre que se consiga suficiente detección de la emisión luminiscente. Así, la etapa (iii) se lleva a cabo usando una longitud de onda que se encuentra en un intervalo de  $\pm 50$  nm,  $\pm 40$  nm,  $\pm 30$  nm,  $\pm 25$  nm,  $\pm 20$  nm,  $\pm 15$  nm,  $\pm 10$  nm,  $\pm 8$  nm,  $\pm 6$  nm,  $\pm 4$  nm,  $\pm 2$  nm,  $\pm 1$  nm,  $\pm 0,5$  nm,  $\pm 0,1$  nm ó  $\pm 0,01$  nm con respecto al valor máximo de longitud de onda de emisión.

En el caso particular de que el polipéptido tenga un máximo de emisión sustancialmente idéntico al de la apoacuerina (SEQ ID NO: 1),  $\lambda = 469$  nm, la etapa (iii) se lleva a cabo mediante detección a una longitud de onda de emisión que se encuentra en el rango entre 439 nm y 499 nm, y preferiblemente, la longitud de onda de emisión es aproximadamente de 469 nm.

La medida de la luminiscencia se puede efectuar por métodos bien conocidos en la técnica. Ejemplos no limitativos de instrumentos adecuados para la detección de luminiscencia incluyen luminómetros y lectores de microplacas, cámaras de CCD.

Una vez que se ha detectado la luminiscencia emitida por el polipéptido en la muestra, se puede determinar la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en la muestra mediante la detección de una variación en la intensidad de la luminiscencia con respecto a la intensidad de la fluorescencia en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$ . Como entenderá el experto en la materia, la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en la muestra puede medirse cuantitativamente utilizando este método. Para ello, se realiza una calibración de la señal de emisión obtenida en la etapa (ii) a diferentes concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$ .

Los autores de la presente invención también han puesto de manifiesto que la fusión de un primer polipéptido según el primer aspecto de la invención a un segundo polipéptido fluorescente da lugar a una proteína de fusión en la que propiedades fluorescentes de dicho segundo polipéptido fluorescente se modifican en respuesta a la unión de calcio a dicho primer polipéptido. Esta modificación de las propiedades fluorescentes del segundo polipéptido fluorescente en respuesta a la unión de  $\text{Ca}^{2+}$  se manifiesta cuando la proteína fluorescente es excitada con una longitud de onda correspondiente a la longitud de onda de excitación de dicha proteína. Esto permite la detección de  $\text{Ca}^{2+}$  en una muestra o en el interior de una célula mediante el uso de proteínas de fusión formadas por un primer polipéptido según el primer aspecto de la invención y un segundo polipéptido fluorescente que son excitadas a la longitud de onda de excitación del polipéptido fluorescente sin necesidad de introducir en la misma molécula una segunda molécula fluorescente o luminiscente que permita la aparición de fenómenos de CRET o FRET.

Por lo tanto, en otro aspecto, la presente invención se relaciona con un método, en adelante “segundo método de la invención”, para la determinación de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en una muestra que comprende

- (i) poner en contacto dicha muestra con una proteína de fusión que comprende un primer polipéptido y un segundo polipéptido fluorescente según el segundo aspecto de la invención,
- (ii) detectar la luminiscencia emitida por dicho primer polipéptido en respuesta a la puesta en contacto dicha proteína de fusión con un co-factor específico para dicho primer polipéptido,

- o, alternativamente  
detectar la fluorescencia emitida por dicho segundo polipéptido en respuesta a la excitación de la muestra a una longitud de onda correspondiente a la longitud de onda de excitación de dicho segundo polipéptido, y
- (iii) determinar la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  a partir de la variación en la intensidad de la luminiscencia o fluorescencia con respecto a la intensidad de la luminiscencia o fluorescencia en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$ .

En una primera etapa, el segundo método de la invención comprende poner en contacto dicha muestra con una proteína de fusión que comprende un primer polipéptido y un segundo polipéptido fluorescente según el segundo aspecto de la invención

Los términos “proteína de fusión” y “polipéptido fluorescente”, según se usa en la presente invención, se han descrito en detalle en el contexto de las proteínas de fusión de la invención y se usan de la misma manera en los métodos de la invención.

En una forma particular de realización, el polipéptido fluorescente es cualquier polipéptido fluorescente con excepción de EGFP. En una forma preferida de realización, el polipéptido fluorescente es GFPuv o una variante funcionalmente equivalente del mismo.

En una segunda etapa, el segundo método de la invención comprende detectar la luminiscencia emitida por dicho primer polipéptido en respuesta a la puesta en contacto dicha proteína de fusión con un co-factor específico para dicho primer polipéptido, o, alternativamente detectar la fluorescencia emitida por dicho segundo polipéptido en respuesta a la excitación de la muestra a una longitud de onda correspondiente a la longitud de onda de excitación de dicho segundo polipéptido.

La detección de la luminiscencia emitida por dicho primer polipéptido en respuesta a la puesta en contacto dicha proteína de fusión con un co-factor específico para dicho primer polipéptido ha sido descrita en detalle en el contexto del primer método de la invención y se usa de la misma manera en el segundo método de la invención.

Alternativamente, se puede detectar la fluorescencia emitida por dicho segundo polipéptido en respuesta a la excitación de la muestra a una longitud de onda correspondiente a la longitud de onda de excitación de dicho segundo polipéptido.

El experto apreciará que tanto la longitud de onda de excitación que se tiene que usar en la etapa (ii) para excitar la proteína de fusión como la longitud de onda a la que se debe efectuar la detección dependerá de las propiedades del polipéptido fluorescente que forme parte de la proteína de fusión. Dado que la proteína de fusión se excita a la longitud de onda adecuada para la excitación del polipéptido fluorescente y que no es necesario que tenga lugar fenómenos de CRET o FRET para detectar el efecto de la unión de  $\text{Ca}^{2+}$  sobre las propiedades fluorescentes del polipéptido fluorescente, la longitud de onda de excitación que se usa en la etapa (ii) corresponde a una longitud de onda próxima al máximo de excitación del polipéptido fluorescente. Ejemplos de proteínas fluorescentes que pueden que se pueden usar en el segundo método de la

invención y de las longitudes de onda de excitación y emisión adecuadas para cada una de ellas se encuentran recogidas en la Tabla 1.

Proteína	Longitud de onda de excitación (nm)	Longitud de onda de emisión (nm)
GFP	488	507
GFPuv	403/470	509
BFP	383	445
CFP	439	476
YFP	514	527
EBFP2	383	448
mCerulean	334	475
mCerulean3	433	475
mVenus	515	528
mTurquoise	435	477
T-Sapphire	399	511
citrine	516	529
amFP486	458	486
zFP506	492	506
zFP538	528	538
drFP	558	583
DsRed	558	583
mCherry	587	610
dTomato	554	581
mTFP1	462	492
TagRFP-T	555	584
mKO2	551	565
mRuby	558	605
mKate	588	635
mAmetrine	406	526
REACH	515	528

Tabla 1: Proteínas fluorescentes y valores longitud de onda máximos de excitación y emisión.

Aunque es preferible usar una longitud de onda correspondiente al máximo de excitación de la proteína fluorescente, la invención contempla la posibilidad de que la etapa (ii) se lleva a cabo usando longitudes de onda distintas a las máximas de excitación de la proteína fluorescente siempre que se consiga suficiente excitación de la proteína fluorescente. Así, la etapa (ii) se lleva a cabo usando una longitud de onda que se encuentra en un intervalo de  $\pm 50$  nm,  $\pm 40$  nm,  $\pm 30$  nm,  $\pm 25$  nm,  $\pm 20$  nm,  $\pm 15$  nm,  $\pm 10$  nm,  $\pm 8$  nm,  $\pm 6$  nm,  $\pm 4$  nm,  $\pm 2$  nm,  $\pm 1$  nm,  $\pm 0,5$  nm,  $\pm 0,1$  nm ó  $\pm 0,01$  nm con respecto al valor máximo de longitud de onda de excitación.

Aunque es preferible que la detección en la etapa (ii) se lleve a cabo a una longitud de onda correspondiente al máximo de emisión de la proteína fluorescente, la invención contempla la posibilidad de que la etapa (ii) se lleve a cabo usando longitudes de onda distintas a las máximas de emisión de la proteína fluorescente siempre que se consiga

suficiente detección de la emisión fluorescente. Así, la etapa (ii) se lleva a cabo usando una longitud de onda que se encuentra en un intervalo de  $\pm 50$  nm,  $\pm 40$  nm,  $\pm 30$  nm,  $\pm 25$  nm,  $\pm 20$  nm,  $\pm 15$  nm,  $\pm 10$  nm,  $\pm 8$  nm,  $\pm 6$  nm,  $\pm 4$  nm,  $\pm 2$  nm,  $\pm 1$  nm,  $\pm 0,5$  nm,  $\pm 0,1$  nm ó  $\pm 0,01$  nm con respecto al valor máximo de longitud de onda de emisión.

En el caso particular de que la proteína fluorescente que forme parte de la proteína de fusión tenga varios máximos de excitación, la etapa (ii) puede llevarse a cabo usando cualquiera de las longitudes de onda de excitación. En el caso particular de que la proteína fluorescente comprende la secuencia de GFPuv (SEQ ID NO: 33), la longitud o longitudes de onda de excitación se encuentran en el rango entre 373 nm y 433 nm y/o el rango entre 440 nm y 500 nm, y preferiblemente la longitud de onda o longitudes de excitación son aproximadamente de 403 nm y/o 470 nm. Asimismo, la etapa (ii) se lleva a cabo mediante detección a una longitud de onda de emisión que se encuentra en el rango entre 480 nm y 540 nm, y preferiblemente, la longitud de onda de emisión es aproximadamente de 510 nm.

La medida de la fluorescencia se puede efectuar por métodos bien conocidos en la técnica. Ejemplos no limitativos de instrumentos adecuados para la detección de fluorescencia incluyen espectrofluorómetros y lectores de microplacas, microscopios de fluorescencia, escáneres de fluorescencia, incluyendo lectores de microarrays y citómetros de flujo.

Una vez que se ha detectado la fluorescencia emitida por la proteína de fusión en la célula, se puede determinar la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en la muestra mediante la detección de una variación en la intensidad de la fluorescencia con respecto a la intensidad de la fluorescencia en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$ .

En una forma preferida de realización, cuando la proteína fluorescente que forme parte de la proteína de fusión tenga varios máximos de excitación, el método de la invención contempla la posibilidad de excitar la muestra a una longitud de onda correspondiente a otro máximo de excitación. La excitación a varias longitudes de onda permite la detección de un número correspondiente de picos de emisión, lo que permite determinar la cantidad de  $\text{Ca}^{2+}$  en una muestra en base al cociente de intensidades emitidas en respuesta a cada una de las longitudes de onda de excitación.

Así, en el caso particular de que la proteína fluorescente que forme parte de la proteína de fusión sea GFPuv, la etapa (ii) se lleva a cabo mediante excitación de la célula o población celular a una primera longitud de onda de excitación que se encuentra en el rango entre 373 nm y 433 nm y a una segunda longitud de onda de excitación que se encuentra en el rango entre 440 nm y 500 nm. Alternativamente, la primera longitud de onda de excitación se encuentra en el rango entre 440 nm y 500 nm y la segunda longitud de onda de excitación se encuentra en el rango entre 373 nm y 433 nm. Preferiblemente, la primera longitud de onda de excitación es aproximadamente de 403 nm y la segunda longitud de onda de excitación es aproximadamente de 470 nm, o bien la primera longitud de onda de excitación es aproximadamente de 470 nm y la segunda longitud de onda de excitación es aproximadamente de 403 nm.

Como entenderá el experto en la materia, la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en la muestra puede medirse cuantitativamente utilizando este método. Para ello, se realiza una calibración de la señal de emisión obtenida en la etapa (ii) a diferentes concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$ .

#### Métodos para la detección intracelular de $\text{Ca}^{2+}$ en una célula o población celular

En otro aspecto la presente invención se relaciona con un método, en adelante “tercer método de la invención”, para la detección intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  en una célula o población celular que comprende un polipéptido según el primer aspecto de la invención, en donde dicho método comprende

- (i) poner en contacto dicho polipéptido con un co-factor específico del mismo, y
- (ii) detectar la luminiscencia emitida por dicho polipéptido,

en donde una variación en la intensidad de la luminiscencia emitida por la célula o población celular con respecto a un valor de referencia es indicativo de la presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  en la célula o población celular.

Células adecuadas para llevar a cabo el primer método de la invención, incluyen, sin limitación, células de mamíferos, plantas, insectos, de hongos y de bacterias. Células bacterianas incluyen, sin estar limitado, células de bacterias Gram positivas tales como especies del género *Bacillus*, *Streptomyces* y *Staphylococcus* y células de bacterias Gram negativas tales como células del género *Escherichia* y *Pseudomonas*. Células de hongos incluyen, preferiblemente, células de levaduras tales como *Saccharomyces*, *Pichia pastoris* y *Hansenula polymorpha*. Células de insectos incluyen, sin limitación, células de *Drosophila* y células Sf9. Células de plantas incluyen, entre otros, células de plantas de cultivos tales como cereales, plantas medicinales, ornamentales o de bulbos. Células de mamíferos adecuadas para en la presente invención incluyen líneas celulares epiteliales (porcinas, etc.), líneas celulares de osteosarcoma (humanas, etc.), líneas celulares de neuroblastoma (humanas, etc.), carcinomas epiteliales (humanos, etc.), células gliales (murinas, etc.), líneas celulares hepáticas (de mono, etc.), células CHO (Chinese Hamster Ovary), células COS, células BHK, células HeLa, 911, AT1080, A549, 293 o PER.C6, células ECCs humana NTERA-2, células D3 de la línea de mESCs, células troncales embrionarias humanas tales como HS293 y BGV01, SHEF1, SHEF2 y HS181, células NIH3T3, 293T, REH y MCF-7 y células hMSCs.

Estas células se han modificado de forma que expresen la proteína de fusión. Para ello, las células se pueden haber modificado genéticamente mediante la introducción de un ácido nucleico que codifique la proteína de fusión. Métodos adecuados para la introducción de material genético en la célula o células incluyen, sin limitación, precipitación con fosfato de calcio, lipofección, bombardeo de partículas, microinyección, electroporación, sistemas de dispersión coloidal (es decir, complejos de macromoléculas, nanocápsulas, microesferas, perlas y sistemas a base de lípidos incluyendo emulsiones de aceite en agua, micelas, micelas mixtas y liposomas). Estos métodos se entienden en la técnica y se describen en la bibliografía publicada de manera que permita a un experto en la técnica realizar estos métodos.

Alternativamente, la célula se puede haber obtenido mediante la introducción directa de la proteína de fusión bien mediante microinyección o bien mediante modificación de la

proteína de fusión con una región polipeptídica que permite la translocación de dicho polipéptido a través de membranas biológicas. Estas secuencias son conocidas de forma genérica como dominios de transducción de proteína (Protein-transducing domains o PTDs). PTDs adecuados para su uso en la presente incluyen, sin limitación, polipéptidos que comprenden la región mínima de la proteína TAT de HIV formada por la secuencia de aminoácidos RKKRRQRR (residuos 49-57 de TAT) (SEQ ID NO: 52), variantes sintéticas de dicha secuencia tales como YARKARRQARR (SEQ ID NO: 53); YARAARRAARR (SEQ ID NO: 54); YARAARRAARA (SEQ ID NO: 55); YARAAARQARA (SEQ ID NO: 56), la proteína VP22 de HSV-1, polipéptidos que comprenden la secuencia RQIKIWFQNRRMKWKK (SEQ ID NO: 57), derivada de la tercera hélice del homeodominio de la proteína Antennapedia, homeodominios derivados de las proteínas Fushi tarazu (Ftz) y Engrailed (En), polilisina, poliarginina (por ejemplo, Arg9), secuencias formadas por lisina y arginina, Transportan, MAP, MTS, o PEP-1.

En una primera etapa, el tercer método de la invención comprende poner en contacto dicho polipéptido con un co-factor específico del mismo. En una segunda etapa, el tercer método de la invención comprende detectar la luminiscencia emitida por dicho polipéptido. Los términos “polipéptido”, “co-factor específico” y “luminiscencia” han sido descritos en detalle en el contexto del primer método de la invención y se usan de la misma manera en el tercer método de la invención.

Una vez se ha detectado la luminiscencia emitida por dicho polipéptido, se puede determinar la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en la célula o población celular mediante comparación con una señal de referencia.

Como entenderá el experto en la materia, la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en una célula o población celular que comprende el polipéptido puede medirse cuantitativamente utilizando este método. Para ello, se realiza una calibración de la señal de emisión obtenida en la etapa (iii) a diferentes concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$ . Por ejemplo, se puede calibrar una célula o población celular que comprenda la proteína de fusión permeabilizando primero la membrana celular e incubando a continuación la célula o población celular en un medio externo que contiene diferentes concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  libre. Las diferentes señales de emisión de luminiscencia obtenidas se corresponden con las diferentes concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  libre. La permeabilización de la membrana se puede llevar a cabo mediante incubación en medios de cultivo de permeabilización bien conocidos en la técnica. Un ejemplo no limitativo de medios de cultivo de permeabilización celular es un medio del cual hayan sido previamente eliminados los cationes divalentes contaminantes, que contiene 60  $\mu\text{M}$  digitonina, 10  $\mu\text{M}$  nigericina, 20  $\mu\text{M}$  monensina, 10  $\mu\text{M}$  4-BrA23187, 1  $\mu\text{M}$  gramicidina y 2  $\mu\text{M}$  CCCP. Los medios de cultivo que contienen diferentes concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  pueden obtenerse, por ejemplo, mediante la adición de diferentes combinaciones de 0.43 M HEEDTA y 0.1M  $\text{CaCl}_2$ , de manera que las concentraciones finales de  $\text{Ca}^{2+}$  libre estén entre 1 y 100  $\mu\text{M}$ . Una vez calibrada la célula o población celular que comprende la proteína de fusión, la aplicación del primer método de la invención permitirá correlacionar la señal de emisión obtenida en la etapa (ii) con una concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  libre.

Como entenderá el experto en la materia, la célula o población celular del método puede ser una muestra tomada de un animal, preferiblemente un mamífero. Por tanto, en otra realización particular, la célula o población celular comprende una biopsia o un cultivo celular de las células que componen la misma. Las biopsias son pequeñas piezas de tejido y pueden ser frescas, congeladas o fijadas, como, por ejemplo, en formalina y embebidas en parafina (FFPE). Las biopsias, por ejemplo, se pueden extirpar quirúrgicamente la extracción por hipodérmicas o de otros tipos de agujas, por microdissección o por captura con láser. La muestra debe comprender la proteína de fusión para detectar  $\text{Ca}^{2+}$  según el método de la invención.

En otra realización particular, la detección de  $\text{Ca}^{2+}$  se realiza *in vitro* o *ex vivo*.

En otra realización particular, las células o población celular expresan el polipéptido en un compartimento intracelular u orgánulo específico y la detección de  $\text{Ca}^{2+}$  se realiza en dicho compartimento intracelular u orgánulo específico. Las particularidades del péptido de localización han sido analizadas previamente en relación con el polipéptido de la invención. En una realización preferida, el polipéptido se localiza en un compartimento intracelular u orgánulo específico, preferiblemente en el retículo endoplásmico o sarcoplásmico.

En una forma preferida de realización, el polipéptido de la invención comprende la secuencia señal de calreticulina en el extremo N-terminal, y la secuencia de retención KDEL (SEQ ID NO: 27) en el extremo C-terminal. En otra forma de realización, el polipéptido ha perdido la secuencia señal tras ser traslocado al retículo endoplásmico y comprende la secuencia de retención KDEL (SEQ ID NO: 27) en el extremo C-terminal.

En otra forma de preferida de realización, la invención se refiere a un polipéptido que comprende el péptido señal de  $\text{I}\gamma\text{2b}$ , los dominios VDJ y CH1 de la cadena pesada de la inmunoglobulina  $\text{I}\gamma\text{2b}$  en el extremo N-terminal. En otra forma de realización, el polipéptido ha perdido la secuencia señal tras ser traslocado al retículo endoplásmico y comprende los dominios VDJ y CH1 de la cadena pesada de la inmunoglobulina  $\text{I}\gamma\text{2b}$  en el extremo N-terminal.

El experto en la materia entenderá que el primer método de la invención posibilita la detección simultánea de  $\text{Ca}^{2+}$  en dos o más localizaciones intracelulares diferentes. Para ello, se pueden utilizar células o poblaciones celulares que además comprendan un segundo sensor de calcio. Dicho segundo sensor de calcio debe estar dirigido, mediante un péptido señal de localización, a un compartimento intracelular u orgánulo diferente al cual está dirigida la proteína de fusión. Ejemplos no limitativos de sensores de calcio apropiados incluyen Fura-2 y sensores del tipo camaleón y derivados del mismo. De manera preferida, el segundo sensor de calcio es Fura-2.

La “señal de referencia” o “valor de referencia” se refiere a la señal de emisión obtenida en la etapa (ii) tras la aplicación del primer método de la invención sobre una célula o población celular que comprende la proteína de fusión y que se encuentra en estado basal o en un medio sustancialmente libre de  $\text{Ca}^{2+}$ . Una vez que se ha establecido el valor o señal de referencia, el valor de la señal de emisión obtenido en la etapa (ii)

puede compararse con este valor de referencia, permitiendo, por tanto, la detección de alteraciones en los niveles respecto al valor de referencia. Esto puede resultar en un aumento o en una disminución de la intensidad de luminiscencia emitida por el polipéptido.

En otro aspecto, la presente invención se relaciona con un método, en adelante “cuarto método de la invención”, para la detección intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  en una célula o población celular que comprende una proteína de fusión según el segundo aspecto de la invención, en donde dicho método comprende

- (a) detectar la luminiscencia emitida por dicho primer polipéptido en respuesta a la puesta en contacto dicha proteína de fusión con un co-factor específico para dicho primer polipéptido,
- o alternativamente
- (b) detectar la fluorescencia emitida por dicho segundo polipéptido en respuesta a la excitación de la célula o población celular a una longitud de onda correspondiente a la longitud de onda de excitación de dicho segundo polipéptido

en donde una variación en la intensidad de la luminiscencia o fluorescencia emitida por la célula o población celular con respecto a un valor de referencia es indicativo de la presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  en la célula o población celular.

Como el experto en la materia entenderá, una proteína de fusión según el segundo aspecto de la invención, que comprende un primer polipéptido que comprende una variante de apoacuerina con baja afinidad por  $\text{Ca}^{2+}$ , un segundo polipéptido fluorescente y un péptido enlazador puede ser empleada como sensor de  $\text{Ca}^{2+}$ , posibilitando la detección de  $\text{Ca}^{2+}$  mediante detección de luminiscencia, mediada por el primer polipéptido, o mediante detección de fluorescencia, mediada por el segundo polipéptido fluorescente.

El método para la detección intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  en una célula o población celular que comprende una proteína de fusión según el segundo aspecto de la invención, en donde dicho método comprende (a) detectar la luminiscencia emitida por dicho primer polipéptido en respuesta a la puesta en contacto dicha proteína de fusión con un co-factor específico para dicho primer polipéptido, ha sido descrito en detalle en el contexto del tercer método de la invención, con la salvedad de la proteína empleada para la detección, y se usa de la misma manera en el cuarto método de la invención.

Alternativamente, el método para la detección intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  en una célula o población celular que comprende una proteína de fusión según el segundo aspecto de la invención puede ser llevado a cabo mediante un método comprende (b) detectar la fluorescencia emitida por dicho segundo polipéptido en respuesta a la excitación de la célula o población celular a una longitud de onda correspondiente a la longitud de onda de excitación de dicho segundo polipéptido.

El experto en la materia apreciará que tanto la longitud de onda de excitación que se tiene que usar para excitar la proteína de fusión como la longitud de onda a la que se debe efectuar la detección dependerá de las propiedades del segundo polipéptido

fluorescente que forme parte de la proteína de fusión. Dado que la proteína de fusión se excita a la longitud de onda adecuada para la excitación del polipéptido fluorescente y que no es necesario que tenga lugar fenómenos de CRET o FRET para detectar el efecto de la unión de  $\text{Ca}^{2+}$  sobre las propiedades fluorescentes del polipéptido fluorescente, la longitud de onda de excitación corresponde a una longitud de onda próxima al máximo de excitación del polipéptido fluorescente. Ejemplos de proteínas fluorescentes que pueden que se pueden usar en el método de la invención y de las longitudes de onda de excitación y emisión adecuadas para cada una de ellas se encuentran recogidas en la Tabla 1.

Aunque es preferible usar una longitud de onda correspondiente al máximo de excitación de la proteína fluorescente, la invención contempla la posibilidad de que se usen longitudes de onda distintas a las máximas de excitación de la proteína fluorescente siempre que se consiga suficiente excitación de la proteína fluorescente. Así, se puede usar una longitud de onda que se encuentra en un intervalo de  $\pm 50$  nm,  $\pm 40$  nm,  $\pm 30$  nm,  $\pm 25$  nm,  $\pm 20$  nm,  $\pm 15$  nm,  $\pm 10$  nm,  $\pm 8$  nm,  $\pm 6$  nm,  $\pm 4$  nm,  $\pm 2$  nm,  $\pm 1$  nm,  $\pm 0,5$  nm,  $\pm 0,1$  nm ó  $\pm 0,01$  nm con respecto al valor máximo de longitud de onda de excitación.

Aunque es preferible que la detección se lleve a cabo a una longitud de onda correspondiente al máximo de emisión de la proteína fluorescente, la invención contempla la posibilidad de que se lleve a cabo usando longitudes de onda distintas a las máximas de emisión de la proteína fluorescente siempre que se consiga suficiente detección de la emisión fluorescente. Así, la la detección de fluorescencia se lleva a cabo usando una longitud de onda que se encuentra en un intervalo de  $\pm 50$  nm,  $\pm 40$  nm,  $\pm 30$  nm,  $\pm 25$  nm,  $\pm 20$  nm,  $\pm 15$  nm,  $\pm 10$  nm,  $\pm 8$  nm,  $\pm 6$  nm,  $\pm 4$  nm,  $\pm 2$  nm,  $\pm 1$  nm,  $\pm 0,5$  nm,  $\pm 0,1$  nm ó  $\pm 0,01$  nm con respecto al valor máximo de longitud de onda de emisión.

En el caso particular de que la proteína fluorescente que forme parte de la proteína de fusión tenga varios máximos de excitación, la detección de fluorescencia puede llevarse a cabo usando cualquiera de las longitudes de onda de excitación. En el caso particular de que la proteína fluorescente comprende la secuencia de GFPuv (SEQ ID NO: 33), la longitud o longitudes de onda de excitación se encuentran en el rango entre 373 nm y 433 nm y/o el rango entre 440 nm y 500 nm, y preferiblemente la longitud de onda o longitudes de excitación son aproximadamente de 403 nm y/o 470 nm. Asimismo, la detección de fluorescencia se lleva a cabo mediante detección a una longitud de onda de emisión que se encuentra en el rango entre 480 nm y 540 nm, y preferiblemente, la longitud de onda de emisión es aproximadamente de 510 nm.

La medida de la fluorescencia se puede efectuar por métodos bien conocidos en la técnica. Ejemplos no limitativos de instrumentos adecuados para la detección de fluorescencia incluyen espectrofluorómetros y lectores de microplacas, microscopios de fluorescencia, escáneres de fluorescencia, incluyendo lectores de microarrays y citómetros de flujo.

Una vez que se ha detectado la fluorescencia emitida por la proteína de fusión en la célula, se puede determinar la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en la célula o población celular mediante comparación con una señal de referencia.

En una forma preferida de realización, cuando la proteína fluorescente que forme parte de la proteína de fusión tenga varios máximos de excitación, el método de la invención contempla la posibilidad de excitar la célula o población celular a una longitud de onda correspondiente a otro máximo de excitación. La excitación a varias longitudes de onda permite la detección de un número correspondiente de picos de emisión, lo que permite determinar la cantidad de  $\text{Ca}^{2+}$  en una muestra en base al cociente de intensidades emitidas en respuesta a cada una de las longitudes de onda de excitación.

Así, en el caso particular de que la proteína fluorescente que forme parte de la proteína de fusión sea GFPuv, la detección de fluorescencia se lleva a cabo mediante excitación de la célula o población celular a una primera longitud de onda de excitación que se encuentra en el rango entre 373 nm y 433 nm y a una segunda longitud de onda de excitación que se encuentra en el rango entre 440 nm y 500 nm. Alternativamente, la primera longitud de onda de excitación se encuentra en el rango entre 440 nm y 500 nm y la segunda longitud de onda de excitación se encuentra en el rango entre 373 nm y 433 nm. Preferiblemente, la primera longitud de onda de excitación es aproximadamente de 403 nm y la segunda longitud de onda de excitación es aproximadamente de 470 nm, o bien la primera longitud de onda de excitación es aproximadamente de 470 nm y la segunda longitud de onda de excitación es aproximadamente de 403 nm.

Como entenderá el experto en la materia, la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en una célula o población celular que comprende la proteína de fusión puede medirse cuantitativamente utilizando este método. Para ello, se realiza una calibración de la señal de emisión obtenida mediante la detección de fluorescencia a diferentes concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$ . Por ejemplo, se puede calibrar una célula o población celular que comprenda la proteína de fusión permeabilizando primero la membrana celular e incubando a continuación la célula o población celular en un medio externo que contiene diferentes concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  libre. Las diferentes señales de emisión de fluorescencia obtenidas se corresponden con las diferentes concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  libre. La permeabilización de la membrana se puede llevar a cabo mediante incubación en medios de cultivo de permeabilización bien conocidos en la técnica. Un ejemplo no limitativo de medios de cultivo de permeabilización celular es un medio del cual hayan sido previamente eliminados los cationes divalentes contaminantes, que contiene 60  $\mu\text{M}$  digitonina, 10  $\mu\text{M}$  nigericina, 20  $\mu\text{M}$  monensina, 10  $\mu\text{M}$  4-BrA23187, 1  $\mu\text{M}$  gramicidina y 2  $\mu\text{M}$  CCCP. Los medios de cultivo que contienen diferentes concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  pueden obtenerse, por ejemplo, mediante la adición de diferentes combinaciones de 0.43 M HEEDTA y 0.1M  $\text{CaCl}_2$ , de manera que las concentraciones finales de  $\text{Ca}^{2+}$  libre estén entre 1 y 100  $\mu\text{M}$ . Una vez calibrada la célula o población celular que comprende la proteína de fusión, la aplicación del primer método de la invención permitirá correlacionar la señal de emisión obtenida en la etapa (ii) con una concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  libre.

Como entenderá el experto en la materia, la célula o población celular del método puede ser una muestra tomada de un animal, preferiblemente un mamífero. El término “muestra”, según se usa en la presente invención, se refiere a una pequeña parte de un sujeto, representante de la totalidad de un órgano o tejido, y puede estar constituida por

una biopsia o cultivo celular de las células que componen la misma. Por tanto, en otra realización particular, la célula o población celular comprende una biopsia o un cultivo celular de las células que componen la misma. Las biopsias son pequeñas piezas de tejido y pueden ser frescas, congeladas o fijadas, como, por ejemplo, en formalina y embebidas en parafina (FFPE). Las biopsias, por ejemplo, se pueden extirpar quirúrgicamente la extracción por hipodérmicas o de otros tipos de agujas, por microdissección o por captura con láser. La muestra debe comprender la proteína de fusión para detectar  $\text{Ca}^{2+}$  según el método de la invención.

En otra realización particular, la detección de  $\text{Ca}^{2+}$  se realiza *in vitro* o *ex vivo*.

En otra realización particular, las células o población celular expresan la proteína de fusión en un compartimento intracelular u orgánulo específico y la detección de  $\text{Ca}^{2+}$  se realiza en dicho compartimento intracelular u orgánulo específico. Las particularidades del péptido de localización han sido analizadas previamente en relación con la proteína de fusión de la invención. En una realización preferida, la proteína de fusión se localiza en el retículo endoplásmico o sarcoplásmico.

En una forma preferida de realización, la proteína de fusión comprende, desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal, la secuencia señal de calreticulina, el polipéptido de la invención, el enlazador de secuencia SEQ ID NO: 42, GFPuv (SEQ ID NO: 33) y la secuencia de retención KDEL (SEQ ID NO: 27). En otra forma de realización, la proteína de fusión ha perdido la secuencia señal tras ser traslocada al retículo endoplásmico y comprende, desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal, el polipéptido de la invención, el enlazador de secuencia SEQ ID NO: 42, GFPuv (SEQ ID NO: 33) y la secuencia de retención KDEL (SEQ ID NO: 27).

En una forma preferida de realización, la proteína de fusión comprende, desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal, la secuencia señal de calreticulina, el polipéptido de la invención, el enlazador de secuencia SEQ ID NO: 42, una variante de GFPuv (SEQ ID NO: 33) en donde el aminoácido en posición 15 es Gln, el aminoácido en posición 167 es Val, el aminoácido en posición 175 es Gly, y el aminoácido en posición 180 es Tyr, y la secuencia de retención KDEL (SEQ ID NO: 27). En otra forma de realización, la proteína de fusión ha perdido la secuencia señal tras ser traslocada al retículo endoplásmico y comprende, desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal, el polipéptido de la invención, el enlazador de secuencia SEQ ID NO: 42, una variante de GFPuv (SEQ ID NO: 33) en donde el aminoácido en posición 15 es Gln, el aminoácido en posición 167 es Val, el aminoácido en posición 175 es Gly, y el aminoácido en posición 180 es Tyr, y la secuencia de retención KDEL (SEQ ID NO: 27).

En una forma preferida de realización, la proteína de fusión comprende, desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal, la secuencia señal de calreticulina, el polipéptido de la invención, el enlazador de secuencia SEQ ID NO: 42, una variante de GFPuv (SEQ ID NO: 33) en donde el aminoácido en posición 15 es Gln, el aminoácido en posición 167 es Val, el aminoácido en posición 175 es Gly, el aminoácido en posición 180 es Tyr, y el aminoácido en posición 153 es Lys, y la secuencia de retención KDEL (SEQ ID NO: 27). En otra forma de realización, la proteína de fusión

ha perdido la secuencia señal tras ser traslocada al retículo endoplásmico y comprende, desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal, el polipéptido de la invención, el enlazador de secuencia SEQ ID NO: 42, una variante de GFPuv (SEQ ID NO: 33) en donde el aminoácido en posición 15 es Gln, el aminoácido en posición 167 es Val, el aminoácido en posición 175 es Gly, y aminoácido en posición 180 es Tyr, y el aminoácido en posición 153 es Lys, y la secuencia de retención KDEL (SEQ ID NO: 27).

En otra forma de preferida de realización, la invención se refiere a una proteína de fusión comprende, desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal, el péptido señal de Igy2b, los dominios VDJ y CH1 de la cadena pesada de la inmunoglobulina Igy2b, el polipéptido de la invención, el enlazador de secuencia SEQ ID NO: 42, GFPuv (SEQ ID NO: 33). En otra forma de realización, la proteína de fusión ha perdido la secuencia señal tras ser traslocada al retículo endoplásmico y comprende, desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal, los dominios VDJ y CH1 de la cadena pesada de la inmunoglobulina Igy2b, el polipéptido de la invención, el enlazador de secuencia SEQ ID NO: 42, GFPuv (SEQ ID NO: 33).

En otra forma de preferida de realización, la invención se refiere a una proteína de fusión comprende, desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal, el péptido señal de Igy2b, los dominios VDJ y CH1 de la cadena pesada de la inmunoglobulina Igy2b, el polipéptido de la invención, el enlazador de secuencia SEQ ID NO: 42, y una variante de GFPuv (SEQ ID NO: 33) en donde el aminoácido en posición 15 es Gln, el aminoácido en posición 167 es Val, el aminoácido en posición 175 es Gly, y el aminoácido en posición 180 es Tyr. En otra forma de realización, la proteína de fusión ha perdido la secuencia señal tras ser traslocada al retículo endoplásmico y comprende, desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal, los dominios VDJ y CH1 de la cadena pesada de la inmunoglobulina Igy2b, el polipéptido de la invención, el enlazador de secuencia SEQ ID NO: 42, y una variante de GFPuv (SEQ ID NO: 33) en donde el aminoácido en posición 15 es Gln, el aminoácido en posición 167 es Val, el aminoácido en posición 175 es Gly, y el aminoácido en posición 180 es Tyr.

En otra forma de preferida de realización, la invención se refiere a una proteína de fusión comprende, desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal, el péptido señal de Igy2b, los dominios VDJ y CH1 de la cadena pesada de la inmunoglobulina Igy2b, el polipéptido de la invención, el enlazador de secuencia SEQ ID NO: 42, y una variante de GFPuv (SEQ ID NO: 33) en donde el aminoácido en posición 15 es Gln, el aminoácido en posición 167 es Val, el aminoácido en posición 175 es Gly, el aminoácido en posición 180 es Tyr, y el aminoácido en posición 153 es Lys. En otra forma de realización, la proteína de fusión ha perdido la secuencia señal tras ser traslocada al retículo endoplásmico y comprende, desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal, los dominios VDJ y CH1 de la cadena pesada de la inmunoglobulina Igy2b, el polipéptido de la invención, el enlazador de secuencia SEQ ID NO: 42, y una variante de GFPuv (SEQ ID NO: 33) en donde el aminoácido en posición 15 es Gln, el aminoácido en posición 167 es Val, el aminoácido en posición 175 es Gly, el aminoácido en posición 180 es Tyr, y el aminoácido en posición 153 es Lys.

En una forma preferida de realización, la proteína de fusión comprende, desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal, la secuencia señal de calreticulina, GFPuv (SEQ ID NO: 33), el enlazador de secuencia SEQ ID NO: 42, el polipéptido de la invención, y la secuencia de retención KDEL (SEQ ID NO: 27). En otra forma de realización, la proteína de fusión ha perdido la secuencia señal tras ser traslocada al retículo endoplásmico y comprende, desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal, GFPuv (SEQ ID NO: 33), el enlazador de secuencia SEQ ID NO: 42, el polipéptido de la invención, y la secuencia de retención KDEL (SEQ ID NO: 27).

En una forma preferida de realización, la proteína de fusión comprende, desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal, la secuencia señal de calreticulina, una variante de GFPuv (SEQ ID NO: 33) en donde el aminoácido en posición 15 es Gln, el aminoácido en posición 167 es Val, el aminoácido en posición 175 es Gly, y el aminoácido en posición 180 es Tyr, el enlazador de secuencia SEQ ID NO: 42, el polipéptido de la invención, y la secuencia de retención KDEL (SEQ ID NO: 27). En otra forma de realización, la proteína de fusión ha perdido la secuencia señal tras ser traslocada al retículo endoplásmico y comprende, desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal, una variante de GFPuv (SEQ ID NO: 33) en donde el aminoácido en posición 15 es Gln, el aminoácido en posición 167 es Val, el aminoácido en posición 175 es Gly, y el aminoácido en posición 180 es Tyr, el enlazador de secuencia SEQ ID NO: 42, el polipéptido de la invención, y la secuencia de retención KDEL (SEQ ID NO: 27).

En una forma preferida de realización, la proteína de fusión comprende, desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal, la secuencia señal de calreticulina, una variante de GFPuv (SEQ ID NO: 33) en donde el aminoácido en posición 15 es Gln, el aminoácido en posición 167 es Val, el aminoácido en posición 175 es Gly, el aminoácido en posición 180 es Tyr, y el aminoácido en posición 153 es Lys, el enlazador de secuencia SEQ ID NO: 42, el polipéptido de la invención, y la secuencia de retención KDEL (SEQ ID NO: 27). En otra forma de realización, la proteína de fusión ha perdido la secuencia señal tras ser traslocada al retículo endoplásmico y comprende, desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal, una variante de GFPuv (SEQ ID NO: 33) en donde el aminoácido en posición 15 es Gln, el aminoácido en posición 167 es Val, el aminoácido en posición 175 es Gly, y aminoácido en posición 180 es Tyr, y el aminoácido en posición 153 es Lys, el enlazador de secuencia SEQ ID NO: 42, el polipéptido de la invención, y la secuencia de retención KDEL (SEQ ID NO: 27).

En otra forma de preferida de realización, la invención se refiere a una proteína de fusión comprende, desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal, el péptido señal de Igy2b, los dominios VDJ y CH1 de la cadena pesada de la inmunoglobulina Igy2b, GFPuv (SEQ ID NO: 33), el enlazador de secuencia SEQ ID NO: 42, y el polipéptido de la invención. En otra forma de realización, la proteína de fusión ha perdido la secuencia señal tras ser traslocada al retículo endoplásmico y comprende, desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal, los dominios VDJ y CH1 de la cadena pesada de la inmunoglobulina Igy2b, el enlazador de secuencia SEQ ID NO: 42, GFPuv (SEQ ID NO: 33), y el polipéptido de la invención,

En otra forma de preferida de realización, la invención se refiere a una proteína de fusión comprende, desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal, el péptido señal de Igy2b, los dominios VDJ y CH1 de la cadena pesada de la inmunoglobulina Igy2b, una variante de GFPuv (SEQ ID NO: 33) en donde el aminoácido en posición 15 es Gln, el aminoácido en posición 167 es Val, el aminoácido en posición 175 es Gly, y el aminoácido en posición 180 es Tyr, el enlazador de secuencia SEQ ID NO: 42, y el polipéptido de la invención. En otra forma de realización, la proteína de fusión ha perdido la secuencia señal tras ser traslocada al retículo endoplásmico y comprende, desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal, los dominios VDJ y CH1 de la cadena pesada de la inmunoglobulina Igy2b, una variante de GFPuv (SEQ ID NO: 33) en donde el aminoácido en posición 15 es Gln, el aminoácido en posición 167 es Val, el aminoácido en posición 175 es Gly, y el aminoácido en posición 180 es Tyr, el enlazador de secuencia SEQ ID NO: 42, y el polipéptido de la invención.

En otra forma de preferida de realización, la invención se refiere a una proteína de fusión comprende, desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal, el péptido señal de Igy2b, los dominios VDJ y CH1 de la cadena pesada de la inmunoglobulina Igy2b, una variante de GFPuv (SEQ ID NO: 33) en donde el aminoácido en posición 15 es Gln, el aminoácido en posición 167 es Val, el aminoácido en posición 175 es Gly, el aminoácido en posición 180 es Tyr, y el aminoácido en posición 153 es Lys, el enlazador de secuencia SEQ ID NO: 42, y el polipéptido de la invención. En otra forma de realización, la proteína de fusión ha perdido la secuencia señal tras ser traslocada al retículo endoplásmico y comprende, desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal, los dominios VDJ y CH1 de la cadena pesada de la inmunoglobulina Igy2b, una variante de GFPuv (SEQ ID NO: 33) en donde el aminoácido en posición 15 es Gln, el aminoácido en posición 167 es Val, el aminoácido en posición 175 es Gly, el aminoácido en posición 180 es Tyr, y el aminoácido en posición 153 es Lys, el enlazador de secuencia SEQ ID NO: 42, y el polipéptido de la invención.

El experto en la materia entenderá que el cuarto método de la invención posibilita la detección simultánea de  $\text{Ca}^{2+}$  en dos o más localizaciones intracelulares diferentes. Para ello, se pueden utilizar células o poblaciones celulares que además comprendan un segundo sensor de calcio. Dicho segundo sensor de calcio debe estar dirigido, mediante un péptido señal de localización, a un compartimento intracelular u orgánulo diferente al cual está dirigida la proteína de fusión. Ejemplos no limitativos de sensores de calcio apropiados incluyen Fura-2 y sensores del tipo camaleón y derivados del mismo. De manera preferida, el segundo sensor de calcio es Fura-2.

La “señal de referencia” o “valor de referencia” se refiere a la señal de emisión obtenida en la etapa (ii) tras la aplicación del cuarto método de la invención sobre una célula o población celular que comprende la proteína de fusión y que se encuentra en estado basal o en un medio sustancialmente libre de  $\text{Ca}^{2+}$ . Una vez que se ha establecido el valor o señal de referencia, el valor de la señal de emisión obtenido puede compararse con este valor de referencia, permitiendo, por tanto, la detección de alteraciones en los niveles respecto al valor de referencia. Dependiendo de la combinación del primer polipéptido y del segundo polipéptido fluorescente, la unión de  $\text{Ca}^{2+}$  al primer polipéptido puede resultar en un aumento o en una disminución de la intensidad de fluorescencia emitida por el segundo polipéptido fluorescente.

Métodos para la detección de variaciones en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en una célula o población celular

En otro aspecto, la presente invención se relaciona con un método, en adelante “quinto método de la invención”, para la detección de variaciones en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en una célula o población celular a lo largo del tiempo que comprende

- (i) proporcionar una célula o población celular en donde dicha célula o células comprenden el polipéptido de la invención,
- (ii) poner en contacto dicho polipéptido con un co-factor específico del mismo,
- (iii) determinar a un primer tiempo la luminiscencia emitida por la célula o población celular, y
- (iv) determinar a un segundo tiempo la luminiscencia emitida por la célula o población celular

en donde una variación en la intensidad de la señal emitida en (iv) con respecto a la intensidad de la señal emitida en (iii) es indicativo de una variación en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en la célula o población celular.

En una primera etapa, el sexto método de la invención comprende proporcionar una célula o población celular en donde dicha célula o células comprenden el polipéptido de acuerdo a la invención.

En una segunda etapa, el quinto método de la invención comprende poner en contacto dicho polipéptido con un co-factor específico del mismo.

Las expresiones “célula”, “población celular”, “polipéptido” y “co-factor específico” se han descrito en detalle en el contexto de los polipéptidos de la invención y se usan de la misma manera en los métodos de la invención.

En otra realización particular, las células o población celular expresan el polipéptido en un compartimento intracelular u orgánulo específico y la detección de  $\text{Ca}^{2+}$  se realiza en dicho compartimento intracelular u orgánulo específico. Las particularidades del péptido de localización han sido analizadas previamente en relación con el polipéptido de la invención. En una realización preferida, el polipéptido se localiza en el retículo endoplásmico o sarcoplásmico.

En una forma preferida de realización, el polipéptido comprende, desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal, la secuencia señal de calreticulina, el polipéptido de la invención y la secuencia de retención KDEL (SEQ ID NO: 27). En otra forma de realización, la proteína de fusión ha perdido la secuencia señal tras ser traslocado al retículo endoplásmico y comprende, desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal, el polipéptido de la invención y la secuencia de retención KDEL (SEQ ID NO: 27).

En otra forma de preferida de realización, el polipéptido comprende, desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal, el péptido señal de Igy2b, los dominios VDJ y CH1 de la cadena pesada de la inmunoglobulina Igy2b y el polipéptido de la invención. En otra forma de realización, el polipéptido ha perdido la secuencia señal tras ser

traslocado al retículo endoplásmico y comprende, desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal, los dominios VDJ y CH1 de la cadena pesada de la inmunoglobulina I $\gamma$ 2b y el polipéptido de la invención.

En una tercera etapa (iii), el quinto método de la invención comprende determinar a un primer tiempo la luminiscencia emitida por la célula o población celular a una longitud de onda correspondiente a la longitud de onda de emisión de dicho polipéptido.

En una cuarta etapa (iv), el quinto método de la invención comprende determinar a un segundo tiempo la luminiscencia emitida por la célula o población celular a una longitud de onda correspondiente a la longitud de onda de emisión de dicho polipéptido.

Una vez determinada la intensidad de luminiscencia a dichos primer y segundo tiempo, se determina la existencia de una variación en la concentración de Ca<sup>2+</sup> en la célula o población celular entre dicho primer tiempo y dicho segundo tiempo cuando se observa una variación detectable en la intensidad de la señal emitida en la etapa (iv) con respecto a la intensidad de la señal emitida en la etapa (iii).

El término “alteración en la intensidad de la señal emitida”, según se usa en el quinto método de la invención, se refiere a una variación en la intensidad de la luminiscencia emitida por el polipéptido. Dicha variación en la intensidad se detecta como una variación en las unidades de luminiscencia a un segundo tiempo con respecto del primer tiempo. Puesto que la intensidad de la señal emitida está relacionada con la concentración de Ca<sup>2+</sup> intracelular, resultará evidente para el experto en la materia que las variaciones en la señal emitida se correlacionan con variaciones en la concentración de Ca<sup>2+</sup> intracelular. Se entiende por variación en la intensidad de la señal un cambio de al menos un 5%, al menos un 10%, al menos un 20%, al menos un 30%, al menos un 40%, al menos un 50%, al menos un 60%, al menos un 70%, al menos un 80%, al menos un 90%, al menos un 100% o más en la intensidad de emisión en el segundo tiempo con respecto al primer tiempo. Dependiendo de la combinación del primer polipéptido y del segundo polipéptido fluorescente en la proteína de fusión, el cambio en la concentración de calcio intracelular puede dar lugar a una variación en la intensidad de la señal emitida en el mismo sentido (un aumento en la concentración de Ca<sup>2+</sup> intracelular resulta en un aumento en la señal emitida y una disminución en la concentración de Ca<sup>2+</sup> intracelular resulta en una disminución en la señal emitida) o en sentido opuesto (un aumento en la concentración de Ca<sup>2+</sup> intracelular resulta en una disminución en la señal emitida y una disminución en la concentración de Ca<sup>2+</sup> intracelular resulta en un aumento en la señal emitida).

La detección de variaciones en la concentración de Ca<sup>2+</sup> intracelular en una célula o población celular en diferentes tiempos consecutivos permitirá la detección de variaciones en la concentración de Ca<sup>2+</sup> a tiempo real.

La medida de la luminiscencia se puede efectuar por métodos bien conocidos en la técnica. Ejemplos no limitativos de instrumentos adecuados para la detección de luminiscencia incluyen luminómetros y lectores de microplacas, cámaras de CCD.

El experto apreciará que la longitud de onda a la que se debe efectuar la detección dependerá de las propiedades del polipéptido. En el caso de la apoacuorina (SEQ ID NO: 1), dicha longitud de onda de emisión es  $\lambda = 469$  nm. El experto en la materia podrá fácilmente determinar la longitud de onda correspondiente al máximo de emisión del polipéptido. Aunque es preferible que la detección en las etapas (iii) y (iv) se lleven a cabo a una longitud de onda correspondiente al máximo de emisión del polipéptido, la invención contempla la posibilidad de que las etapas (iii) y (iv) se lleven a cabo usando longitudes de onda distintas a las máximas de emisión del polipéptido siempre que se consiga suficiente detección de la emisión luminiscente. Así, las etapas (iii) y (iv) se llevan a cabo usando una longitud de onda que se encuentra en un intervalo de  $\pm 50$  nm,  $\pm 40$  nm,  $\pm 30$  nm,  $\pm 25$  nm,  $\pm 20$  nm,  $\pm 15$  nm,  $\pm 10$  nm,  $\pm 8$  nm,  $\pm 6$  nm,  $\pm 4$  nm,  $\pm 2$  nm,  $\pm 1$  nm,  $\pm 0,5$  nm,  $\pm 0,1$  nm ó  $\pm 0,01$  nm con respecto al valor máximo de longitud de onda de emisión.

En el caso particular de que el polipéptido tenga un máximo de emisión sustancialmente idéntico al de la apoacuorina (SEQ ID NO: 1),  $\lambda = 469$  nm, la etapa (iii) se lleva a cabo mediante detección a una longitud de onda de emisión que se encuentra en el rango entre 439 nm y 499 nm, y preferiblemente, la longitud de onda de emisión es aproximadamente de 469 nm.

La concentración aumenta significativamente, según se usa en la presente invención, se refiere a aumentos de al menos un 10%, al menos un 20%, al menos un 30%, al menos un 40%, al menos un 50%, al menos un 60%, al menos un 70%, al menos un 80%, al menos un 90%, al menos 2 veces, al menos 3 veces, al menos 4 veces, al menos 5 veces, al menos 6 veces, al menos 7 veces, al menos 8 veces, al menos 9 veces, al menos 10 veces, al menos 100 veces, al menos 1000 veces o más.

En otro aspecto, la presente invención se relaciona con un método, en adelante “sexto método de la invención”, para la detección de variaciones en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en una célula o población celular a lo largo del tiempo que comprende

- (i) proporcionar una célula o población celular en donde dicha célula o células comprenden una proteína de fusión que comprende un primer polipéptido y un segundo polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 20,
- (ii.a) determinar a un primer tiempo la luminiscencia emitida por la célula o población celular en respuesta a la puesta en contacto dicha proteína de fusión con un co-factor específico para dicho primer polipéptido, y
- (iii.a) determinar a un segundo tiempo la luminiscencia emitida por la célula o población celular en respuesta a la puesta en contacto dicha proteína de fusión con un co-factor específico para dicho primer polipéptido,

o alternativamente

- (ii.b) determinar a un primer tiempo la fluorescencia emitida por la célula o población celular en respuesta a una excitación de dicha célula o población a una longitud de onda correspondiente a la longitud de onda de excitación de dicho segundo polipéptido y
- (iii.b) determinar a un segundo tiempo la fluorescencia emitida por la célula o población celular en respuesta a una excitación de dicha célula o población a

una longitud de onda correspondiente a la longitud de onda de excitación de dicho segundo polipéptido

en donde una variación en la intensidad de la señal emitida en (iii.a) con respecto a la intensidad de la señal emitida en (ii.a) o una variación en la intensidad de la señal emitida en (iii.b) con respecto a la intensidad de la señal emitida en (ii.b) es indicativo de una variación en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en la célula o población celular.

En una primera etapa, el sexto método de la invención comprende proporcionar una célula o población celular en donde dicha célula o células comprenden una proteína de fusión de acuerdo a la invención.

Las expresiones “célula”, “población celular”, y “proteína de fusión” se han descrito en detalle en el contexto de las proteínas de fusión de la invención y se usan de la misma manera en los métodos de la invención.

En una realización particular, las células o población celular expresan la proteína de fusión en un compartimento intracelular u orgánulo específico y la detección de  $\text{Ca}^{2+}$  se realiza en dicho compartimento intracelular u orgánulo específico. Las particularidades del péptido de localización han sido analizadas previamente en relación con la proteína de fusión de la invención. En una realización preferida, la proteína de fusión se localiza en el retículo endoplásmico o sarcoplásmico.

En una forma preferida de realización, la proteína de fusión comprende, desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal, la secuencia señal de calreticulina, el polipéptido de la invención, GFPuv (SEQ ID NO: 33) y la secuencia de retención KDEL (SEQ ID NO: 27). En otra forma de realización, la proteína de fusión ha perdido la secuencia señal tras ser traslocada al retículo endoplásmico y comprende, desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal, el polipéptido de la invención, el enlazador de secuencia SEQ ID NO: 42, GFPuv (SEQ ID NO: 33) y la secuencia de retención KDEL (SEQ ID NO: 27).

En una forma preferida de realización, la proteína de fusión comprende, desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal, la secuencia señal de calreticulina, el polipéptido de la invención, el enlazador de secuencia SEQ ID NO: 42, una variante de GFPuv (SEQ ID NO: 33) en donde el aminoácido en posición 15 es Gln, el aminoácido en posición 167 es Val, el aminoácido en posición 175 es Gly, y el aminoácido en posición 180 es Tyr, y la secuencia de retención KDEL (SEQ ID NO: 27). En otra forma de realización, la proteína de fusión ha perdido la secuencia señal tras ser traslocada al retículo endoplásmico y comprende, desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal, el polipéptido de la invención, el enlazador de secuencia SEQ ID NO: 42, una variante de GFPuv (SEQ ID NO: 33) en donde el aminoácido en posición 15 es Gln, el aminoácido en posición 167 es Val, el aminoácido en posición 175 es Gly, y el aminoácido en posición 180 es Tyr, y la secuencia de retención KDEL (SEQ ID NO: 27).

En una forma preferida de realización, la proteína de fusión comprende, desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal, la secuencia señal de calreticulina, el

polipéptido de la invención, el enlazador de secuencia SEQ ID NO: 42, una variante de GFPuv (SEQ ID NO: 33) en donde el aminoácido en posición 15 es Gln, el aminoácido en posición 167 es Val, el aminoácido en posición 175 es Gly, el aminoácido en posición 180 es Tyr, y el aminoácido en posición 153 es Lys, y la secuencia de retención KDEL (SEQ ID NO: 27). En otra forma de realización, la proteína de fusión ha perdido la secuencia señal tras ser traslocada al retículo endoplásmico y comprende, desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal, el polipéptido de la invención, el enlazador de secuencia SEQ ID NO: 42, una variante de GFPuv (SEQ ID NO: 33) en donde el aminoácido en posición 15 es Gln, el aminoácido en posición 167 es Val, el aminoácido en posición 175 es Gly, y aminoácido en posición 180 es Tyr, y el aminoácido en posición 153 es Lys, y la secuencia de retención KDEL (SEQ ID NO: 27).

En otra forma de preferida de realización, la invención se refiere a una proteína de fusión comprende, desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal, el péptido señal de Iγ2b, los dominios VDJ y CH1 de la cadena pesada de la inmunoglobulina Iγ2b, el polipéptido de la invención, el enlazador de secuencia SEQ ID NO: 42, GFPuv (SEQ ID NO: 33). En otra forma de realización, la proteína de fusión ha perdido la secuencia señal tras ser traslocada al retículo endoplásmico y comprende, desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal, los dominios VDJ y CH1 de la cadena pesada de la inmunoglobulina Iγ2b, el polipéptido de la invención, el enlazador de secuencia SEQ ID NO: 42, GFPuv (SEQ ID NO: 33).

En otra forma de preferida de realización, la invención se refiere a una proteína de fusión comprende, desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal, el péptido señal de Iγ2b, los dominios VDJ y CH1 de la cadena pesada de la inmunoglobulina Iγ2b, el polipéptido de la invención, el enlazador de secuencia SEQ ID NO: 42, y una variante de GFPuv (SEQ ID NO: 33) en donde el aminoácido en posición 15 es Gln, el aminoácido en posición 167 es Val, el aminoácido en posición 175 es Gly, y el aminoácido en posición 180 es Tyr. En otra forma de realización, la proteína de fusión ha perdido la secuencia señal tras ser traslocada al retículo endoplásmico y comprende, desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal, los dominios VDJ y CH1 de la cadena pesada de la inmunoglobulina Iγ2b, el polipéptido de la invención, el enlazador de secuencia SEQ ID NO: 42, y una variante de GFPuv (SEQ ID NO: 33) en donde el aminoácido en posición 15 es Gln, el aminoácido en posición 167 es Val, el aminoácido en posición 175 es Gly, y el aminoácido en posición 180 es Tyr.

En otra forma de preferida de realización, la invención se refiere a una proteína de fusión comprende, desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal, el péptido señal de Iγ2b, los dominios VDJ y CH1 de la cadena pesada de la inmunoglobulina Iγ2b, el polipéptido de la invención, el enlazador de secuencia SEQ ID NO: 42, y una variante de GFPuv (SEQ ID NO: 33) en donde el aminoácido en posición 15 es Gln, el aminoácido en posición 167 es Val, el aminoácido en posición 175 es Gly, el aminoácido en posición 180 es Tyr, y el aminoácido en posición 153 es Lys. En otra forma de realización, la proteína de fusión ha perdido la secuencia señal tras ser traslocada al retículo endoplásmico y comprende, desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal, los dominios VDJ y CH1 de la cadena pesada de la inmunoglobulina Iγ2b, el polipéptido de la invención, el enlazador de secuencia SEQ

ID NO: 42, y una variante de GFPuv (SEQ ID NO: 33) en donde el aminoácido en posición 15 es Gln, el aminoácido en posición 167 es Val, el aminoácido en posición 175 es Gly, el aminoácido en posición 180 es Tyr, y el aminoácido en posición 153 es Lys.

En una forma preferida de realización, la proteína de fusión comprende, desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal, la secuencia señal de calreticulina, GFPuv (SEQ ID NO: 33), el enlazador de secuencia SEQ ID NO: 42, el polipéptido de la invención, y la secuencia de retención KDEL (SEQ ID NO: 27). En otra forma de realización, la proteína de fusión ha perdido la secuencia señal tras ser traslocada al retículo endoplásmico y comprende, desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal, GFPuv (SEQ ID NO: 33), el enlazador de secuencia SEQ ID NO: 42, el polipéptido de la invención, y la secuencia de retención KDEL (SEQ ID NO: 27).

En una forma preferida de realización, la proteína de fusión comprende, desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal, la secuencia señal de calreticulina, una variante de GFPuv (SEQ ID NO: 33) en donde el aminoácido en posición 15 es Gln, el aminoácido en posición 167 es Val, el aminoácido en posición 175 es Gly, y el aminoácido en posición 180 es Tyr, el enlazador de secuencia SEQ ID NO: 42, el polipéptido de la invención, y la secuencia de retención KDEL (SEQ ID NO: 27). En otra forma de realización, la proteína de fusión ha perdido la secuencia señal tras ser traslocada al retículo endoplásmico y comprende, desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal, una variante de GFPuv (SEQ ID NO: 33) en donde el aminoácido en posición 15 es Gln, el aminoácido en posición 167 es Val, el aminoácido en posición 175 es Gly, y el aminoácido en posición 180 es Tyr, el enlazador de secuencia SEQ ID NO: 42, el polipéptido de la invención, y la secuencia de retención KDEL (SEQ ID NO: 27).

En una forma preferida de realización, la proteína de fusión comprende, desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal, la secuencia señal de calreticulina, una variante de GFPuv (SEQ ID NO: 33) en donde el aminoácido en posición 15 es Gln, el aminoácido en posición 167 es Val, el aminoácido en posición 175 es Gly, el aminoácido en posición 180 es Tyr, y el aminoácido en posición 153 es Lys, el enlazador de secuencia SEQ ID NO: 42, el polipéptido de la invención, y la secuencia de retención KDEL (SEQ ID NO: 27). En otra forma de realización, la proteína de fusión ha perdido la secuencia señal tras ser traslocada al retículo endoplásmico y comprende, desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal, una variante de GFPuv (SEQ ID NO: 33) en donde el aminoácido en posición 15 es Gln, el aminoácido en posición 167 es Val, el aminoácido en posición 175 es Gly, y aminoácido en posición 180 es Tyr, y el aminoácido en posición 153 es Lys, el enlazador de secuencia SEQ ID NO: 42, el polipéptido de la invención, y la secuencia de retención KDEL (SEQ ID NO: 27).

En otra forma de preferida de realización, la invención se refiere a una proteína de fusión comprende, desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal, el péptido señal de Igy2b, los dominios VDJ y CH1 de la cadena pesada de la inmunoglobulina Igy2b, GFPuv (SEQ ID NO: 33), el enlazador de secuencia SEQ ID NO: 42, y el polipéptido de la invención. En otra forma de realización, la proteína de fusión ha perdido la

secuencia señal tras ser traslocada al retículo endoplásmico y comprende, desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal, los dominios VDJ y CH1 de la cadena pesada de la inmunoglobulina I $\gamma$ 2b, el enlazador de secuencia SEQ ID NO: 42, GFPuv (SEQ ID NO: 33), y el polipéptido de la invención,

En otra forma de preferida de realización, la invención se refiere a una proteína de fusión comprende, desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal, el péptido señal de I $\gamma$ 2b, los dominios VDJ y CH1 de la cadena pesada de la inmunoglobulina I $\gamma$ 2b, una variante de GFPuv (SEQ ID NO: 33) en donde el aminoácido en posición 15 es Gln, el aminoácido en posición 167 es Val, el aminoácido en posición 175 es Gly, y el aminoácido en posición 180 es Tyr, el enlazador de secuencia SEQ ID NO: 42, y el polipéptido de la invención. En otra forma de realización, la proteína de fusión ha perdido la secuencia señal tras ser traslocada al retículo endoplásmico y comprende, desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal, los dominios VDJ y CH1 de la cadena pesada de la inmunoglobulina I $\gamma$ 2b, una variante de GFPuv (SEQ ID NO: 33) en donde el aminoácido en posición 15 es Gln, el aminoácido en posición 167 es Val, el aminoácido en posición 175 es Gly, y el aminoácido en posición 180 es Tyr, el enlazador de secuencia SEQ ID NO: 42, y el polipéptido de la invención.

En otra forma de preferida de realización, la invención se refiere a una proteína de fusión comprende, desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal, el péptido señal de I $\gamma$ 2b, los dominios VDJ y CH1 de la cadena pesada de la inmunoglobulina I $\gamma$ 2b, una variante de GFPuv (SEQ ID NO: 33) en donde el aminoácido en posición 15 es Gln, el aminoácido en posición 167 es Val, el aminoácido en posición 175 es Gly, el aminoácido en posición 180 es Tyr, y el aminoácido en posición 153 es Lys, el enlazador de secuencia SEQ ID NO: 42, y el polipéptido de la invención. En otra forma de realización, la proteína de fusión ha perdido la secuencia señal tras ser traslocada al retículo endoplásmico y comprende, desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal, los dominios VDJ y CH1 de la cadena pesada de la inmunoglobulina I $\gamma$ 2b, una variante de GFPuv (SEQ ID NO: 33) en donde el aminoácido en posición 15 es Gln, el aminoácido en posición 167 es Val, el aminoácido en posición 175 es Gly, el aminoácido en posición 180 es Tyr, y el aminoácido en posición 153 es Lys, el enlazador de secuencia SEQ ID NO: 42, y el polipéptido de la invención.

En una segunda etapa (ii.a), el sexto método de la invención comprende determinar a un primer tiempo la luminiscencia emitida por la célula o población celular en respuesta a la puesta en contacto dicha proteína de fusión con un co-factor específico para dicho primer polipéptido.

En una tercera etapa (iii.a), el sexto método de la invención comprende determinar a un segundo tiempo la luminiscencia emitida por la célula o población celular en respuesta a la puesta en contacto dicha proteína de fusión con un co-factor específico para dicho primer polipéptido.

Una vez determinada la intensidad de luminiscencia a dichos primer y segundo tiempo, se determina la existencia de una variación en la concentración de Ca<sup>2+</sup> en la célula o población celular entre dicho primer tiempo y dicho segundo tiempo cuando se observa

una variación detectable en la intensidad de la señal emitida en la etapa (iii.a) con respecto a la intensidad de la señal emitida en la etapa (ii.a).

La detección de variaciones en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en una célula o población celular en diferentes tiempos consecutivos permitirá la detección de variaciones en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  a tiempo real.

El experto apreciará que la longitud de onda a la que se debe efectuar la detección dependerá de las propiedades del polipéptido. En el caso de la apoacuorina (SEQ ID NO: 1), dicha longitud de onda de emisión es  $\lambda = 469 \text{ nm}$ . El experto en la materia podrá fácilmente determinar la longitud de onda correspondiente al máximo de emisión del polipéptido. Aunque es preferible que la detección en las etapas (iii) y (iv) se lleven a cabo a una longitud de onda correspondiente al máximo de emisión del polipéptido, la invención contempla la posibilidad de que las etapas (iii) y (iv) se lleven a cabo usando longitudes de onda distintas a las máximas de emisión del polipéptido siempre que se consiga suficiente detección de la emisión luminiscente. Así, las etapas (iii) y (iv) se llevan a cabo usando una longitud de onda que se encuentra en un intervalo de  $\pm 50 \text{ nm}$ ,  $\pm 40 \text{ nm}$ ,  $\pm 30 \text{ nm}$ ,  $\pm 25 \text{ nm}$ ,  $\pm 20 \text{ nm}$ ,  $\pm 15 \text{ nm}$ ,  $\pm 10 \text{ nm}$ ,  $\pm 8 \text{ nm}$ ,  $\pm 6 \text{ nm}$ ,  $\pm 4 \text{ nm}$ ,  $\pm 2 \text{ nm}$ ,  $\pm 1 \text{ nm}$ ,  $\pm 0,5 \text{ nm}$ ,  $\pm 0,1 \text{ nm}$  ó  $\pm 0,01 \text{ nm}$  con respecto al valor máximo de longitud de onda de emisión.

En el caso particular de que el polipéptido tenga un máximo de emisión sustancialmente idéntico al de la apoacuorina (SEQ ID NO: 1),  $\lambda = 469 \text{ nm}$ , la etapa (iii) se lleva a cabo mediante detección a una longitud de onda de emisión que se encuentra en el rango entre  $439 \text{ nm}$  y  $499 \text{ nm}$ , y preferiblemente, la longitud de onda de emisión es aproximadamente de  $469 \text{ nm}$ .

Alternativamente, en una segunda etapa (ii.b), el sexto método de la invención comprende determinar a un primer tiempo la fluorescencia emitida por la célula o población celular en respuesta a una excitación de dicha célula o población a una longitud de onda correspondiente a la longitud de onda de excitación de dicho segundo polipéptido fluorescente.

En una tercera etapa (iii.b), el sexto método de la invención comprende determinar a un segundo tiempo la fluorescencia emitida por la célula o población celular en respuesta a una excitación de dicha célula o población a una longitud de onda correspondiente a la longitud de onda de excitación de dicho segundo polipéptido fluorescente.

Una vez determinada la intensidad de fluorescencia a dichos primer y segundo tiempo, se determina la existencia de una variación en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en la célula o población celular entre dicho primer tiempo y dicho segundo tiempo cuando se observa una variación detectable en la intensidad de la señal emitida en la etapa (iii.b) con respecto a la intensidad de la señal emitida en la etapa (ii.b).

El experto apreciará que tanto longitud de onda de excitación que se tiene que usar en las etapas (ii.b) y (iii.b) para excitar la proteína de fusión como la longitud de onda a la que se debe efectuar la detección de la fluorescencia en ambas etapas dependerá de las propiedades del polipéptido fluorescente que forme parte de la proteína de fusión. Dado

que la proteína de fusión se excita a la longitud de onda adecuada para la excitación del polipéptido fluorescente y que no es necesario que tenga lugar fenómenos de CRET o FRET para detectar el efecto de la unión de  $\text{Ca}^{2+}$  sobre las propiedades fluorescentes del polipéptido fluorescente, la longitud de onda de excitación que se usa en la etapa (ii.b) corresponde a una longitud de onda próxima al máximo de excitación del polipéptido fluorescente. Ejemplos de proteínas fluorescentes que pueden que se pueden usar en el método de la invención y de las longitudes de onda de excitación y emisión adecuadas para cada una de ellas se encuentran recogidas en la Tabla 1.

En el caso particular de que la proteína fluorescente que forme parte de la proteína de fusión tenga varios máximos de excitación, las etapas (ii.b) y (iii.b) pueden llevarse a cabo usando cualquiera de las longitudes de onda de excitación. En el caso particular de que la proteína fluorescente comprende la secuencia de GFPuv, la longitud o longitudes de onda de excitación se encuentran en el rango entre 373 nm y 433 nm y/o el rango entre 440 nm y 500 nm, y preferiblemente la longitud de onda o longitudes de excitación son aproximadamente de 403 nm y/o 470 nm. Asimismo, las etapas (ii.b) y (iii.b) se llevan a cabo mediante detección a una longitud de onda de emisión que se encuentra en el rango entre 480 nm y 540 nm, y preferiblemente, la longitud de onda de emisión es aproximadamente de 510 nm.

En una forma preferida de realización, cuando la proteína fluorescente que forme parte de la proteína de fusión tenga varios máximos de excitación, el método de la invención contempla la posibilidad de excitar la célula o población celular en las etapas (ii.b) y (iii.b) a varias longitudes de onda correspondientes a los máximos de excitación. La excitación a varias longitudes de onda permite la detección de un número correspondiente de picos de emisión, lo que permite determinar la variación en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en célula o población celular en base al cociente de intensidades emitidas en respuesta a cada una de las longitudes de onda de excitación. Así, se considera que existe un cambio en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en célula o población celular cuando se observa una variación en el cociente de intensidades de fluorescencia en respuesta a la excitación a la primera longitud de onda y la segunda longitud de onda de al menos un 10%, un 20%, un 30%, un 40%, un 50%, un 60%, un 70%, un 80%, un 90%, un 100%, o de al menos 2 veces, 4 veces, 6 veces, 8 veces, 10 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 60 veces, 70 veces, 80 veces, 90 veces, 100 veces o más.

Así, en el caso particular de que la proteína fluorescente que forme parte de la proteína de fusión sea GFPuv, la etapa (ii.b) se lleva a cabo mediante excitación de la célula o población celular a una primera longitud de onda de excitación que se encuentra en el rango entre 373 nm y 433 nm y a una segunda longitud de onda de excitación que se encuentra en el rango entre 440 nm y 500 nm. Alternativamente, la primera longitud de onda de excitación se encuentra en el rango entre 440 nm y 500 nm y la segunda longitud de onda de excitación se encuentra en el rango entre 373 nm y 433 nm. Preferiblemente, la primera longitud de onda de excitación es aproximadamente de 403 nm y la segunda longitud de onda de excitación es aproximadamente de 470 nm, o bien la primera longitud de onda de excitación es aproximadamente de 470 nm y la segunda longitud de onda de excitación es aproximadamente de 403 nm. Se considera que existe un aumento en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  cuando el cociente entre la intensidad de emisión a 470 nm y la intensidad de emisión a 403 nm aumenta significativamente,

dado los cambios recíprocos que muestra la fluorescencia de GFPuv a 403 nm y 407 en respuesta a cambios en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en el rango de concentraciones fisiológicas. La concentración aumenta significativamente, según se usa en la presente invención, se refiere a aumentos de al menos un 10%, al menos un 20%, al menos un 30%, al menos un 40%, al menos un 50%, al menos un 60%, al menos un 70%, al menos un 80%, al menos un 90%, al menos 2 veces, al menos 3 veces, al menos 4 veces, al menos 5 veces, al menos 6 veces, al menos 7 veces, al menos 8 veces, al menos 9 veces, al menos 10 veces, al menos 100 veces, al menos 1000 veces o más.

La medida de la luminiscencia se puede efectuar por métodos bien conocidos en la técnica. Ejemplos no limitativos de instrumentos adecuados para la detección de luminiscencia incluyen luminómetros, lectores de microplacas y cámaras de CCD. La medida de la fluorescencia se puede efectuar por métodos bien conocidos en la técnica. Ejemplos no limitativos de instrumentos adecuados para la detección de fluorescencia incluyen espectrofluorómetros y lectores de microplacas, microscopios de fluorescencia, escáneres de fluorescencia, incluyendo lectores de microarrays y citómetros de flujo.

El término “alteración en la intensidad de la señal emitida”, según se usa en el sexto método de la invención, se refiere a una variación en la intensidad de la luminiscencia emitida por el primer polipéptido de la proteína de fusión, o alternativamente, a una variación en la intensidad de la fluorescencia emitida por el segundo polipéptido fluorescente de la proteína de fusión. Dicha variación en la intensidad se detecta como una variación en las unidades de luminiscencia o de fluorescencia a un segundo tiempo con respecto del primer tiempo. Puesto que la intensidad de la señal emitida está relacionada con la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, resultará evidente para el experto en la materia que las variaciones en la señal emitida se correlacionan con variaciones en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. Se entiende por variación en la intensidad de la señal un cambio de al menos un 5%, al menos un 10%, al menos un 20%, al menos un 30%, al menos un 40%, al menos un 50%, al menos un 60%, al menos un 70%, al menos un 80%, al menos un 90%, al menos un 100% o más en la intensidad de emisión en el segundo tiempo con respecto al primer tiempo. Dependiendo de la combinación del primer polipéptido y del segundo polipéptido fluorescente en la proteína de fusión, el cambio en la concentración de calcio intracelular puede dar lugar a una variación en la intensidad de la señal emitida en el mismo sentido (un aumento en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular resulta en un aumento en la señal emitida y una disminución en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular resulta en una disminución en la señal emitida) o en sentido opuesto (un aumento en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular resulta en una disminución en la señal emitida y una disminución en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular resulta en un aumento en la señal emitida).

La detección de variaciones en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en una célula o población celular en diferentes tiempos consecutivos permitirá la detección de variaciones en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  a tiempo real.

Métodos de identificación de un compuesto con capacidad de modulación de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en una célula o población celular

La posibilidad de determinar la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en una célula o población celular usando el polipéptido de la invención permite llevar a cabo determinaciones dinámicas de los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  en la célula en presencia de compuestos cuyo efecto sobre la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  se desea estudiar. Así, en otro aspecto, la invención se relaciona con un método de identificación de compuestos con capacidad de modulación de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en una célula o población celular, en adelante “séptimo método de la invención”, que comprende

- (i) poner en contacto un compuesto candidato con una célula o población celular en donde dicha célula o células comprenden el polipéptido de la invención,
- (ii) determinar la luminiscencia emitida por la célula o población celular en respuesta a la puesta en contacto dicho polipéptido con un co-factor específico para dicho polipéptido,

en donde una alteración en la intensidad de luminiscencia determinada en la etapa (ii) con respecto a la intensidad de luminiscencia emitida en ausencia de dicho compuesto candidato es indicativo de que dicho compuesto es capaz de modular la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$ .

En una primera etapa, se pone en contacto un compuesto candidato con una célula o población celular que comprenden la proteína de fusión de la invención, que comprende un primer polipéptido de la invención y un segundo polipéptido fluorescente.

Las expresiones “polipéptido” y “co-factor específico” se han descrito en detalle en el contexto de los polipéptidos de la invención y del primer método de la invención, y se usan de la misma manera en el séptimo método de la invención.

En una realización particular, las células o población celular expresan el polipéptido en un compartimento intracelular u orgánulo específico y la detección de  $\text{Ca}^{2+}$  se realiza en dicho compartimento intracelular u orgánulo específico. Las particularidades del péptido de localización han sido analizadas previamente en relación con el polipéptido de la invención. En una realización preferida, el polipéptido se localiza en el retículo endoplásmico o sarcoplásmico.

En una forma preferida de realización, el polipéptido comprende, desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal, la secuencia señal de calreticulina, el polipéptido de la invención y la secuencia de retención KDEL (SEQ ID NO: 27). En otra forma de realización, la proteína de fusión ha perdido la secuencia señal tras ser traslocado al retículo endoplásmico y comprende, desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal, el polipéptido de la invención y la secuencia de retención KDEL (SEQ ID NO: 27).

En otra forma de preferida de realización, el polipéptido comprende, desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal, el péptido señal de Igy2b, los dominios VDJ y CH1 de la cadena pesada de la inmunoglobulina Igy2b y el polipéptido de la invención. En otra forma de realización, el polipéptido ha perdido la secuencia señal tras ser traslocado al retículo endoplásmico y comprende, desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal, los dominios VDJ y CH1 de la cadena pesada de la inmunoglobulina Igy2b y el polipéptido de la invención.

Por “poner en contacto” una célula con el compuesto candidato se incluye, según la presente invención, cualquier posible forma de llevar el compuesto candidato hasta el interior de la célula. Así, en caso de que el compuesto candidato sea una molécula de bajo peso molecular, es suficiente con añadir dicha molécula al medio de cultivo. En caso de que el compuesto candidato sea una molécula de alto peso molecular (por ejemplo, polímeros biológicos tales como un ácido nucleico o una proteína), es necesario aportar los medios para que esa molécula pueda acceder al interior celular. En caso de que la molécula candidata sea un ácido nucleico, pueden usarse métodos convencionales para transfección, según se ha descrito anteriormente para la introducción de la construcción de ADN. En caso de que el compuesto candidato sea una proteína, la célula puede ponerse en contacto tanto con la proteína directamente como con el ácido nucleico que la codifica acoplado a elementos que permitan su transcripción /traducción una vez que se encuentren en el interior celular. Para ello, se pueden usar cualquiera de los métodos mencionados anteriormente para permitir su entrada al interior celular. Alternativamente, es posible poner en contacto la célula con una variante de la proteína que se desea estudiar que ha sido modificada con un péptido que sea capaz de promover la translocación de la proteína al interior celular, tales como el péptido Tat derivado de la proteína TAT de HIV-1, la tercera hélice del homeodominio de la proteína Antennapedia de *D. melanogaster*, la proteína VP22 del virus del herpes simplex y oligómeros de arginina (Lindgren, A. et al., 2000, *Trends Pharmacol. Sci.*, 21:99-103, Schwarze, S.R. et al., 2000, *Trends Pharmacol. Sci.*, 21:45-48, Lundberg, M et al., 2003, *Mol. Therapy* 8:143-150 y Snyder, E.L. y Dowdy, S.F., 2004, *Pharm. Res.* 21:389-393).

Compuestos adecuados para ser ensayados de acuerdo al tercer método de la invención incluyen, sin limitación, a cualquier biblioteca de fármacos (*small molecules*) derivados de fuentes naturales y sintéticas, molécula orgánica pequeña (excluyendo péptidos y ácidos nucleicos), molécula inorgánica pequeña, péptido, peptoide, peptidomimético, polipéptido (por ejemplo, neurotransmisor, receptor), oligonucleótido (por ejemplo, siARN, ARN antisentido, aptámero), gas y similares.

El compuesto que va someterse a ensayo preferiblemente no está aislado sino que forma parte de una mezcla más o menos compleja derivada de una fuente natural o que forma parte de una biblioteca de compuestos. Ejemplos de bibliotecas de compuestos que pueden someterse a ensayo según el método de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, bibliotecas de péptidos que incluyen tanto péptidos como análogos de péptidos que comprenden D-aminoácidos o péptidos que comprenden enlaces no peptídicos, bibliotecas de ácidos nucleicos que incluyen ácidos nucleicos con enlaces de tipo fosfotioato no fosfodiéster o ácidos peptidonucleicos, bibliotecas de anticuerpos, de hidratos de carbono, de compuestos con un bajo peso molecular, preferiblemente moléculas orgánicas, de peptidomiméticos y similares. En el caso de que se use una biblioteca de compuestos orgánicos con un bajo peso molecular, la biblioteca puede haberse preseleccionado de modo que contenga compuestos que pueden administrarse fácilmente en la proximidad de las áreas que experimentan degeneración. Los compuestos pueden seleccionarse así basándose en ciertos parámetros tales como el tamaño, la lipofilidad, la hidrofiliidad o la capacidad para formar enlaces de hidrógeno. Los compuestos que van a someterse a ensayo pueden formar parte

alternativamente de un extracto obtenido de una fuente natural. La fuente natural puede ser una fuente animal, vegetal obtenida de cualquier medio, incluyendo, pero sin limitarse a extractos de organismos de tierra, de aire, marinos y similares.

La puesta en contacto se lleva a cabo de forma que el compuesto pueda acceder al interior celular. En el caso de que se desee identificar compuestos que sean capaces de modular de forma específica la de  $\text{Ca}^{2+}$  en un determinado compartimento intracelular, la etapa (i) de puesta en contacto del compuesto candidato con la célula o población celular se lleva a cabo usando células o una población celular en la que la proteína de fusión se exprese en dicho compartimento intracelular y en condiciones adecuadas para que dicho compuesto pueda acceder a dicho compartimento.

En una segunda etapa, se determina la luminiscencia emitida por la célula o población celular a una longitud de onda correspondiente a la longitud de onda de emisión del polipéptido, en donde una alteración en la intensidad de luminiscencia con respecto a la intensidad de luminiscencia emitida en ausencia de dicho compuesto candidato es indicativo de que dicho compuesto es capaz de modular la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$ .

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método de identificación de un compuesto con capacidad de modulación de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en una célula o población celular, en adelante “octavo método de la invención”, que comprende

- (i) poner en contacto un compuesto candidato con una célula o población celular en donde dicha célula o células comprenden la proteína de fusión de la invención, que comprende un primer polipéptido de la invención y un segundo polipéptido fluorescente,
- (ii) determinar la luminiscencia emitida por la célula o población celular en respuesta a la puesta en contacto dicha proteína de fusión con un co-factor específico para dicho primer polipéptido,

o alternativamente

determinar la fluorescencia emitida por la célula o población celular en respuesta a una excitación de dicha célula o población a una longitud de onda correspondiente a la longitud de onda de excitación de dicho segundo polipéptido,

en donde una alteración en la intensidad de luminiscencia o fluorescencia determinada en la etapa (ii) con respecto a la intensidad de fluorescencia emitida en ausencia de dicho compuesto candidato es indicativo de que dicho compuesto es capaz de modular la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$ .

En una primera etapa, se pone en contacto un compuesto candidato con una célula o población celular que comprenden la proteína de fusión de la invención, que comprende un primer polipéptido de la invención y un segundo polipéptido fluorescente.

Las expresiones “proteína de fusión”, “polipéptido” y “polipéptido fluorescente” se han descrito en detalle en el contexto de las proteínas de fusión de la invención y se usan de la misma manera en los métodos de la invención.

En una realización particular, las células o población celular expresan la proteína de fusión en un compartimento intracelular u orgánulo específico y la detección de  $\text{Ca}^{2+}$  se realiza en dicho compartimento intracelular u orgánulo específico. Las particularidades del péptido de localización han sido analizadas previamente en relación con la proteína de fusión de la invención. En una realización preferida, la proteína de fusión se localiza en el retículo endoplásmico o sarcoplásmico.

En una forma preferida de realización, la proteína de fusión comprende, desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal, la secuencia señal de calreticulina, el polipéptido de la invención, el enlazador de secuencia SEQ ID NO: 42, GFPuv (SEQ ID NO: 33) y la secuencia de retención KDEL (SEQ ID NO: 27). En otra forma de realización, la proteína de fusión ha perdido la secuencia señal tras ser traslocada al retículo endoplásmico y comprende, desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal, el polipéptido de la invención, el enlazador de secuencia SEQ ID NO: 42, GFPuv (SEQ ID NO: 33) y la secuencia de retención KDEL (SEQ ID NO: 27).

En una forma preferida de realización, la proteína de fusión comprende, desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal, la secuencia señal de calreticulina, el polipéptido de la invención, el enlazador de secuencia SEQ ID NO: 42, una variante de GFPuv (SEQ ID NO: 33) en donde el aminoácido en posición 15 es Gln, el aminoácido en posición 167 es Val, el aminoácido en posición 175 es Gly, y el aminoácido en posición 180 es Tyr, y la secuencia de retención KDEL (SEQ ID NO: 27). En otra forma de realización, la proteína de fusión ha perdido la secuencia señal tras ser traslocada al retículo endoplásmico y comprende, desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal, el polipéptido de la invención, el enlazador de secuencia SEQ ID NO: 42, una variante de GFPuv (SEQ ID NO: 33) en donde el aminoácido en posición 15 es Gln, el aminoácido en posición 167 es Val, el aminoácido en posición 175 es Gly, y el aminoácido en posición 180 es Tyr, y la secuencia de retención KDEL (SEQ ID NO: 27).

En una forma preferida de realización, la proteína de fusión comprende, desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal, la secuencia señal de calreticulina, el polipéptido de la invención, el enlazador de secuencia SEQ ID NO: 42, una variante de GFPuv (SEQ ID NO: 33) en donde el aminoácido en posición 15 es Gln, el aminoácido en posición 167 es Val, el aminoácido en posición 175 es Gly, el aminoácido en posición 180 es Tyr, y el aminoácido en posición 153 es Lys, y la secuencia de retención KDEL (SEQ ID NO: 27). En otra forma de realización, la proteína de fusión ha perdido la secuencia señal tras ser traslocada al retículo endoplásmico y comprende, desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal, el polipéptido de la invención, el enlazador de secuencia SEQ ID NO: 42, una variante de GFPuv (SEQ ID NO: 33) en donde el aminoácido en posición 15 es Gln, el aminoácido en posición 167 es Val, el aminoácido en posición 175 es Gly, y aminoácido en posición 180 es Tyr, y el aminoácido en posición 153 es Lys, y la secuencia de retención KDEL (SEQ ID NO: 27).

En otra forma de preferida de realización, la invención se refiere a una proteína de fusión comprende, desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal, el péptido señal de Igy2b, los dominios VDJ y CH1 de la cadena pesada de la inmunoglobulina Igy2b, el

polipéptido de la invención, el enlazador de secuencia SEQ ID NO: 42, GFPuv (SEQ ID NO: 33). En otra forma de realización, la proteína de fusión ha perdido la secuencia señal tras ser traslocada al retículo endoplásmico y comprende, desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal, los dominios VDJ y CH1 de la cadena pesada de la inmunoglobulina Iγ2b, el polipéptido de la invención, el enlazador de secuencia SEQ ID NO: 42, GFPuv (SEQ ID NO: 33).

En una forma preferida de realización, la proteína de fusión comprende, desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal, la secuencia señal de calreticulina, el polipéptido de la invención, el enlazador de secuencia SEQ ID NO: 42, una variante de GFPuv (SEQ ID NO: 33) en donde el aminoácido en posición 15 es Gln, el aminoácido en posición 167 es Val, el aminoácido en posición 175 es Gly, y el aminoácido en posición 180 es Tyr, y la secuencia de retención KDEL (SEQ ID NO: 27). En otra forma de realización, la proteína de fusión ha perdido la secuencia señal tras ser traslocada al retículo endoplásmico y comprende, desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal, el polipéptido de la invención, el enlazador de secuencia SEQ ID NO: 42, una variante de GFPuv (SEQ ID NO: 33) en donde el aminoácido en posición 15 es Gln, el aminoácido en posición 167 es Val, el aminoácido en posición 175 es Gly, y el aminoácido en posición 180 es Tyr, y la secuencia de retención KDEL (SEQ ID NO: 27).

En una forma preferida de realización, la proteína de fusión comprende, desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal, la secuencia señal de calreticulina, el polipéptido de la invención, el enlazador de secuencia SEQ ID NO: 42, una variante de GFPuv (SEQ ID NO: 33) en donde el aminoácido en posición 15 es Gln, el aminoácido en posición 167 es Val, el aminoácido en posición 175 es Gly, el aminoácido en posición 180 es Tyr, y el aminoácido en posición 153 es Lys, y la secuencia de retención KDEL (SEQ ID NO: 27). En otra forma de realización, la proteína de fusión ha perdido la secuencia señal tras ser traslocada al retículo endoplásmico y comprende, desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal, el polipéptido de la invención, el enlazador de secuencia SEQ ID NO: 42, una variante de GFPuv (SEQ ID NO: 33) en donde el aminoácido en posición 15 es Gln, el aminoácido en posición 167 es Val, el aminoácido en posición 175 es Gly, y aminoácido en posición 180 es Tyr, y el aminoácido en posición 153 es Lys, y la secuencia de retención KDEL (SEQ ID NO: 27).

En una forma preferida de realización, la célula o población celular comprenden una proteína de fusión que comprende, desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal, el polipéptido de la invención, el enlazador de secuencia SEQ ID NO: 42, GFPuv (SEQ ID NO: 33) y la secuencia de retención KDEL (SEQ ID NO: 27). En otra forma preferida de realización, la célula o población celular comprenden una proteína de fusión que comprende, desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal, los dominios VDJ y CH1 de la cadena pesada de la inmunoglobulina Iγ2b, el polipéptido de la invención, el enlazador de secuencia SEQ ID NO: 42 y GFPuv (SEQ ID NO: 33).

En una forma preferida de realización, la célula o población celular comprenden una proteína de fusión que comprende, desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal, el polipéptido de la invención, el enlazador de secuencia SEQ ID NO: 42, una variante

de GFPuv (SEQ ID NO: 33) en donde el aminoácido en posición 15 es Gln, el aminoácido en posición 167 es Val, el aminoácido en posición 175 es Gly, y el aminoácido en posición 180 es Tyr, y la secuencia de retención KDEL (SEQ ID NO: 27). En otra forma preferida de realización, la célula o población celular comprenden una proteína de fusión que comprende, desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal, los dominios VDJ y CH1 de la cadena pesada de la inmunoglobulina Iγ2b, el polipéptido de la invención, el enlazador de secuencia SEQ ID NO: 42 y una variante de GFPuv (SEQ ID NO: 33) en donde el aminoácido en posición 15 es Gln, el aminoácido en posición 167 es Val, el aminoácido en posición 175 es Gly, y el aminoácido en posición 180 es Tyr.

En una forma preferida de realización, la célula o población celular comprenden una proteína de fusión que comprende, desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal, el polipéptido de la invención, el enlazador de secuencia SEQ ID NO: 42, una variante de GFPuv (SEQ ID NO: 33) en donde el aminoácido en posición 15 es Gln, el aminoácido en posición 167 es Val, el aminoácido en posición 175 es Gly, el aminoácido en posición 180 es Tyr, y el aminoácido en posición 153 es Lys, y la secuencia de retención KDEL (SEQ ID NO: 27). En otra forma preferida de realización, la célula o población celular comprenden una proteína de fusión que comprende, desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal, los dominios VDJ y CH1 de la cadena pesada de la inmunoglobulina Iγ2b, el polipéptido de la invención, el enlazador de secuencia SEQ ID NO: 42 y una variante de GFPuv (SEQ ID NO: 33) en donde el aminoácido en posición 15 es Gln, el aminoácido en posición 167 es Val, el aminoácido en posición 175 es Gly, el aminoácido en posición 180 es Tyr, y el aminoácido en posición 153 es Lys.

En una forma preferida de realización, la proteína de fusión comprende, desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal, la secuencia señal de calreticulina, GFPuv (SEQ ID NO: 33), el enlazador de secuencia SEQ ID NO: 42, el polipéptido de la invención, y la secuencia de retención KDEL (SEQ ID NO: 27). En otra forma de realización, la proteína de fusión ha perdido la secuencia señal tras ser traslocada al retículo endoplásmico y comprende, desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal, GFPuv (SEQ ID NO: 33), el enlazador de secuencia SEQ ID NO: 42, el polipéptido de la invención, y la secuencia de retención KDEL (SEQ ID NO: 27).

En una forma preferida de realización, la proteína de fusión comprende, desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal, la secuencia señal de calreticulina, una variante de GFPuv (SEQ ID NO: 33) en donde el aminoácido en posición 15 es Gln, el aminoácido en posición 167 es Val, el aminoácido en posición 175 es Gly, y el aminoácido en posición 180 es Tyr, el enlazador de secuencia SEQ ID NO: 42, el polipéptido de la invención, y la secuencia de retención KDEL (SEQ ID NO: 27). En otra forma de realización, la proteína de fusión ha perdido la secuencia señal tras ser traslocada al retículo endoplásmico y comprende, desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal, una variante de GFPuv (SEQ ID NO: 33) en donde el aminoácido en posición 15 es Gln, el aminoácido en posición 167 es Val, el aminoácido en posición 175 es Gly, y el aminoácido en posición 180 es Tyr, el enlazador de secuencia SEQ ID NO: 42, el polipéptido de la invención, y la secuencia de retención KDEL (SEQ ID NO: 27).

En una forma preferida de realización, la proteína de fusión comprende, desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal, la secuencia señal de calreticulina, una variante de GFPuv (SEQ ID NO: 33) en donde el aminoácido en posición 15 es Gln, el aminoácido en posición 167 es Val, el aminoácido en posición 175 es Gly, el aminoácido en posición 180 es Tyr, y el aminoácido en posición 153 es Lys, el enlazador de secuencia SEQ ID NO: 42, el polipéptido de la invención, y la secuencia de retención KDEL (SEQ ID NO: 27). En otra forma de realización, la proteína de fusión ha perdido la secuencia señal tras ser traslocada al retículo endoplásmico y comprende, desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal, una variante de GFPuv (SEQ ID NO: 33) en donde el aminoácido en posición 15 es Gln, el aminoácido en posición 167 es Val, el aminoácido en posición 175 es Gly, y aminoácido en posición 180 es Tyr, y el aminoácido en posición 153 es Lys, el enlazador de secuencia SEQ ID NO: 42, el polipéptido de la invención, y la secuencia de retención KDEL (SEQ ID NO: 27).

En otra forma de preferida de realización, la invención se refiere a una proteína de fusión comprende, desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal, el péptido señal de Igy2b, los dominios VDJ y CH1 de la cadena pesada de la inmunoglobulina Igy2b, GFPuv (SEQ ID NO: 33), el enlazador de secuencia SEQ ID NO: 42, y el polipéptido de la invención. En otra forma de realización, la proteína de fusión ha perdido la secuencia señal tras ser traslocada al retículo endoplásmico y comprende, desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal, los dominios VDJ y CH1 de la cadena pesada de la inmunoglobulina Igy2b, GFPuv (SEQ ID NO: 33), el enlazador de secuencia SEQ ID NO: 42, y el polipéptido de la invención.

En una forma preferida de realización, la proteína de fusión comprende, desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal, la secuencia señal de calreticulina, una variante de GFPuv (SEQ ID NO: 33) en donde el aminoácido en posición 15 es Gln, el aminoácido en posición 167 es Val, el aminoácido en posición 175 es Gly, y el aminoácido en posición 180 es Tyr, el enlazador de secuencia SEQ ID NO: 42, el polipéptido de la invención y la secuencia de retención KDEL (SEQ ID NO: 27). En otra forma de realización, la proteína de fusión ha perdido la secuencia señal tras ser traslocada al retículo endoplásmico y comprende, desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal, una variante de GFPuv (SEQ ID NO: 33) en donde el aminoácido en posición 15 es Gln, el aminoácido en posición 167 es Val, el aminoácido en posición 175 es Gly, y el aminoácido en posición 180 es Tyr, el enlazador de secuencia SEQ ID NO: 42, el polipéptido de la invención, y la secuencia de retención KDEL (SEQ ID NO: 27).

En una forma preferida de realización, la proteína de fusión comprende, desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal, la secuencia señal de calreticulina, una variante de GFPuv (SEQ ID NO: 33) en donde el aminoácido en posición 15 es Gln, el aminoácido en posición 167 es Val, el aminoácido en posición 175 es Gly, el aminoácido en posición 180 es Tyr, y el aminoácido en posición 153 es Lys, el enlazador de secuencia SEQ ID NO: 42, el polipéptido de la invención, y la secuencia de retención KDEL (SEQ ID NO: 27). En otra forma de realización, la proteína de fusión ha perdido la secuencia señal tras ser traslocada al retículo endoplásmico y

comprende, desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal, una variante de GFPuv (SEQ ID NO: 33) en donde el aminoácido en posición 15 es Gln, el aminoácido en posición 167 es Val, el aminoácido en posición 175 es Gly, y aminoácido en posición 180 es Tyr, y el aminoácido en posición 153 es Lys, el enlazador de secuencia SEQ ID NO: 42, el polipéptido de la invención, y la secuencia de retención KDEL (SEQ ID NO: 27).

En una forma preferida de realización, la célula o población celular comprenden una proteína de fusión que comprende, desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal, GFPuv (SEQ ID NO: 33), el polipéptido de la invención, el enlazador de secuencia SEQ ID NO: 42, y la secuencia de retención KDEL (SEQ ID NO: 27). En otra forma preferida de realización, la célula o población celular comprenden una proteína de fusión que comprende, desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal, los dominios VDJ y CH1 de la cadena pesada de la inmunoglobulina Igy2b, GFPuv (SEQ ID NO: 33), el enlazador de secuencia SEQ ID NO: 42 y el polipéptido de la invención.

En una forma preferida de realización, la célula o población celular comprenden una proteína de fusión que comprende, desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal, una variante de GFPuv (SEQ ID NO: 33) en donde el aminoácido en posición 15 es Gln, el aminoácido en posición 167 es Val, el aminoácido en posición 175 es Gly, y el aminoácido en posición 180 es Tyr, el enlazador de secuencia SEQ ID NO: 42, el polipéptido de la invención, y la secuencia de retención KDEL (SEQ ID NO: 27). En otra forma preferida de realización, la célula o población celular comprenden una proteína de fusión que comprende, desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal, los dominios VDJ y CH1 de la cadena pesada de la inmunoglobulina Igy2b, una variante de GFPuv (SEQ ID NO: 33) en donde el aminoácido en posición 15 es Gln, el aminoácido en posición 167 es Val, el aminoácido en posición 175 es Gly, y el aminoácido en posición 180 es Tyr el enlazador de secuencia SEQ ID NO: 42 y el polipéptido de la invención.

En una forma preferida de realización, la célula o población celular comprenden una proteína de fusión que comprende, desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal, una variante de GFPuv (SEQ ID NO: 33) en donde el aminoácido en posición 15 es Gln, el aminoácido en posición 167 es Val, el aminoácido en posición 175 es Gly, el aminoácido en posición 180 es Tyr, y el aminoácido en posición 153 es Lys, el enlazador de secuencia SEQ ID NO: 42, el polipéptido de la invención, y la secuencia de retención KDEL (SEQ ID NO: 27). En otra forma preferida de realización, la célula o población celular comprenden una proteína de fusión que comprende, desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal, los dominios VDJ y CH1 de la cadena pesada de la inmunoglobulina Igy2b, una variante de GFPuv (SEQ ID NO: 33) en donde el aminoácido en posición 15 es Gln, el aminoácido en posición 167 es Val, el aminoácido en posición 175 es Gly, el aminoácido en posición 180 es Tyr, y el aminoácido en posición 153 es Lys, el enlazador de secuencia SEQ ID NO: 42 y el polipéptido de la invención.

Los términos “poner en contacto una célula con el compuesto candidato” y compuesto candidato” se han descrito en detalle en el contexto del séptimo método de la invención y se usan de la misma manera en el octavo método de la invención.

En una segunda etapa, se determina la luminiscencia emitida por la célula o población celular a una longitud de onda correspondiente a la longitud de onda de emisión del primer polipéptido, en donde una alteración en la intensidad de luminiscencia con respecto a la intensidad de luminiscencia emitida en ausencia de dicho compuesto candidato es indicativo de que dicho compuesto es capaz de modular la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$ . Alternativamente, la fluorescencia emitida por la célula o población celular en respuesta a una excitación de dicha célula o población a una longitud de onda correspondiente a la longitud de onda de excitación de dicho segundo polipéptido fluorescente, en donde una alteración en la intensidad de fluorescencia con respecto a la intensidad de fluorescencia emitida en ausencia de dicho compuesto candidato es indicativo de que dicho compuesto es capaz de modular la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$ .

\*\*\*

La invención se describe en detalle a continuación por medio de los siguientes ejemplos, que han de interpretarse como meramente ilustrativos y no limitativos del alcance de la invención.

## **EJEMPLOS**

### **Materiales y métodos**

#### **Mutagénesis**

El ensayo de mutagénesis dirigida se realizó con el kit QuickChange II XL (Agilent Technologies, #200522-5) sobre el plásmido que contenía el gen de GAP dirigido al RE mediante la fusión al gen de la cadena pesada de la Ig- $\gamma$ -2b (pcDNA3.Ig.GAPwt). Una vez obtenidas las mutaciones en el plásmido eucariota, se procedió a intercambiar para cada mutante el fragmento XhoI obtenido por digestión del vector pcDNA3 en el plásmido receptor procariota pET28a.GAPwt, previamente digerido con XhoI. Este fragmento lleva una porción de la GFP, el péptido enlazante y todo el gen de la acuorina. Esto se realizó con técnicas básicas de biología molecular.

#### **Inducción y extracción de GAP 2.2 en bacterias**

Se transformó el plásmido pET28a.GAP1.2 en la cepa de *Escherichia coli* BL21. Se creció un minicultivo en LB con kanamicina 40  $\mu\text{g/ml}$  durante 8h a 37 °C, 250 rpm; al día siguiente se diluyó este cultivo 50 veces en 200 ml de LB con 40  $\mu\text{g/ml}$  kanamicina a 250 rpm y 37 °C, y se deja crecer 2 h aproximadamente, hasta que la  $\text{OD}_{600}$  esté entre 0,6 y 1. Se induce la producción de la proteína añadiendo entre 0,5 y 1 mM isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG), y agita el cultivo durante 6 h, 25 °C y 250 rpm. Para extraer la proteína se centrifuga el cultivo de bacterias 10 min a 6000 x g y 4 °C, se elimina el sobrenadante y se añade al precipitado un décimo del volumen (respecto del cultivo bacteriano) de tampón de sonicación (Tris pH 8,8 50 mM, NaCl 250 mM, EDTA 50 mM, DTT 2 mM). Se sonica durante 1 min con una potencia del 40 % con el sonicador Vibra cell 75115 (Bioblock Scientific). Se centrifuga 5 min a 30000 x g, 4 °C para obtener la fracción soluble y la fracción insoluble de las bacterias. En la fracción soluble hay un porcentaje minoritario de GAP 2.2, que además es insensible a  $\text{Ca}^{2+}$ , así

que esta fracción se descarta. En la fracción insoluble está la mayoría de la proteína GAP 2.2 en los cuerpos de inclusión, de los que se extrae resuspendiendo el pellet en un volumen 1/25 (respecto del cultivo bacteriano) con solución de extracción (Tris 50 mM, pH 8,8, Urea 8M, DTT 5 mM). Se deja agitando durante la noche a 4 °C. La proteína se renaturaliza mediante una diálisis con una membrana SnakeSkin Pleaterd Dialysis Tubing 3500 MWCO (Thermo Scientific, #68035) contra una solución de renaturalización (Tris pH 8,8 50 mM, CaCl<sub>2</sub> 1 mM); se dializa durante 24h. Al día siguiente se centrifuga 5 min a 30.000 x g, a 4 °C la fracción dializada para eliminar los restos bacterianos, y se le añade DTT 5 mM y EDTA 10 mM.

#### Análisis de la sensibilidad a calcio de los mutantes

En una placa de 96 pocillos (Nunclon Surface, 167008) se añaden 200 µl de PBS y 1 µl de proteína (en el rango de 3.5 µg para cada variante) con 3 concentraciones de calcio: 0 (con 100 µM EGTA), 1 mM y 100 µM. La fluorescencia se midió en el lector de placas TECAN Genios Pro Basic WO FP (16129935), con filtros de 390 nm y 485 nm para la excitación, y 535 nm para la emisión. Se calculó el cociente entre las fluorescencias a cada longitud de onda  $(F_{485}/F_{390})_{Ca^{2+}}/(F_{485}/F_{390})_{EGTA}$  para cada una de las dos concentraciones de calcio. Finalmente, se dividió el cociente obtenido para CaCl<sub>2</sub> 1 mM entre el de CaCl<sub>2</sub> 100 µM.

#### Purificación de GAP 2.2

El plásmido pET28a contiene en fase con la proteína GAP 2.2 un péptido de 6 histidinas. La proteína se purificó con las bolas de Ni<sup>2+</sup> Sepharose High Performance (GE Healthcare, 17-5268-01). Las bolas se lavan tres veces con agua y tres veces con tampón de unión (50 mM Tris pH 8,8, 300 mM NaCl, 10 mM imidazol). Se añaden 200 µl de proteína GAP 2.2 extraída y tampón de unión en exceso. Se lava dos veces con tampón de unión, y dos veces con tampón de lavado (50 mM Tris pH 8,8, 300 mM NaCl, 40 mM imidazol) que eluye las proteínas adheridas con menos afinidad al Ni<sup>2+</sup>. La proteína GAP 2.2 se eluyó con buffer de elución (50 mM Tris pH 8,8, 300 mM NaCl, 100 mM imidazol).

#### Electroforesis en gel de poliacrilamida

En un gel de 12% poliacrilamida se cargan 8.5 µg de proteína extraída de la bacteria, y 8.5 µg de proteína purificada con Ni<sup>2+</sup>-Beads, junto con el marcador de peso molecular Precision Plus Protein All Blue Standards (BioRads, #161-0373). Las proteínas se separan mediante electroforesis vertical a 180 V y 50 mA, y se visualizan tras teñir el gel con azul brillante de Coomassie R-250 durante 15 min, y desteñir con una solución de metanol 25% y acetona 10% (v/v).

#### Espectros de fluorescencia

El espectro de fluorescencia de excitación y emisión se realizó con el fluorímetro Fluorescence Spectrophotometer 650-105 (HITACHI), con una lámpara de xenon. En la cubeta se añadió 1 ml de medio MOPS 20 mM, KCl 150 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM y 8.5 µg de la proteína GAP 2.2. El espectro de excitación se midió entre 380 nm y 500 nm, con la emisión fijada a 520 nm. Para los espectros de emisión se midió entre 480 nm y 600 nm, fijando la excitación a 405 nm.

#### Titulación de la unión a Ca<sup>2+</sup> de GAP2.2 *in vitro*

Sobre una placa de 96 pocillos (Nunc Surface, 167008), se añade en cada pocillo 200  $\mu$ l de medio MOPS 20 mM, KCl 150 mM,  $MgCl_2$  1 mM se añade 3.5  $\mu$ g GAP 2.2 (volúmenes aproximados a 1  $\mu$ l para cada extracto) extraída de las bacterias, y EGTA 100 $\mu$ M ( $Ca^{2+}$  0), no adiciones ( $Ca^{2+}$  nominal, 20  $\mu$ M aproximadamente), 50  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, 200  $\mu$ M, 500  $\mu$ M, 1 mM, 2 mM, 5 mM, 10 mM y 50 mM. Cada condición se realiza por triplicado. La fluorescencia se leyó en el lector de placas TECAN Genios Pro Basic WO FP (16129935), con filtros de 390 nm y 485 nm para la excitación, y 535 nm para la emisión.

#### Expresión en células de mamífero

Las células HeLa (CCL-2) se mantuvieron en DMEM (Invitrogen) suplementado con 10% de suero fetal bovino, 2mM L-glutamina, 100  $\mu$ g/ml estreptomicina, 100 U/ml penicilina. En los experimentos de imagen se sembraron  $3 \times 10^4$  células en cubreobjetos de 12 mm tratados con poli-L-lisina y se transfectaron con 0.5 $\mu$ g de las distintas construcciones en pcDNA3 mediante el uso de Lipofectamina 2000 (Invitrogen). La línea estable de HeLa que expresaba GAP 2.2 se obtuvo por transfección con el plásmido pcDNA3-crGAP2.2 y los clones resistentes se seleccionaron con 0.8 mg/ml de G-418. Durante el periodo de selección las células se sometieron a dos rondas de citometría de flujo (*cell sorting*) para seleccionar las células más fluorescentes. Estas células se amplificaron (clon pool) y se seleccionaron 5 clones individuales estables procedentes de célula única por dilución limitada. La dosis de mantenimiento del antibiótico fue de 0.1 mg/ml G-418.

#### Medidas de la $[Ca^{2+}]_{RE}$ en célula única

La fluorescencia de la GFP se registró en un microscopio invertido Nikon Diaphot con un objetivo 20X (Olimpus). Las soluciones se aplicaron por perfusión continua a 2-3 ml/min. La fluorescencia de GAP se monitorizó a dos longitudes de onda usando los filtros 403DF y 485DF controlados por una rueda de filtros y un espejo dicróico. La luz emitida a partir de 520 nm se recogió usando una cámara ISIS-M (Photonic Science). Las imágenes se analizaron usando el procesador Applied Imaging Magical (Sunderland, Tyne and Wear, UK). El tratamiento de las imágenes consistió en la substracción del fondo (background) y el cociente entre las dos fluorescencias pixel a pixel usando el programa Image J. En los experimentos en los que se combinó GAP con Fura-2, los filtros utilizados fueron 340, 380 (para Fura-2) y 485 (para GuvA).

### **Resultados**

El sensor de  $Ca^{2+}$  generado por los inventores de la presente invención, denominado GAP (*GFP Aequorin Protein*), podría englobarse dentro del grupo de los pericanes, ya que consiste en una proteína de fusión formada por la GFPuv (caracterizada por tener dos picos de excitación a 405 nm y 470 nm) y la acuorina, unidas por un péptido flexible que facilita la interacción entre las dos proteínas. La sensibilidad al  $Ca^{2+}$  la aporta la acuorina, que al unirse a este ión, provoca un cambio de conformación en el cromóforo de la GFPuv, de manera que en presencia de  $Ca^{2+}$  disminuye el pico de excitación a 405 nm y aumenta el de 470 nm respecto a su espectro en ausencia de  $Ca^{2+}$ . La afinidad de esta sonda por el  $Ca^{2+}$  es muy alta ( $K_d = 10^{-6}$  M), de modo que es válida para el estudio de la homeostasis del  $Ca^{2+}$  en el citosol o la mitocondria, pero no

organelas con alto contenido de  $\text{Ca}^{2+}$ , como el RE, el complejo de Golgi o la vesícula de secreción.

#### Diseño y análisis de los mutantes de GAP

Con la intención de generar un sensor fluorescente idóneo para medir el calcio en las organelas de alto contenido de calcio, en primer lugar debe reducirse la afinidad de la proteína por el calcio. La proteína de partida era GAP con la mutación D119A que ya tenía reducida su afinidad por  $\text{Ca}^{2+}$ . El Asp 119 es un residuo esencial para la coordinación con el  $\text{Ca}^{2+}$  en la segunda mano EF de la acuorina, y su sustitución por Ala reduce la afinidad del complejo acuorina-celenterazina unas 20 veces en un ensayo de bioluminiscencia (Kendall et al. 1992). Aunque esta reducción en la afinidad no es suficiente para poder medir los elevados niveles del  $\text{Ca}^{2+}$  en el RE, su uso combinado con un análogo estructural de la celenterazina de menor afinidad, llamado celenterazina n, reduce la afinidad del complejo por el  $\text{Ca}^{2+}$  (Barrero et al., 1997, J Biol Chem 272:27694-99). El objetivo era encontrar una mutante que redujera la afinidad por calcio en al menos un orden de magnitud más, y que mantuviera las propiedades fluorescentes de la GFP. Con este fin se diseñó, en primer lugar, una pequeña librería de 20 mutaciones de GAP partiendo de la mutación D119A.

En la Tabla 2 se ilustra la composición aminoacídica de los 3 lazos (*loops*) de la acuorina que enlazan las hélices E y F, denominadas así por la parvalbúmina, la primera proteína en la que se descubrió el dominio funcional del motivo mano EF (motivo de la familia de los hélice-lazo-hélice). El lazo entre las dos hélices está formado por un segmento de 12 residuos, aunque los extremos pertenecen ya a las hélices. La cadena principal y las cadenas laterales de estos lazos participan en puentes de H y están altamente conservadas dentro de la familia con manos EF. En un lazo de una mano EF el ión  $\text{Ca}^{2+}$  está coordinado por siete ligandos de oxígeno en una configuración pentagonal bipyramidal. En general, cinco de estos oxígenos los aportan las cadenas laterales, uno el carbonil de la cadena principal y el último, el agua. En rojo se ha señalado la posición ocupada por el residuo D119 y en azul las posiciones de los residuos que se han mutado. En general se han elegido posiciones ocupadas por los residuos que participan directamente en la esfera de coordinación del  $\text{Ca}^{2+}$ , es decir, las posiciones consensuadas como X, Y, Z, -Y, -X y -Z en todas las proteínas con manos EF. Por ejemplo, la posición X está ocupada por un Asp, que está muy conservado en los 3 lazos. Por esto, se eligieron los Asp en las posiciones 24 (mutaciones 1, 2 y 3), 117 (mutaciones 9 y 10) y 153 (mutación 16) como candidatos en nuestro estudio. De forma análoga, en la posición -Z siempre se encuentra un Glu y, por tanto, también se seleccionó para otra nueva serie de mutaciones (mutaciones 7, 9, 10, 14, 15 y 22). Se procuró realizar las sustituciones de estos aminoácidos ácidos (Asp y Glu) a sus correspondientes amidas (Asn y Gln) porque así sólo se altera la carga, y se conserva el tamaño global del residuo; adicionalmente se incluyeron algunas sustituciones menos conservadoras a aminoácidos hidrofóbicos. Aunque no pertenece estrictamente al lazo EF, también forma parte de la hélice colindante la Tyr 38, que también se ha incluido en el estudio de mutagénesis. Por último, también se añadieron 2 mutaciones simples donde el Asp 119 se mutó a otro aminoácido distinto de Ala, concretamente a Lys y a Ile. Al contrario de la calmodulina, donde se ha estudiado exhaustivamente la relación estructura-función, se encuentran pocas referencias a la acuorina donde se hayan mutado residuos de los sitios de unión a  $\text{Ca}^{2+}$  con intención de reducir su afinidad.

Las reacciones de mutagénesis dirigida se realizaron en el plásmido de expresión eucariota pcDNA3 y se verificaron por secuenciación. Posteriormente las construcciones positivas se subclonaron en el vector de expresión bacteriano pET28 generando una fusión en fase con el péptido de seis Histidinas para facilitar su expresión en *E. coli* y su purificación proteica. El ensayo de análisis de los mutantes se realizó expresándolos en la cepa bacteriana BL-21. Para ello se adaptó el protocolo de inducción, extracción y purificación proteica para procesar todas las muestras simultáneamente. La inducción proteica hizo que la proteína se expresara mayoritariamente de forma insoluble en los cuerpos de inclusión bacterianos, y, en menor medida en el citosol. Se hicieron experimentos para comprobar si la proteína soluble era funcional, y como el resultado fue negativo, hubo que extraer la proteína insoluble mediante desnaturalización con urea seguida de renaturalización por diálisis. Por último se concentró el extracto soluble y se cuantificó la concentración proteica.

	X	Y	Z	-Y	-X		-Z					
	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35
EF1:	D	V	N	H	N	G	K	I	S	L	D	E
	117	118	119	120	121	122	123	124	125	126	127	128
EF2:	D	K	D	Q	N	G	A	I	T	L	D	E
	153	154	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164
EF3:	D	I	D	E	S	G	Q	L	D	V	D	E

Tabla 2: Secuencias aminoacídicas de los tres sitios funcionales de unión al Ca<sup>2+</sup> en la aequorina. Los residuos que conforman el enlace de coordinación con el Ca<sup>2+</sup> se designan X, Y, Z, -Y y -Z. Los números representan las posiciones en la secuencia primaria de la aequorina. En gris se representan los residuos adicionales que se han mutado.

El ensayo propiamente dicho se diseñó de tal modo que el posible candidato sufriera cambios de fluorescencia sensibles a cambios de calcio entre 0.1 y 1 mM. De esta forma, no se detectarían pequeños cambios de afinidad en el rango de decenas de micromolar, insuficientes para medir en organelas de alto contenido de Ca<sup>2+</sup>. El ensayo se puso a punto para este estudio en el lector de fluorescencia en placas de 96 pocillos, leyendo la fluorescencia para cada uno de los mutantes por triplicado a 390 y 485 nm de excitación, las dos longitudes de onda cercanas a los máximos de fluorescencia, y 535 nm de emisión. Esto se hizo a tres concentraciones de Ca<sup>2+</sup>: cero (con 0.1 mM EGTA), 0.1 mM y 1 mM. Se calcularon los cocientes entre las fluorescencias a cada longitud de onda, para cada una de las tres concentraciones de Ca<sup>2+</sup>. A continuación se calculó el cociente entre los valores obtenidos a 0.1 y 1 mM Ca<sup>2+</sup> entre los valores en ausencia de Ca<sup>2+</sup>. Y, finalmente, se dividieron estos últimos de tal forma que los valores menores de 1 tendrían una mayor afinidad por el Ca<sup>2+</sup> y los mayores que 1 una reducción en la afinidad. Los resultados la Fig. 1 muestran el valor promedio de los triplicados

obtenidos para cada una de las 20 mutaciones estudiadas. Únicamente dos variantes tienen un cociente mayor que 1: las mutantes números 2 (D24N/D119A) y 20 (D119A/S157Q). Estos resultados se verificaron repitiendo de nuevo todo el proceso, desde la inducción proteica, obteniéndose resultados muy similares. Se eligió la mutante D24N (GAP2.2) por tener un valor de cociente mayor (1,76) que la mutante 20 (1,28) para su posterior caracterización.

#### Caracterización de GAP2.2

A pesar de que el extracto proteico obtenido en *E. coli* estaba muy enriquecido en GAP2.2, decidimos purificar la proteína mediante bolas de Ni<sup>2+</sup> aprovechando que la proteína expresada era una fusión con un péptido de Histidinas. El extracto proteico directamente extraído de *E. coli* (carril 1) y se sometió a electroforesis PAGE en condiciones reductoras (con SDS) resultó en una banda mayoritaria de unos 50 kDa, en concordancia con el peso molecular teórico para una proteína de 482 aminoácidos, de 53 kDa. Este extracto también contenía otras bandas minoritarias de peso molecular mayor que GAP2.2 (carril 1), que se eliminaron tras su incubación con las bolas de Ni<sup>2+</sup> en el proceso de purificación (carriles 2 y 3), y que consecuentemente aparecen en los carriles de lavados (carriles 6 y 7). Estos resultados indican que la expresión de la proteína GAP2.2 funciona correctamente y se obtiene una gran cantidad de proteína completa en bacterias.

El siguiente paso consistió en calibrar la afinidad por Ca<sup>2+</sup> de GAP2.2 *in vitro*. Esto se realizó en el lector de fluorescencia en placas de 96 pocillos donde se añadieron las siguientes concentraciones de calcio: EGTA 0.1 mM (Ca<sup>2+</sup> 0), no adiciones (Ca<sup>2+</sup> nominal, 20 μM aproximadamente), 50 μM, 100 μM, 200 μM, 500 μM, 1 mM, 2 mM, 5 mM, 10 mM y 50 mM. Todas las medidas se realizaron por triplicado a las dos longitudes de excitación máxima: 390 y 485 nm con 535 nm de emisión. Los resultados obtenidos están representados en la Fig. 4 y se expresaron según la siguiente fórmula [1]:

$$R = R_{min} / (R_{max} - R_{min}) \quad [1]$$

donde R<sub>min</sub> es el valor del cociente de fluorescencias obtenido en ausencia de Ca<sup>2+</sup> (EGTA 0.1 mM) y R<sub>max</sub> es el valor del cociente de fluorescencias obtenido en presencia de Ca<sup>2+</sup> saturante (50 mM).

Los valores se ajustan bien a una curva sigmoidea correspondiente a la ecuación de Hill [2]:

$$V = V_{max} \cdot x^n / (k^n + x^n) \quad [2]$$

donde los parámetros obtenidos fueron V<sub>max</sub> = 1.01 ± 0.018 M; k = 0.33 ± 0.02mM y n = 0.975 ± 0.05.

El valor obtenido para la K<sub>d</sub> de 0,33 mM indica que GAP2.2 es óptimo para registrar las altas concentraciones de Ca<sup>2+</sup> contenidas en el RE, donde se han descrito contenidos de 0,4-0,8 mM. Además el hecho de que el coeficiente de Hill sea cercano a 1 indica que GAP2.2 sólo tiene un único sitio de unión al Ca<sup>2+</sup> y no existen efectos cooperativos.

Esto concuerda bien con la idea de que las dos mutaciones introducidas anulen la unión al  $\text{Ca}^{2+}$  de los sitios EF 1 y 2, dejando sólo el EF 3 como el único funcional. Por analogía con la calmodulina se ha propuesto que la primera y la segunda mano EF de la acuorina son de alta afinidad, y la 3 es de baja.

El espectro de fluorescencia de la proteína GuvA purificada era similar al de la proteína GFPuv, con 2 máximos de excitación, uno a 403 y otro a 470 nm, y un único máximo de emisión a 510 nm (Fig. 5). La adición de  $\text{Ca}^{2+}$  saturante (1 mM) aumenta la intensidad de fluorescencia a 403 y disminuye a 470 nm, en el espectro de excitación; la fluorescencia de emisión aumenta ligeramente en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$ . Los espectros de excitación y de emisión de GAP2.2 no se han modificado sustancialmente respecto a GAP wt y son reminiscentes del indicador Fura-2.

El siguiente objetivo fue expresar GAP2.2 en el RE de células de mamífero. Para ello se generaron nuevas construcciones con 2 direccionamientos distintos al RE (Fig. 2): el primero fusionaba el extremo N-terminal del GAP2.2 al gen de la cadena pesada de la inmunoglobulina Ig- $\gamma$ -2b (erGAP2.2, SEQ ID NO: 58) (Montero et al., 1995); el segundo, por adición del péptido señal de la calreticulina al extremo N-terminal de GAP2.2 y la secuencia KDEL de retención en el RE, al extremo C-terminal (crGAP2.2, SEQ ID NO: 59) (Kendall et al., 1992). En ambos casos, la localización de la proteína GAP en las células transfectadas tenía un patrón característico del RE (Fig. 6C) y la fluorescencia verde crGAP2.2 colocalizaba con un marcador típico del RE como es la ATPasa del RE, SERCA (resultados no mostrados). La intensidad de fluorescencia era ligeramente mayor para la fusión crGAP2.2 que para la erGAP2.2, y, por esta razón esta construcción se expresó de forma estable en HeLa. En la Fig. 6 se muestra la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$  registrada por el sensor crGAP2.2 en el clon estable de HeLa obtenida en un ensayo de imagen de célula única. Un estímulo máximo de ATP + Histamina produjo una disminución de dos veces en el cociente de fluorescencias entre 470 y 403, cercana al máximo obtenido por el mismo estímulo en presencia del inhibidor reversible de la SERCA- ATPasa terbutilhidroquinona (TBH) en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  externo (Fig. 6A). El lavado del inhibidor y la reintroducción de 1 mM  $\text{Ca}^{2+}$  recuperó completamente la señal hasta los niveles basales, evidenciando la reversibilidad en el comportamiento del sensor en el contexto fisiológico del RE. La incubación con el inhibidor irreversible de la SERCA tapsigargina (Fig. 6B) redujo el cociente hasta niveles menores de 0,1, lo que supone un cambio de seis veces en el cociente. Como se esperaba, la adición de una dosis máxima de ATP no produjo una mayor reducción en la señal, indicando que, efectivamente, el RE se había vaciado completamente tras el tratamiento con el inhibidor durante 12 min. Además, el lavado de la tapsigargina y la readición de  $\text{Ca}^{2+}$  no recuperó los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  basales, como consecuencia del carácter irreversible de la inhibición de la SERCA. Estos resultados tomados globalmente indican que el nuevo sensor crGAP2.2 mantiene sus propiedades dinámicas de sensibilidad a  $\text{Ca}^{2+}$  previamente descritas *in vitro* también en el entorno fisiológico del RE de una célula de mamífero.

El sensor crGAP2.2 también es compatible con indicadores fluorescentes como el Fura-2 o el Rhod 2, que puede usarse de forma conjunta para medir los cambios dinámicos en RE y en el citosol o la mitocondria, simultáneamente (resultados no mostrados). Aunque los resultados mostrados en la Fig. 6 se han obtenido a 25 °C no se vieron

modificados a 37 °C, indicando que este sensor funciona de forma óptima a temperaturas fisiológicas. Por último, este sensor también se ha enviado a otras organelas de alto contenido en  $\text{Ca}^{2+}$  como el complejo de Golgi (resultados no mostrados).

Los autores generaron una secuencia de nucleótidos, denominada crGAP3 (SEQ ID NO: 60), en la que la secuencia de codones ha sido optimizada para expresión en células de ratón y que codifica para la proteína crGAP2.2 (SEQ ID NO: 59). Esta se ha expresado tanto en el citosol como en el retículo endoplásmico.

Además se han realizado una serie de mutantes en GFPuv para incrementar el nivel de fluorescencia de GAP. Los mutantes que mostraron una mejora en el nivel de fluorescencia y que mantuvieron la sensibilidad a  $\text{Ca}^{2+}$  y el rango dinámico de la GAP3 parental, fueron los siguientes:

- GAP3.5: L15Q, T153K, I167V, S175G, D180Y
- GAP3.7: L15Q, I167V, S175G, D180Y

La cuantificación del nivel de fluorescencia se realizó en células HeLa transfectadas con los plásmidos que expresan los dos nuevos mutantes respecto al parental, el GAP3. Las células se fijaron 24h tras la transfección con paraformaldehído (4%) y se contratiñeron los núcleos con DAPI. Se tomaron al azar ROIs (regiones de interés) tanto de la señal de fluorescencia verde (GFP) como de la azul (DAPI) (azul), este último para normalizar. Los resultados normalizados según el cociente F470/FDAPI de varios experimentos se muestran en Fig. 7. Como puede observarse, el mutante GAP3.5 tiene un incremento en la intensidad de fluorescencia de 6,2 veces respecto al control GAP3, y el mutante GAP3.7 de 3 veces respecto al control GAP3. Ambos son funcionales y registran cambios en el RE similares a GAP3.

**REIVINDICACIONES**

1. Polipéptido que comprende la secuencia SEQ ID NO: 1 (apoacurina), en donde
  - en una primera posición 119 de SEQ ID NO: 1 el aminoácido es cualquier aminoácido excepto Asp, y
  - en una segunda posición 24 de SEQ ID NO: 1 el aminoácido es cualquier aminoácido excepto Asp y/o en posición 157 de SEQ ID NO: 1 es cualquier aminoácido excepto Ser.
2. Polipéptido según la reivindicación 1, en donde el aminoácido en una primera posición 119 de SEQ ID NO: 1 es cualquier aminoácido excepto un aminoácido con carga negativa.
3. Polipéptido según la reivindicación 2, en donde el aminoácido en una primera posición 119 de SEQ ID NO: 1 es un aminoácido con carga neutra.
4. Polipéptido según la reivindicación 3, en donde el aminoácido en una primera posición 119 de SEQ ID NO: 1 es Ala.
5. Polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el aminoácido en una segunda posición 24 de SEQ ID NO: 1 es cualquier aminoácido excepto un aminoácido con carga negativa.
6. Polipéptido según la reivindicación 5, en donde el aminoácido en una segunda posición 24 de SEQ ID NO: 1 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Asn, Glu y Gln.
7. Polipéptido según la reivindicación 6, en donde el aminoácido en una segunda posición 24 de SEQ ID NO: 1 es Asn.
8. Polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el aminoácido en una segunda posición 157 de SEQ ID NO: 1 es cualquier aminoácido excepto un aminoácido con carga negativa.
9. Polipéptido según la reivindicación 8, en donde el aminoácido en una segunda posición 157 de SEQ ID NO: 1 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Asn, Glu y Gln.
10. Polipéptido según la reivindicación 9, en donde el aminoácido en una segunda posición 157 de SEQ ID NO: 1 es Asn.
11. Polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde
  - el aminoácido en posición 119 es Ala,
  - el aminoácido en posición 24 es Asn, y
  - el aminoácido en posición 157 es Asn.
12. Proteína de fusión que comprende

- un primer polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, y
  - un segundo polipéptido fluorescente,
- en donde dichos primer y segundo dominios se encuentran unidos a través de un péptido enlazador flexible.
13. Proteína de fusión según la reivindicación 12, en donde el segundo polipéptido fluorescente es el polipéptido de secuencia SEQ ID NO: 33 (GFPuv) o una variante funcionalmente equivalente del mismo.
  14. Proteína de fusión según la reivindicación 13, en donde el segundo polipéptido fluorescente es el polipéptido de secuencia SEQ ID NO: 33 (GFPuv) en donde
    - el aminoácido en posición 15 es Gln,
    - el aminoácido en posición 167 es Val,
    - el aminoácido en posición 175 es Gly,
    - el aminoácido en posición 180 es Tyr,y opcionalmente
    - el aminoácido en posición 153 es Lys.
  15. Proteína de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14, en donde el péptido enlazador es un péptido con secuencia SEQ ID NO: 42.
  16. Polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 o proteína de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15, que comprende adicionalmente al menos un péptido de localización en un compartimento intracelular u orgánulo específico.
  17. Polipéptido o proteína de fusión según la reivindicación 16, en donde el péptido de localización se selecciona del grupo consistente en un péptido de localización en el retículo endoplásmico, un péptido de señalización mitocondrial, un péptido de localización nuclear y un péptido de señalización en el complejo de Golgi.
  18. Polipéptido o proteína de fusión según la reivindicación 17, que comprende un primer péptido señal de direccionamiento a la ruta secretora y un segundo péptido señal de retención en el retículo endoplásmico.
  19. Polipéptido o proteína de fusión según la reivindicación 18, en donde el péptido señal de retención en el retículo endoplásmico se selecciona del grupo consistente en un péptido de retención en el retículo endoplásmico en posición carboxilo terminal y una secuencia de interacción con BiP.
  20. Polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 y 16 a 19 o proteína de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 19, en donde el péptido señal de direccionamiento a la ruta secretora se selecciona del grupo consistente en el péptido señal de la calreticulina y el péptido señal de la inmunoglobulina I $\gamma$ 2b, en donde el péptido de retención en el retículo endoplásmico es el péptido KDEL (SEQ ID NO: 27) y/o en donde la secuencia interacción con BiP comprende los dominios VDJ y CH1 de la cadena pesada de la inmunoglobulina I $\gamma$ 2b.

21. Polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 y 16 a 20 o proteína de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 20, en donde el péptido señal de direccionamiento a la ruta secretora es el péptido señal de la calreticulina, y en donde el péptido de retención en el retículo endoplásmico es el péptido KDEL (SEQ ID NO: 27).
22. Ácido nucleico que codifica para el polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 y 16 a 21 o la proteína de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 21.
23. Casete de expresión que comprende el ácido nucleico según la reivindicación 22, donde dicho ácido nucleico se encuentra bajo control de un sistema de transcripción y/o traducción apropiado.
24. Plásmido que comprende el ácido nucleico según la reivindicación 22 o el casete de expresión según la reivindicación 23.
25. Célula hospedadora que comprende ácido nucleico según la reivindicación 22, el casete de expresión según la reivindicación 23, o el plásmido según la reivindicación 24.
26. Uso del polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 y 16 a 21 o la proteína de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 21 para la detección de  $\text{Ca}^{2+}$  en una muestra.
27. Método para la determinación de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en una muestra que comprende
  - (i) poner en contacto dicha muestra con un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 y 15 a 21,
  - (ii) poner en contacto dicho polipéptido con un co-factor específico para el mismo,
  - (iii) detectar la luminiscencia emitida por dicho polipéptido, y
  - (iv) determinar la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  a partir de la variación en la intensidad de la luminiscencia con respecto a la intensidad de la luminiscencia en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$ .
28. Método para la determinación de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en una muestra que comprende
  - (i) poner en contacto dicha muestra con una proteína de fusión que comprende un primer polipéptido y un segundo polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 21,
  - (ii) detectar la luminiscencia emitida por dicho primer polipéptido en respuesta a la puesta en contacto dicha proteína de fusión con un co-factor específico para dicho primer polipéptido, o, alternativamente detectar la fluorescencia emitida por dicho segundo polipéptido en respuesta a la excitación de la muestra a una longitud de onda

correspondiente a la longitud de onda de excitación de dicho segundo polipéptido, y

- (iii) determinar la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  a partir de la variación en la intensidad de la luminiscencia o fluorescencia con respecto a la intensidad de la luminiscencia o fluorescencia en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$ .

29. Método para la detección intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  en una célula o población celular que comprende un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 y 15 a 21, en donde dicho método comprende

- (i) poner en contacto dicho polipéptido con un co-factor específico del mismo, y
- (ii) detectar la luminiscencia emitida por dicho polipéptido,

en donde una variación en la intensidad de la luminiscencia emitida por la célula o población celular con respecto a un valor de referencia es indicativo de la presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  en la célula o población celular.

30. Método para la detección intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  en una célula o población celular que comprende una proteína de fusión que comprende un primer polipéptido y un segundo polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 21, en donde dicho método comprende

- (a) detectar la luminiscencia emitida por dicho primer polipéptido en respuesta a la puesta en contacto dicha proteína de fusión con un co-factor específico para dicho primer polipéptido,

o alternativamente

- (b) detectar la fluorescencia emitida por dicho segundo polipéptido en respuesta a la excitación de la célula o población celular a una longitud de onda correspondiente a la longitud de onda de excitación de dicho segundo polipéptido

en donde una variación en la intensidad de la luminiscencia o fluorescencia emitida por la célula o población celular con respecto a un valor de referencia es indicativo de la presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  en la célula o población celular.

31. Método para la detección de variaciones en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en una célula o población celular a lo largo del tiempo que comprende

- (i) proporcionar una célula o población celular en donde dicha célula o células comprenden un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 y 15 a 21,
- (ii) poner en contacto dicho polipéptido con un co-factor específico del mismo,
- (iii) determinar a un primer tiempo la luminiscencia emitida por la célula o población celular, y
- (iv) determinar a un segundo tiempo la luminiscencia emitida por la célula o población celular

en donde una variación en la intensidad de la señal emitida en (iv) con respecto a la intensidad de la señal emitida en (iii) es indicativo de una variación en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en la célula o población celular.

32. Método para la detección de variaciones en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en una célula o población celular a lo largo del tiempo que comprende
- proporcionar una célula o población celular en donde dicha célula o células comprenden una proteína de fusión que comprende un primer polipéptido y un segundo polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 21,
  - (ii.a) determinar a un primer tiempo la luminiscencia emitida por la célula o población celular en respuesta a la puesta en contacto dicha proteína de fusión con un co-factor específico para dicho primer polipéptido, y
  - (iii.a) determinar a un segundo tiempo la luminiscencia emitida por la célula o población celular en respuesta a la puesta en contacto dicha proteína de fusión con un co-factor específico para dicho primer polipéptido,

o alternativamente

- (ii.b) determinar a un primer tiempo la fluorescencia emitida por la célula o población celular en respuesta a una excitación de dicha célula o población a una longitud de onda correspondiente a la longitud de onda de excitación de dicho segundo polipéptido y
- (iii.b) determinar a un segundo tiempo la fluorescencia emitida por la célula o población celular en respuesta a una excitación de dicha célula o población a una longitud de onda correspondiente a la longitud de onda de excitación de dicho segundo polipéptido

en donde una variación en la intensidad de la señal emitida en (iii.a) con respecto a la intensidad de la señal emitida en (ii.a) o una variación en la intensidad de la señal emitida en (iii.b) con respecto a la intensidad de la señal emitida en (ii.b) es indicativo de una variación en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en la célula o población celular.

33. Método de identificación de un compuesto con capacidad de modulación de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en una célula o población celular, que comprende
- (i) poner en contacto un compuesto candidato con una célula o población celular en donde dicha célula o células comprenden un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 y 15 a 21,
  - (ii) determinar la luminiscencia emitida por la célula o población celular en respuesta a la puesta en contacto dicho polipéptido con un co-factor específico para dicho polipéptido,

en donde una alteración en la intensidad de luminiscencia determinada en la etapa (ii) con respecto a la intensidad de luminiscencia emitida en ausencia de dicho compuesto candidato es indicativo de que dicho compuesto es capaz de modular la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$ .

34. Método de identificación de un compuesto con capacidad de modulación de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en una célula o población celular, que comprende

- (i) poner en contacto un compuesto candidato con una célula o población celular en donde dicha célula o células comprenden una proteína de fusión que comprende un primer polipéptido y un segundo polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 21,
- (ii) determinar la luminiscencia emitida por la célula o población celular en respuesta a la puesta en contacto dicha proteína de fusión con un co-factor específico para dicho primer polipéptido,

o alternativamente

determinar la fluorescencia emitida por la célula o población celular en respuesta a una excitación de dicha célula o población a una longitud de onda correspondiente a la longitud de onda de excitación de dicho segundo polipéptido,

en donde una alteración en la intensidad de luminiscencia o fluorescencia determinada en la etapa (ii) con respecto a la intensidad de fluorescencia emitida en ausencia de dicho compuesto candidato es indicativo de que dicho compuesto es capaz de modular la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$ .

- 35. Método según cualquiera de las reivindicaciones 29, 31 o 33, en donde dicho polipéptido se localiza en un compartimento intracelular u orgánulo específico.
- 36. Método según cualquiera de las reivindicaciones 30, 32 o 34, en donde dicha proteína de fusión se localiza en un compartimento intracelular u orgánulo específico.
- 37. Método según cualquiera de las reivindicaciones 35 o 36, en donde dicho compartimento intracelular u orgánulo es el retículo endoplásmico o sarcoplásmico.

MUTACIONES		EGTA 100 $\mu$ M		CaCl <sub>2</sub> 100 $\mu$ M		CaCl <sub>2</sub> 1 mM			RATIO		RATIO
Numeración	Aminoácido mutado	390 nm	485 nm	390 nm	485 nm	390 nm	485 nm	100 $\mu$ M	1 mM	100 $\mu$ M / 1 mM	1 mM / 100 $\mu$ M
1	(D24H,D119A)	10382	3887	10843	4136	11188	4357	1,0188	1,0402	1,0210	1,0210
2	(D24N,D119A)	17789	7290	23981	11455	20898	17508	1,1796	2,0644	1,7673	1,7673
3	(D24V,D119A)	18570	7680	17465	18227	14628	15699	2,5266	2,6044	1,0302	1,0302
4	(V25P,D119A)	7137	3060	6079	3623	6091	6391	3,3144	3,2138	0,9707	0,9707
5	(N28Q,D119A)	8520	3642	8310	3551	9365	4167	1,0018	1,0460	1,0442	1,0442
6	(N28V,D119A)	7185	2813	7930	3095	7215	2863	0,9984	1,0140	1,0163	1,0163
7	(D35Q,D119A)	17963	7834	16269	15565	15630	16485	2,1992	2,4108	1,0962	1,0962
8	(Y38S,D119A)	17191	7411	14349	14871	16683	16462	2,4049	2,2892	0,9522	0,9522
9	(D117N,D119A)	885	264	689	206	702	216	0,9977	1,0217	1,0255	1,0255
10	(D117V,D119A)	19002	5361	13817	14256	13619	14435	2,3929	2,4232	1,0124	1,0124
11	(D119K)	18577	7816	15637	13539	17171	16403	2,0569	2,2695	1,1034	1,1034
12	(D119I)	12583	5335	10826	6541	9298	6227	1,4262	1,5063	1,0552	1,0552
13	(D119A,N121L)	24245	9623	18923	21864	16280	21761	2,9328	3,3660	1,1517	1,1517
14	(D119A,E128K)	15744	6274	12779	12776	14271	14826	2,5091	2,6100	1,0404	1,0404
15	(D119A,E128R)	7710	2989	6730	6947	6404	7233	2,6256	2,9130	1,1103	1,1103
16	(D119A,D153L)	18914	7678	13713	13290	12535	11947	2,3732	2,3445	0,9893	0,9893
17	(D119A,D155K)	17088	7203	16549	15719	14865	15221	2,2598	2,4418	1,0608	1,0608
18	(D119A,E156N)	13446	5376	10663	10563	11132	11333	2,4848	2,5488	1,0257	1,0257
19	(D119A,E156P)	724	270	876	321	810	283	0,9810	0,9419	0,9634	0,9634
20	(D119A,S157Q)	36016	17775	34942	31463	6601	7636	1,8855	2,5533	1,2854	1,2854
21	(D119A,D161K)	128	66	114	63	136	76	1,0717	1,1121	1,0488	1,0488
22	(D119A,E164K)	8137	3597	6144	6053	6015	6453	2,2352	2,4336	1,0889	1,0889

Figura 1

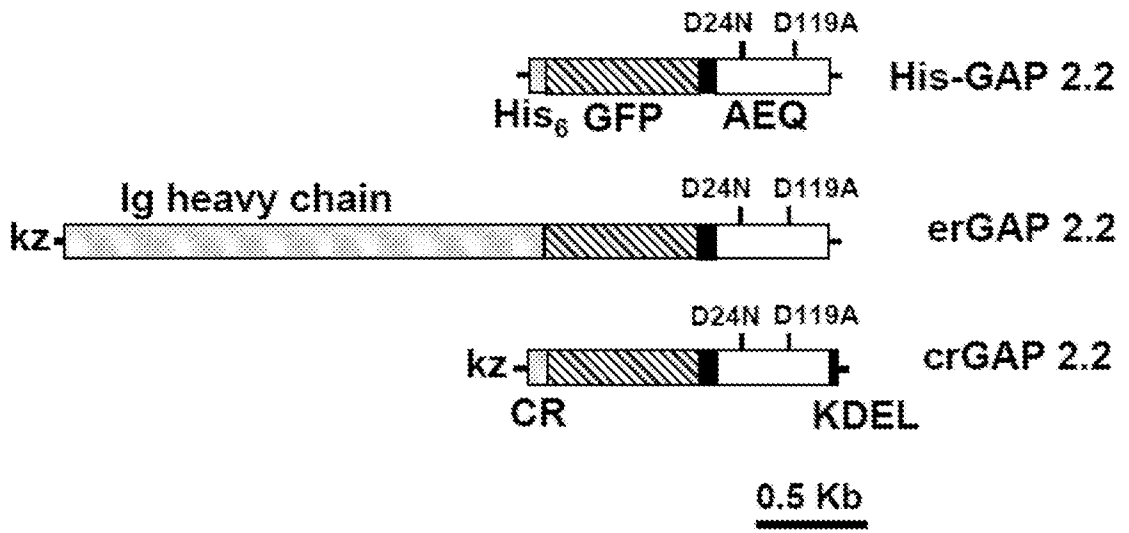


Figura 2

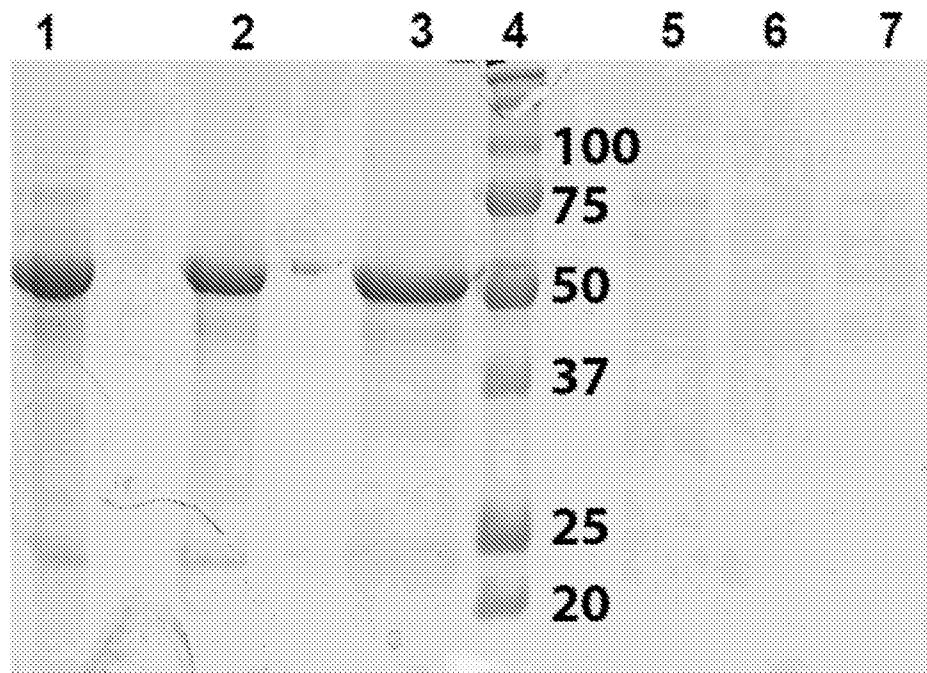


Figura 3

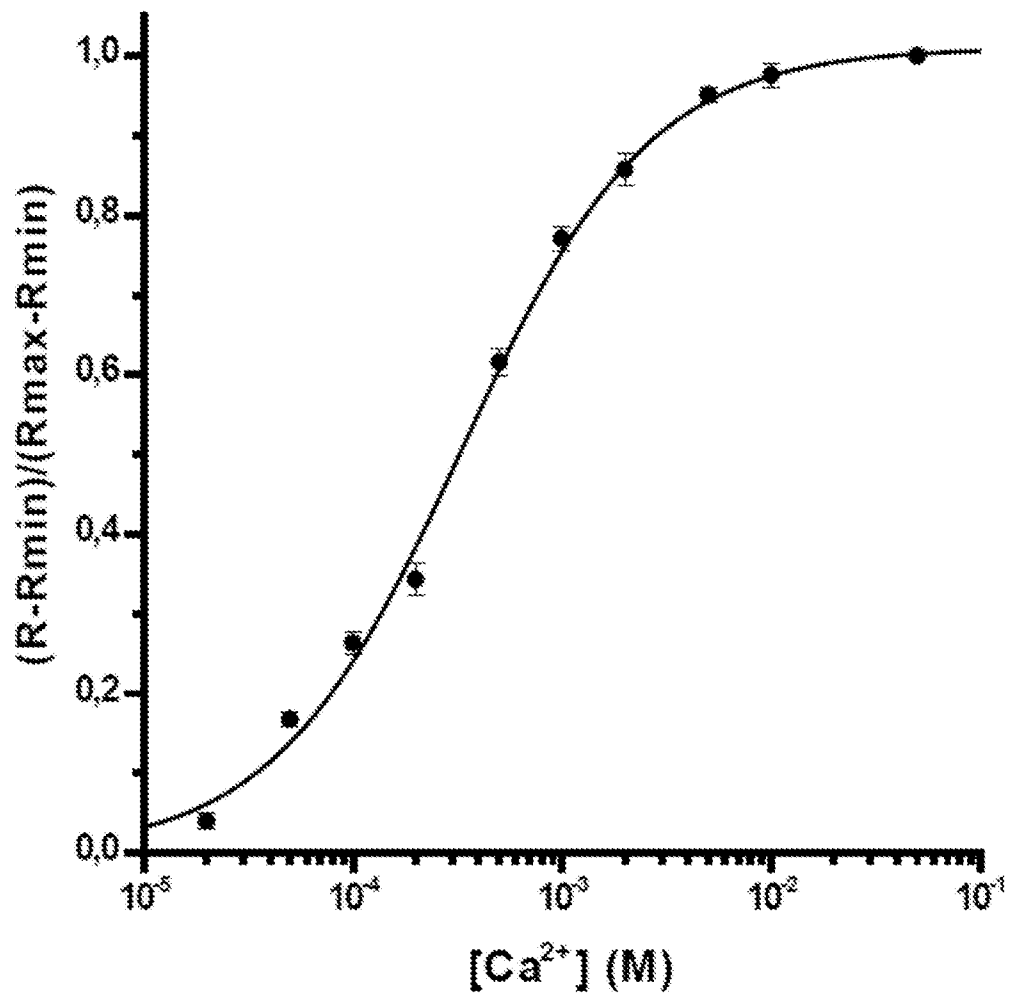


Figura 4

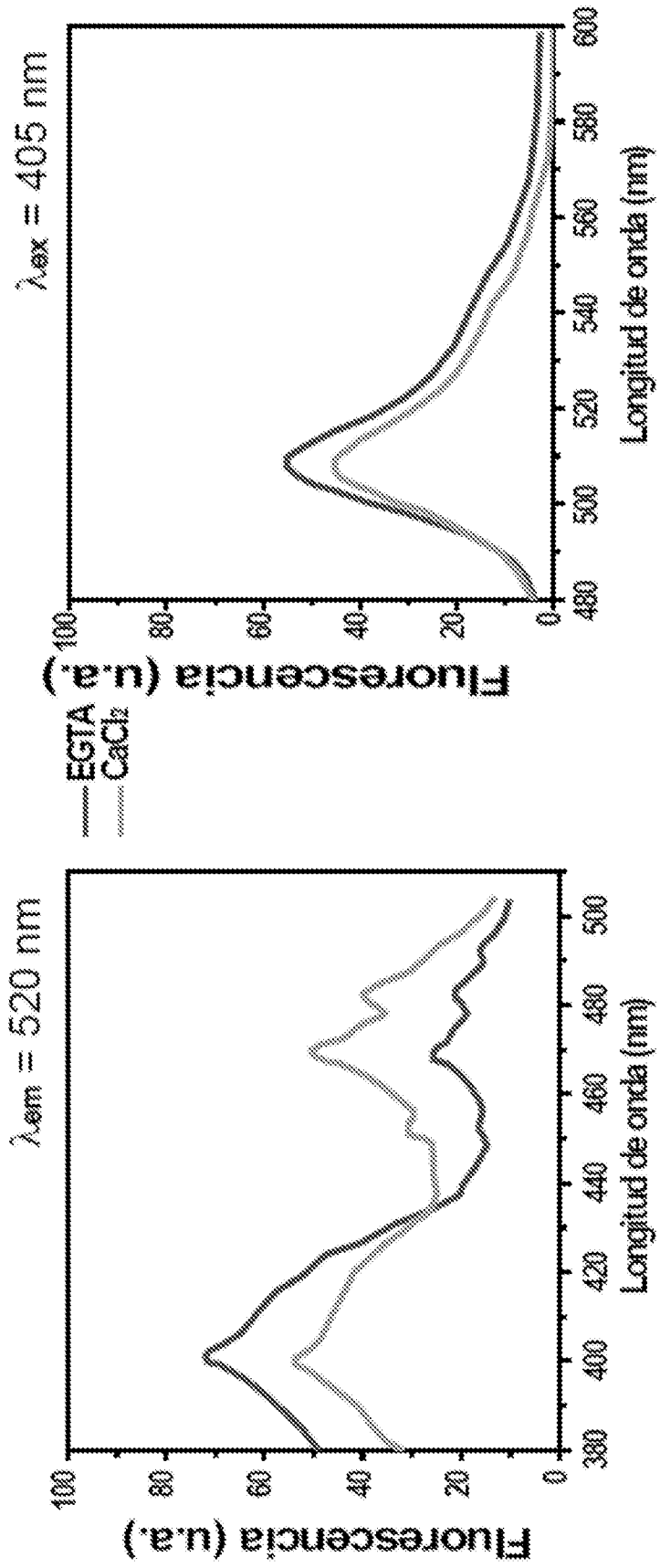


Figura 5

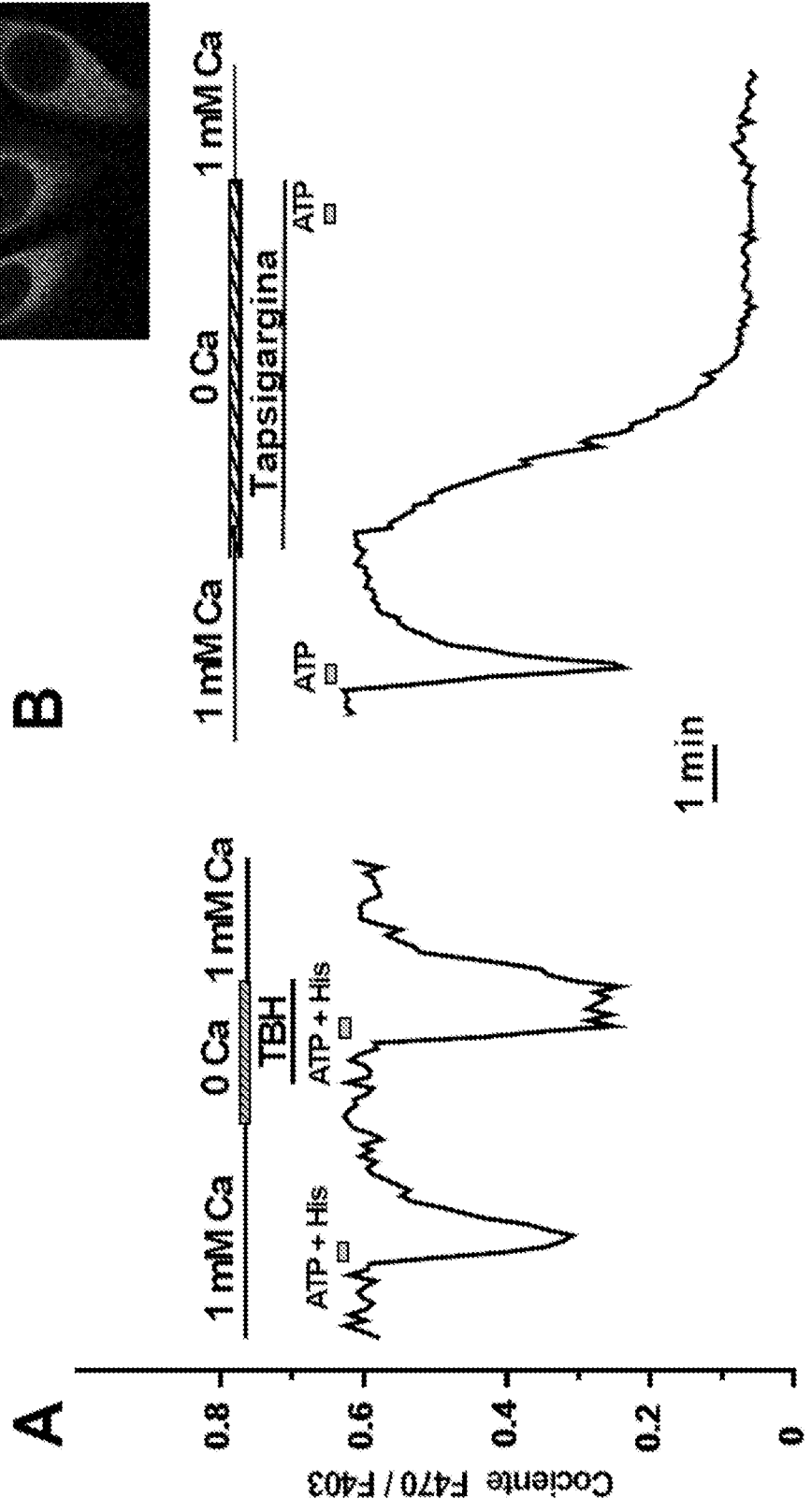


Figura 6

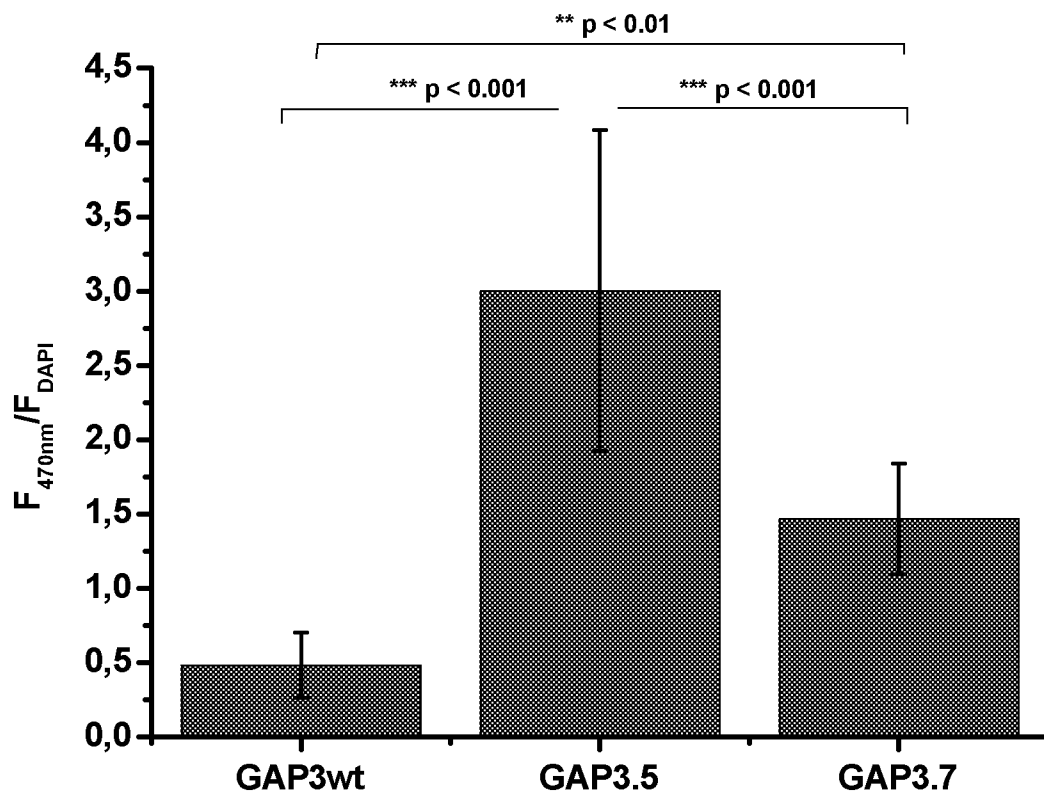


Figura 7

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2013/070503

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

**C07K14/435** (2006.01)

**G01N33/52** (2006.01)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K, G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPODOC, INVENES, WPI, REGISTRY, HCAPLUS, BIOSIS, GOOGLE

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KENDALL, J.M. et al. "Engineering the Ca <sup>2+</sup> -activated photoprotein aequorin with reduced affinity for calcium". <b>BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS</b> . 16.09.1992. Vol. 187, N°. 2, pages 1091 - 1097; the whole document.	1-11, 16-27, 29, 31, 33, 35, 37
Y	TSUJI, F.I. et al. "Site-specific mutagenesis of the calcium-binding photoprotein aequorin". <b>PNAS</b> . 01.11.1986. Vol. 83, N°. 21, pages 8107 - 8111; table 1, figure 1.	1-11, 16-27, 29, 31, 33, 35, 37
Y	MONTERO, M. et al. "Monitoring dynamic changes in free Ca <sup>2+</sup> concentration in the endoplasmic reticulum of intact cells". <b>THE EMBO JOURNAL</b> . 15.11.1995. Vol. 14, N°. 22, pages 5467 - 5478; the whole document.	1-11, 16-27, 29, 31, 33, 35, 37

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means.</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&amp;" document member of the same patent family</p>
--	--

Date of the actual completion of the international search  
03/12/2013

Date of mailing of the international search report  
**(09/12/2013)**

Name and mailing address of the ISA/

Authorized officer  
M. Novoa Sanjurjo

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS  
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)  
Facsimile No.: 91 349 53 04

Telephone No. 91 3498466

**Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)**

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing filed or furnished:

a. (means)

on paper

in electronic form

b. (time)

in the international application as filed

together with the international application in electronic form

subsequently to this Authority for the purposes of search

2.  In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

**In SEQ. ID. NO. 33, the mutation defined as F99S is actually located in position F100S of the green fluorescent protein GFP.**

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

· **Invention 1: Claims 1-11, [16-26 (in part)], 27, 29, 31, 33, 35, [37 (in part)]  
Apoaequorin mutants with reduced affinity for Ca<sup>2+</sup>.**

· **Invention 2: Claims 12-15, [16-26 (in part)], 28, 30, 32, 34, 36, [37 (in part)]  
Fusion protein obtained from green fluorescent protein mutants and apoaequorin mutants with reduced affinity for Ca<sup>2+</sup>.**

**The applicant is exempted from the payment of fees.**

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2013/070503

C (continuation).		DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT
Category *	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	TRICOIRE L. et al. "Calcium dependence of aequorin bioluminescence dissected by random mutagenesis". PNAS. 20.06.2006. Vol. 103, N°. 25, pages 9500 - 9505; the whole document.	1-11, 16-27, 29, 31, 33, 35, 37
Y	KENDALL, J.M. et al. " <i>Aequorea victoria</i> bioluminescence moves into an exciting new era". TRENDS IN BIOTECHNOLOGY. 01.12.1998. Vol. 16, N°. 5, pages 216 - 224; the whole document.	1-37
Y	WO 0192300 A2 (INSTITUT PASTEUR ET AL.) 06.12.2001, the whole document.	12-26, 28, 30, 32, 34, 36, 37
Y	WO 2005078445 A1 (INSTITUT PASTEUR ET AL.) 25.08.2005, claims 1-3, 5-20.	12-26, 28, 30, 32, 34, 36, 37

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

Information on patent family members

PCT/ES2013/070503

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO0192300 A2	06.12.2001	US2010330667 A1	30.12.2010
		US2008213879 A1	04.09.2008
		US7763443 B2	27.07.2010
		HK1060370 A1	30.10.2009
		US2003175807 A1	18.09.2003
		US6936475 B2	30.08.2005
		PT1292613E E	10.11.2008
		JP2004532001 A	21.10.2004
		ES2312454T T3	01.03.2009
		EP1292613 A2	19.03.2003
		EP1292613 B1	03.09.2008
		DK1292613T T3	24.11.2008
		CN1468312 A	14.01.2004
		CN100467604C C	11.03.2009
		CA2411304 A1	06.12.2001
		AU7058301 A	11.12.2001
		AU784887B B2	20.07.2006
		AT407142T T	15.09.2008
		US2003066095 A1	03.04.2003
		US6800492 B2	05.10.2004
WO2005078445 A1	25.08.2005	US2008282362 A1	13.11.2008
		US2005273867 A1	08.12.2005
		US8263821 B2	11.09.2012
		JP2007531514 A	08.11.2007
		EP1714155 A1	25.10.2006

# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº  
PCT/ES2013/070503

## A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

**C07K14/435** (2006.01)

**G01N33/52** (2006.01)

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

## B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

**C07K, G01N**

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

**EPODOC, INVENES, WPI, REGISTRY, HCAPLUS, BIOSIS, GOOGLE**

## C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
Y	KENDALL, J.M. et al. "Engineering the Ca <sup>2+</sup> -activated photoprotein aequorin with reduced affinity for calcium". <b>BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS</b> . 16.09.1992. Vol. 187, Nº. 2, páginas 1091 - 1097; todo el documento.	1-11, 16-27, 29, 31, 33, 35, 37
Y	TSUJI, F.I. et al. "Site-specific mutagenesis of the calcium-binding photoprotein aequorin". <b>PNAS</b> . 01.11.1986. Vol. 83, Nº. 21, páginas 8107 - 8111; tabla 1, figura 1.	1-11, 16-27, 29, 31, 33, 35, 37
Y	MONTERO, M. et al. "Monitoring dynamic changes in free Ca <sup>2+</sup> concentration in the endoplasmic reticulum of intact cells". <b>THE EMBO JOURNAL</b> . 15.11.1995. Vol. 14, Nº. 22, páginas 5467 - 5478; todo el documento.	1-11, 16-27, 29, 31, 33, 35, 37

En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos

Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

\* Categorías especiales de documentos citados:

"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.

"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.

"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).

"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.

"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.

"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.

"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.

"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.

"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.  
**03/12/2013**

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional.  
**09 de diciembre de 2013 (09/12/2013)**

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional  
**OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS**  
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)  
Nº de fax: 91 349 53 04

Funcionario autorizado  
M. Novoa Sanjurjo

Nº de teléfono 91 3498466

# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº  
PCT/ES2013/070503

C (Continuación).		DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES
Categoría *	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
Y	TRICOIRE L. et al. "Calcium dependence of aequorin bioluminescence dissected by random mutagenesis". PNAS. 20.06.2006. Vol. 103, Nº. 25, páginas 9500 - 9505; todo el documento.	1-11, 16-27, 29, 31, 33, 35, 37
Y	KENDALL, J.M. et al. " <i>Aequorea victoria</i> bioluminescence moves into an exciting new era". TRENDS IN BIOTECHNOLOGY. 01.12.1998. Vol. 16, Nº. 5, páginas 216 - 224; todo el documento.	1-37
Y	WO 0192300 A2 (INSTITUT PASTEUR ET AL.) 06.12.2001, todo el documento.	12-26, 28, 30, 32, 34, 36, 37
Y	WO 2005078445 A1 (INSTITUT PASTEUR ET AL.) 25.08.2005, reivindicaciones 1-3, 5-20.	12-26, 28, 30, 32, 34, 36, 37

# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

Informaciones relativas a los miembros de familias de patentes

PCT/ES2013/070503

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
WO0192300 A2	06.12.2001	US2010330667 A1 US2008213879 A1 US7763443 B2 HK1060370 A1 US2003175807 A1 US6936475 B2 PT1292613E E JP2004532001 A ES2312454T T3 EP1292613 A2 EP1292613 B1 DK1292613T T3 CN1468312 A CN100467604C C CA2411304 A1 AU7058301 A AU784887B B2 AT407142T T US2003066095 A1 US6800492 B2	30.12.2010 04.09.2008 27.07.2010 30.10.2009 18.09.2003 30.08.2005 10.11.2008 21.10.2004 01.03.2009 19.03.2003 03.09.2008 24.11.2008 14.01.2004 11.03.2009 06.12.2001 11.12.2001 20.07.2006 15.09.2008 03.04.2003 05.10.2004
----- WO2005078445 A1 -----	----- 25.08.2005 -----	----- US2008282362 A1 US2005273867 A1 US8263821 B2 JP2007531514 A EP1714155 A1 -----	----- 13.11.2008 08.12.2005 11.09.2012 08.11.2007 25.10.2006 -----

**Recuadro I Secuencia(s) de nucleótidos y/o de aminoácidos (continuación del punto 1.c de la primera hoja)**

1 En lo que se refiere a **las secuencias de nucleótidos y/o de aminoácidos** divulgadas en la solicitud internacional y necesarias para la invención reivindicada, la búsqueda se ha llevado a cabo sobre la base de una lista de secuencias presentada o entregada:

a. Medios

en papel

en formato electrónico

b. Cuando

en la solicitud internacional tal y como se presentó

junto con la solicitud internacional en formato electrónico

posteriormente a esta Administración a los fines de la búsqueda

2.  Además, en caso de que se haya presentado más de una versión o copia de una lista de secuencias se ha entregado la declaración requerida de que la información contenida en las copias subsiguientes o adicionales es idéntica a la de la solicitud tal y como se presentó o no va más allá de lo presentado inicialmente.

3. Comentarios adicionales:

**En la SEQ ID n° 33, la mutación que se define como F99S, se presenta realmente en la posición F100S de la proteína verde fluorescente GFP.**

**Recuadro II Observaciones cuando se estime que algunas reivindicaciones no pueden ser objeto de búsqueda (continuación del punto 2 de la primera hoja)**

Este informe de búsqueda internacional no se ha realizado en relación a ciertas reivindicaciones según el artículo 17.2.a) por los siguientes motivos:

1.  Las reivindicaciones n<sup>os</sup>:  
se refieren a un objeto con respecto al cual esta Administración no está obligada a proceder a la búsqueda, a saber:
  
2.  Las reivindicaciones n<sup>os</sup>:  
se refieren a elementos de la solicitud internacional que no cumplen con los requisitos establecidos, de tal modo que no pueda efectuarse una búsqueda provechosa, concretamente:
  
3.  Las reivindicaciones n<sup>os</sup>:  
son reivindicaciones dependientes y no están redactadas de conformidad con los párrafos segundo y tercero de la regla 6.4(a).

**Recuadro III Observaciones cuando falta unidad de invención (continuación del punto 3 de la primera hoja)**

La Administración encargada de la Búsqueda Internacional ha detectado varias invenciones en la presente solicitud internacional, a saber:

- > **Invención 1.- Reivindicaciones 1-11, [16-26 (parcialmente)], 27, 29, 31, 33, 35, [37 (parcialmente)]. Mutantes de apoacuorina que presentan afinidad reducida por Ca<sup>2+</sup>.**
  - > **Invención 2.- Reivindicaciones 12-15, [16-26 (parcialmente)], 28, 30, 32, 34, 36, [37 (parcialmente)]. Proteína de fusión obtenida a partir de mutantes de proteína verde fluorescente y de mutantes de apoacuorina que presentan afinidad reducida por Ca<sup>2+</sup>.**
- El solicitante está exento del pago de tasas**

1.  Dado que todas las tasas adicionales requeridas han sido satisfechas por el solicitante dentro del plazo, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda.
2.  Dado que todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda podrían serlo sin realizar un esfuerzo que justifique tasas adicionales, esta Administración no requirió el pago de tasas adicionales.
3.  Dado que tan sólo una parte de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha dentro del plazo por el solicitante, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende solamente aquellas reivindicaciones respecto de las cuales han sido satisfechas las tasas, concretamente las reivindicaciones n<sup>os</sup>:
4.  Ninguna de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha por el solicitante dentro de plazo. En consecuencia, el presente informe de búsqueda de tipo internacional se limita a la invención mencionada en primer término en las reivindicaciones, cubierta por las reivindicaciones n<sup>os</sup>:

**Indicación en cuanto a la protesta**

- Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante y, en su caso, el pago de una tasa de protesta.
- Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante, pero la tasa de protesta aplicable no se pagó en el plazo establecido para ello.
- El pago de las tasas adicionales no ha sido acompañado de ninguna protesta.