



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 267 556**

51 Int. Cl.:
G01N 33/48 (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **00956443 .6**
86 Fecha de presentación : **04.08.2000**
87 Número de publicación de la solicitud: **1282813**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **12.02.2003**

54 Título: **Uso de proteínas azules de cobre.**

30 Prioridad: **06.08.1999 US 147339 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.03.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.03.2007

73 Titular/es: **Tibotec BVBA**
Generaal de Wittelaan L11B3
2800 Mechelen, BE

72 Inventor/es: **Dierynck, Inge;**
Roelant, Christiaan, Hubert, Simon;
Pauwels, Rudi, Wilfried, Jan;
Van Acker, Koenraad, Lodewijk, August y
De Kerpel, Jan, Octaaf, Antoon

74 Agente: **Justo Vázquez, Jorge Miguel de**

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

DESCRIPCIÓN

Uso de proteínas azules de cobre.

La presente invención se refiere al campo de moléculas indicadoras ("reporter") y marcadores que pueden usarse para monitorizar una sustancia diana en un sistema biológico. Más particularmente, la presente invención se refiere al uso de una apoproteína de unión a metal como molécula indicadora o marcador. Una apoproteína de unión a metal puede unirse a una proteína o tejido o introducirse en una célula. La invención también se refiere a métodos de utilización de la apoproteína de unión a metal para detectar una célula que expresa una proteína de interés, ubicando una proteína en una célula, y diseñando un agente terapéutico para tratar una enfermedad o infección.

Antecedentes

Existen varios métodos para monitorizar una sustancia diana en un sistema biológico, incluyendo actividades de monitorización dentro de una célula y procesos intracelulares. Estos métodos utilizan varias moléculas y genes indicadores y otros marcadores moleculares e incluyen, por ejemplo, la formación de proteínas de fusión con secuencias que codifican para cloranfenicol acetil transferasa (CAT), glucuronidasa (GLU), beta-galactosidasa (bGAL) y luciferasas (LUC). Muchas de esas moléculas indicadoras y marcadores se pueden usar como indicadores de procesos que serían difíciles de detectar de lo contrario. Silhavy, T.J. & Beckwith, J.R. *Microbiol. Rev.* (49), 398 (1985); Gould, S.J. & Subramani, S. *Anal. Biochem.* (175), 5 (1988); y Stewart, G.S.A.B. & Williams, P.J. *Gen Microbiol.* (138), 1289 (1992). Muchos de esos genes indicadores se han descrito ampliamente en la técnica anterior. Sin embargo, su uso ha sido limitado porque requieren manipulaciones adicionales. Por ejemplo, la fijación de preparaciones celulares o la adición de sustratos o cofactores exógenos hace difícil incorporar el uso de estos indicadores en ensayos altamente automatizados. Por el contrario, el uso de otro gen indicador, la proteína verde fluorescente (GFP), no está limitado por esas restricciones, pero sufre otras desventajas, tales como ruido de fondo y la necesidad de equipo complejo y caro para la detección. Cormack, B.P., y cols. *Gene*, 173(1):33-38 (1996); Kroes, S.J., y cols. *Eur. J. Biochem.* 240(2), 342-351 (1996).

Además, hasta hace poco, la detección en ensayos automatizados se basaba en métodos enzimáticos o fluorimétricos por razones de sensibilidad. Sin embargo, cuando la detección a nivel microscópico se ha desarrollado se ha hecho posible usar marcadores sin amplificación del propio marcador, o amplificación de la señal. Así, se desea el desarrollo de genes indicadores o marcadores novedosos que no tengan ninguna de las limitaciones ni desventajas anteriores.

Sumario de la invención

Para lograr éstas y otras ventajas, y según el fin de la invención tal como se realiza y describe ampliamente en el presente documento, la presente invención, en un aspecto, proporciona un método de monitorización de una sustancia diana en un sistema biológico que comprende dotar un sistema biológico con una sustancia diana que está marcada con una proteína azul de cobre. Se proporcionan las condiciones que permiten a la proteína azul de cobre emitir una señal y se observa o se mide la señal. La sustancia diana se monitoriza basándose en la señal. El método de monitorización puede comprender determinar la ubicación de la sustancia diana y/o cuantificar la cantidad de sustancia diana en el sistema biológico.

En otra realización, la invención, usando el método de monitorización de una sustancia diana descrito anteriormente, proporciona un método de determinación de la citotoxicidad de un fármaco de interés. La sustancia diana, una célula, se marca con una proteína azul de cobre y se expone al fármaco de interés. La célula se monitoriza y la citotoxicidad del fármaco de interés se determina en función de si la célula se ve influenciada o no por el fármaco de interés.

La invención también proporciona un método de marcaje de una proteína de interés que comprende fusionar una proteína de interés a una proteína azul de cobre. En una realización adicional, la invención proporciona un método de marcaje de una célula de interés que comprende introducir en la célula una proteína azul de cobre o la unión a la membrana de la célula de una proteína azul de cobre.

La invención proporciona además un método para detectar una célula que expresa una proteína de interés que comprende introducir en la célula una molécula de ADN que tiene una secuencia de ADN que codifica para la proteína de interés y una molécula de ADN adicional que tiene una secuencia de ADN que codifica para una proteína azul de cobre. Se proporcionan entonces las condiciones que permiten la expresión de la proteína azul de cobre y la proteína de interés. Se proporcionan también las condiciones que permiten emitir una señal a la proteína azul de cobre. La célula que expresa la proteína de interés se detecta observando o midiendo la señal de la proteína azul de cobre.

En otra realización, la invención proporciona un método para ubicar una proteína de interés en una célula que comprende introducir en la célula una molécula de ADN que comprende una secuencia de ADN que codifica para la proteína de interés, unida a una secuencia de ADN adicional que codifica para una proteína azul de cobre. Las dos secuencias se unen de tal forma que la proteína producida por la molécula de ADN tendrá la proteína de interés fusionada a la proteína azul de cobre. Se proporcionan las condiciones que permiten la expresión de la proteína fusionada. Se proporcionan también las condiciones que permiten emitir una señal a la proteína azul de cobre. La

ubicación de la proteína fusionada, y de este modo la ubicación de la proteína de interés en la célula, se determinan observando y midiendo la señal.

- La invención también proporciona un método de selección de un agente terapéutico para tratar una enfermedad.
- 5 Una célula que sea una diana de la enfermedad se marca con la proteína azul de cobre y se proporcionan las condiciones que permiten emitir una señal a la proteína. Se determina si el agente terapéutico es eficaz tratando la enfermedad monitorizando la señal observada o medida de la célula. En una realización adicional, los métodos de la invención pueden usarse para seleccionar un agente terapéutico para tratar una infección vírica o bacteriana que comprende
- 10 marcar el virus o la bacteria con una proteína azul de cobre. Se proporcionan las condiciones que permiten emitir una señal a la proteína azul de cobre y se observa o se mide la señal. La eficacia del agente terapéutico para tratar la infección vírica o bacteriana se determina observando o midiendo la señal del virus o la bacteria.

- La invención también contempla una célula eucariota que comprende una secuencia de ADN que codifica para una proteína azul de cobre. En una realización, la célula eucariota es una célula animal, la proteína azul de cobre es azurina
- 15 y la secuencia de ADN comprende el gen *azu*.

- Se explicarán en parte objetivos adicionales y ventajas adicionales de la invención en la descripción que sigue, y en parte serán obvios a partir de la descripción o se aprenderán con la práctica de la invención. Se comprenderán y se lograrán los objetivos y ventajas de la invención por medio de los elementos y combinaciones particularmente señalados en las reivindicaciones adjuntas. Se entenderá que tanto la descripción general anterior como la descripción
- 20 detallada que sigue son a modo de ejemplo y explicativas solamente y no son restrictivas de la invención reivindicada.

Breve descripción de los dibujos

- 25 La figura 1 representa los cebadores usados para amplificar el gen *azu* a partir de ADN bacteriano por PCR: los cebadores en 5' BCP-1C o BCP-2C, y el cebador en 3' BCP-1NC.

- La figura 2 es un mapa del vector pLNCX-BCP1: 5'MoMuLVTR: 145-733; Ψ^+ (señal de empaquetamiento extendida): 803-1612; gen de resistencia a la neomicina (Neo^r): 1656-2450; promotor CMV de expresión precoz (Pcmv): 2800-3617; gen BCP1: 3622-4701; 3'MoMuLVTR: 4128-4720; gen de resistencia a la ampicilina (B-lactamasa, Amp^r): 6023-6865.
- 30

- El vector pLNCX-BCP1 se depositó en las Colecciones Coordinadas Belgas de Microorganismos ubicadas en la Universiteit Gent - Laboratorium voor Moleculaire Biologie, el 3 de agosto de 2000, y el número de registro es LMBP4156.
- 35

Las figuras 3 A-D representan las inmunotransferencias de tipo western de lisados celulares. Las inmunotransferencias confirman la expresión de azurina.

40 Descripción detallada de la invención

- Ahora se hará referencia en detalle a las realizaciones de la invención actualmente preferidas. La invención, en un aspecto, proporciona un método de monitorización de al menos una sustancia diana en un sistema biológico que comprende marcar una sustancia diana en el sistema biológico con una proteína azul de cobre. Entonces Se proporcionan las condiciones que permiten emitir una señal a la proteína azul de cobre y entonces puede observarse o medirse la señal. La señal puede usarse para monitorizar la sustancia diana que incluye, pero no se limita a, la ubicación o posición de la sustancia diana en el sistema biológico y/o la cantidad de sustancia diana en el sistema biológico.
- 45

- Una apoproteína de unión a metal, tal como se define en el presente documento, es cualquier proteína o péptido que adquiere un color detectable al unirse a uno o más iones metálicos o cambia de color al unirse a un ión metálico o un ión metálico adicional. El color obtenido o el cambio de color observado también puede variar con el estado de oxidación del ión metálico. En una realización, la invención utiliza esta característica como marcador para el análisis de un proceso biológico que incluye, pero no se limita a, cualquier proceso dentro o fuera de las células, en ensayos *in vitro* o para observar células o procesos en tejidos o en organismos completos. En una realización adicional, la apoproteína de unión a metal incluye grupos o familias de proteínas de unión a metal que conllevan un color intenso o un cambio de color al unirse a un metal.
- 50
- 55

- Las apoproteínas de unión a metal adquieren un color detectable o cambian de color al unirse a un ión metálico a diferencia de las proteínas que generan un color mediante una reacción enzimática o proteínas que contienen un luminóforo. Así, las apoproteínas de unión a metal, que adquieren un color intrínseco, fácilmente detectable, proporcionan un marcador novedoso.
- 60

- Las apoproteínas de unión a metal son una colección heterogénea de proteínas de varias fuentes que incluyen proteínas azules de cobre en bacterias y proteínas de mamíferos como la hemoglobina, catalasa y transferina. La mayor ventaja del uso de apoproteínas de unión a metal como marcadores comparado con el uso de genes o marcadores indicadores existentes es el hecho de que pueden detectarse fácilmente sin la necesidad de manipulaciones adicionales o del uso de equipo sofisticado y caro. Como muchas de esas proteínas no se producen en células de mamíferos son marcadores perfectos para introducir en tales células (por ejemplo, en ensayos de diagnóstico).
- 65

Hasta la fecha, las apoproteínas de unión a metal no se han usado como marcadores en pruebas analíticas, pruebas de diagnóstico o selección de fármacos. Una patente (patente de los EE.UU. número 5.210.019) describe el uso de la azurina, una proteína azul de cobre, para detectar bacterias pseudomonas. Sin embargo esas bacterias expresan naturalmente la azurina, es decir, la proteína no se introdujo en la bacteria con la intención de usarla como marcador de un proceso interno o externo. La azurina se usa sólo para detectar la presencia de la bacteria como tal. De forma similar, la solicitud PCT, WO 99/30730A1, describe el uso la proteasa de unión a metales superóxido dismutasa, sin embargo, no hay una descripción de la proteína de unión a metal como molécula indicadora o marcador.

La apoproteína de unión a metal de la presente invención es una proteína azul de cobre, un derivado o mutante de una proteína azul de cobre o cualquier secuencia de proteínas o péptidos con las características de unión a cobre de una secuencia de proteína azul de cobre tal como se describe posteriormente. En células vivas, el cobre lleva a cabo diversas funciones fisiológicas en asociación con proteínas metabólicas específicas, por ejemplo, la participación en reacciones de transferencia electrónica, varias reacciones enzimáticas y transporte o almacenamiento del propio metal. Las proteínas de cobre y más específicamente las proteínas azules de cobre, consisten en una amplia variedad de proteínas (familias) normalmente con un color que puede cambiarse a otros colores dependiendo del pH y/o mutaciones. Kroes, S.J., *et al.*, *Eur. J. Biochem.* 240(2), 342-351 (1996) y E. Solomon, *Chemical Reviews*; 1996; 96(7); 2239-2314. Las proteínas de cobre pueden clasificarse según su función biológica, según el tipo de centro de cobre, según el número de centros prostéticos y según la similitud de secuencia.

Alternativamente a las proteínas de cobre, otras apoproteínas metálicas pueden incluir proteínas unidas a un metal de transición como Co, Ni, Mn, Zn, Fe, o un metal alcalino como Ca, Mg, Na y K.

En la presente invención, la apoproteína de unión a metal es al menos una proteína azul de cobre, o un derivado o mutante de una proteína azul de cobre. Según la clasificación de las proteínas de cobre por su centro de cobre, las proteínas azules de cobre forman una clase distinta. En esta clase, pueden dividirse en tres grupos: las proteínas azules de cobre pequeñas (por ejemplo, azurinas, pseudoazurinas, familia de las plastocianinas, y familia de las fitocianinas), las oxidasas azules (por ejemplo, ascorbato oxidasa, ceruloplasmina, y lacasa) y nitrito reductasa.

Las proteínas azules de cobre, también denominadas como proteínas de cobre "tipo 1", incluyen pero no se limitan a proteínas pequeñas que se unen a un sólo átomo de cobre y que se caracterizan por su absorción muy intensa en la región de 600nm debido una transición de transferencia de carga de un residuo de cisteína. Sin limitarse a la teoría, hay una relación entre el espectro de EPR de las proteínas azules de cobre, la intensidad relativa de los picos importantes en el espectro de absorción UV/VIS, y la estructura del centro activo. Basándose en estos parámetros observados, las proteínas azules de cobre más ampliamente observadas pueden dividirse en cuatro clases estructurales.

La primera clase consiste en las proteínas azules de cobre clásicas, siendo su ejemplo más estudiado la plastocianina. Aquí la cisteína y los dos residuos de histidina forman un plano con el átomo de cobre (II) situado ligeramente por encima. La distancia $S_{Cys}-Cu(II)$ es muy corta ($\pm 2,1$ Å). Axial con este plano, el cuarto residuo de metionina, está a una gran distancia ($\pm 2,9$ Å). La estructura global del centro activo es tetraédrica o trigonal distorsionada (C_{3v}).

Un segundo grupo de proteínas azules de cobre incluye aquellas proteínas en las que se coordinan uniones con cinco residuos: las azurinas. El enlace adicional se forma a través de un oxígeno carbonílico que se une al cobre en el lado opuesto a la metionina. El residuo de metionina está a una distancia ligeramente mayor que en la plastocianina ($\pm 3,1$ Å). El grupo carbonilo está a aproximadamente 3,0 Å. El espectro de EPR de las proteínas que pertenecen a la primera y segunda clase es del tipo axial y sólo muestran un pico intenso cerca de los 600nm en el espectro de absorción.

Una tercera clase de proteínas azules de cobre incluye aquellas proteínas que tienen las mismas cuatro uniones de coordinación que en la plastocianina, pero que están dispuestas en una conformación más distorsionada. La longitud del enlace $S_{Cys}-Cu(II)$ aumenta simultáneamente con la disminución de la longitud del enlace $S_{Met}-Cu(II)$. El espectro de EPR es rómbico y hay un aumento en la región de absorción de 460 nm. Una cuarta clase de proteínas azules de cobre está formada por aquellas proteínas que tienen una unión axial con un residuo que es diferente de la metionina.

Aunque hay una apreciable cantidad de divergencia en la secuencia de las proteínas azules de cobre, los sitios de ligando de cobre en muchas de las proteínas se conservan y muestran el siguiente patrón: $[GA]-x(0,2)-[YSA]-x(0,1)-[VFY]-x-C-x(1,2)-[PG]-x(0,1)-H-x(2,4)-[MQ]$. Véase <http://bess.u-strasbg.fr/BioInfo/Prosites/00174.pdoc>. Una disposición plana trigonal distorsionada especial de dos ligandos histidina y un ligando cisteína alrededor del cobre da lugar a las propiedades electrónicas muy peculiares del sitio del metal: un color azul intenso que es aproximadamente 100 veces más intenso que muchos complejos inorgánicos del cobre (transferencia de carga Cys-S-Cu), espectro de EPR axial con constantes de acoplamiento hiperfino pequeñas y potenciales redox altos. La apoproteína de unión a metal para su uso en la práctica de la invención es una proteína azul de cobre con esas características.

Los miembros mejor conocidos de esta clase de proteínas son las plastocianinas de cloroplastos vegetales, que intercambian electrones con el citocromo c6, y las azurinas bacterianas relacionadas de manera distante, que intercambian electrones con el citocromo 551. Otras proteínas azules de cobre incluyen, pero no se limitan a, amicianinas de bacterias tales como *methylobacterium extorquens* o *thiobacillus versutus* que pueden crecer en metilamina; auracianinas A y B de *chloroflexus aurantiacus*; proteína azul de cobre *alcaligenes faecalis*; cupredoxina (CPC) de mondaduras de

pepino; cusacianina (proteína azul básica, plantacianina, CBP) de pepino; halocianina de *natrobacterium pharaonis*, una proteína de unión a cobre asociada a la membrana; pseudoazurina de pseudosomas; rusticianina de *thiobacillus ferrooxidans*; estelacianina del árbol de la laca japonés; umecianina de raíces de rábano; y alérgeno Ra3 de ambrosía. Garret T.P.J., y cols., *J. Biol. Chem.* 259:2822-2825 (1984); Ryden L.G., & Hunt L.T., *J. Mol. Evol.* 36:41-66 (1993);

5 McManus J.D., y cols., *J. Biol. Chem.* 267:6531-6540 (1992); Mann K., y cols., *FEBS Lett.* 314:220-223 (1992); Mattar S., y cols., *J. Biol. Chem.* 269:14939-14945 (1994); Yano T., y cols., *FEBS Lett.* 288:159-162 (1991).

La señal emitida por una proteína azul de cobre puede ser cualquier cambio o adquisición de color o cambio en la intensidad del color azul. Color, tal como se usa en el presente documento, se define como cualquier señal cromática.

10 En una realización, el color observado o detectado está en el intervalo de longitud de onda visible o ultravioleta. El color tal como se define en el presente documento puede ser también una señal fluorescente o luminiscente. La señal puede observarse o medirse mediante cualquier medio conocido en la técnica incluyendo, pero no limitándose a, detección visible a simple vista, un microscopio, tubo de fotones, o diodo. En una realización, se mide u observa la frecuencia, duración, intensidad, y/o ubicación de la señal en un sólo punto en el tiempo o como una función del

15 tiempo.

Tal como se define en el presente documento, un sistema biológico puede ser cualquier sistema biológico o bioquímico *in vitro* o *in vivo* que incluye pero no se limita a cualquier célula o cultivo celular, virus, bacteria, planta o animal o cualquier parte o sistema simulado del mismo. En la práctica de la invención, la sustancia diana puede ele-

20 girse de cualquier célula, tal como una célula bacteriana, fúngica, vegetal o animal, cualquier tejido, cualquier virus, o cualquier proteína. Células animales adecuadas incluyen, pero no se limitan a, células Vero, células HeLa, células Cos, células CV1 y varias células primarias de mamíferos. En una realización, la célula bacteriana es *Escherichia coli*. La sustancia diana también puede ser un fármaco o tratamiento terapéutico que se marca para seguir su actividad o función *in vivo* o *in vitro*. En una realización, la proteína azul de cobre está unida, por ejemplo, mediante enlace

25 covalente o iónico, a un tejido, célula, y/o una proteína, o se prepara una proteína de fusión entre una o más proteínas de interés y una o más proteínas azules de cobre.

Una célula también puede marcarse introduciendo una proteína azul de cobre en la célula o transfectando la célula con una molécula de ADN que codifica para una proteína azul de cobre. Una proteína azul de cobre también puede

30 unirse o anclarse a la membrana de una célula o bien dentro o bien fuera de la pared celular. La proteína azul de cobre puede proporcionarse a una célula, tejido o proteína de interés *in vivo* o *in vitro*.

También dentro de la práctica de la invención está una célula eucariota que comprende una secuencia de ADN que codifica para una proteína azul de cobre. La célula eucariota puede ser una célula animal y en una realización, la

35 secuencia de ADN comprende el gen azu.

En una realización la proteína azul de cobre puede usarse como gen indicador. El gen indicador puede insertarse en una célula y la célula puede comprender una molécula de ADN que tiene un elemento regulador de un gen, diferente de un gen que codifica para una proteína azul de cobre operativamente unida a una secuencia de ADN que codifica

40 para la proteína azul de cobre. Tal como se usa en el presente documento, un "elemento regulador" de un gen es una secuencia de ADN que es necesaria para la expresión del gen. En esta invención, el término "operativamente unida" significa que siguiendo una unión tal que el elemento regulador puede dirigir la expresión de la secuencia de ADN unida. Un gen que codifica para una proteína azul de cobre incluye moléculas de ADN que codifican para análogos de polipéptidos, fragmentos o derivados de polipéptidos antigénicos que difieren de formas que se producen de manera

45 natural en cuanto a identidad o ubicación de uno o más residuos de aminoácidos (análogos de delección que contienen menos que todos los residuos especificados para la proteína, análogos de sustitución en los que se sustituyen uno o más residuos especificados por otros residuos y análogos de adicción en los que se añaden uno o más residuos de aminoácidos en una parte terminal o media de los polipéptidos) y que comparten algunas o todas las propiedades de las formas que se producen de manera natural.

Estas moléculas de ADN incluyen: la incorporación de codones "preferidos" para la expresión por huéspedes no mamíferos seleccionados; la provisión de sitios para la escisión por enzimas endonucleasas de restricción; y la provisión de secuencias adicionales de ADN iniciales, terminales o intermedias que facilitan la construcción de vectores expresados fácilmente.

50

En una realización, las proteínas azules de cobre pueden unirse a un promotor que responde por sí mismo a un proceso intracelular. Cualquier influencia (por ejemplo, por un fármaco añadido a la célula) en ese proceso afectaría a la velocidad de expresión de la proteína de unión a metal y por ello podría monitorizarse midiendo la intensidad del color de la célula.

60

Un experto ordinario en la técnica podrá determinar las condiciones que deben proporcionarse para permitir a la proteína azul de cobre emitir una señal que depende de la proteína azul de cobre elegida y la aplicación prevista. Las condiciones apropiadas pueden incluir, pero no se limitan a, pH variable, fuerza iónica, potencial redox intracelular, proporcionar un metal para unirse a la proteína azul de cobre, y alterar la carga del metal.

65

Por ejemplo, para proporcionar las condiciones que permiten a la azurina emitir una señal, por ejemplo, color azul, deben cumplirse dos condiciones: (1) la azurina tiene que unirse al cobre o bien antes o bien después de marcar la sustancia diana, y (2) la proteína tiene que estar en un estado oxidado. Además, esas condiciones tienen que ser

compatibles con las condiciones de cultivo o *in vivo* del sistema biológico. El Cu^{2+} libre, por ejemplo, es tóxico para las células, incluso en concentraciones relativamente bajas.

La azurina se une al cobre con alta afinidad (la unión del cobre está termodinámicamente favorecida con la energía de unión del Cu(II) que supera la de otros iones de transición), y el complejo cobre-proteína resultante es muy estable. Por tanto cantidades bajas, no tóxicas, de Cu^{2+} en el medio (en un intervalo de entre 0,5 a 1 μM) deben permitir la unión irreversible del metal con la azurina. En una realización, el transporte de cobre en un sistema biológico puede producirse por circulación de proteínas, que llevan el Cu^{2+} a diferentes oxidasas que contienen cobre en el sistema vesicular.

Sin limitarse a la teoría, el intenso color azul de la azurina es una propiedad de la forma oxidada del Cu(II) , que posee una banda de absorción fuerte visible a 628 nm ($\epsilon = 5700 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), mientras que la forma Cu(I) es incolora. La azurina oxidada es la forma más estable, pero el potencial de reducción de los complejos de Cu está fuertemente influenciado por el medio y la fuerza iónica, y el color azul de los complejos de Cu(II) pierde intensidad con la disminución del pH. Así, en una realización, un cambio en el medio o en la fuerza iónica del medio puede proporcionar la condición que permite a la proteína azul de cobre emitir una señal.

En una realización posterior, el pH fisiológico del citoplasma celular permite la formación de la proteína funcional. Sin embargo, como el potencial de reducción del entorno celular es, sin embargo, bastante bajo, favoreciéndose así la forma incolora de Cu(I) , en una realización, se lisa una célula en el punto final del ensayo para la detección del color azul de la azurina expresada en un tampón de lisis con pH, concentración de cobre y potencial de reducción compatibles.

En otra realización, uno puede elegir como diana la proteína azul de cobre expresada en orgánulos “oxidativos” específicos como las mitocondrias, vesículas post-Golgi y peroxisomas. Según la función biológica de la azurina, por ejemplo, las mitocondrias son los orgánulos apropiados para la expresión de la proteína. La azurina pertenece a una familia de proteínas que funcionan en las cadenas respiratorias de bacterias y plantas desnitrificantes como agentes de transferencia electrónica. Su función es transportar electrones entre diferentes oxidasas (por ejemplo, citocromo c y citocromo oxidasa, ATPasas). La selección como diana de las proteínas en las mitocondrias puede llevarse a cabo fácilmente situando una señal de selección como diana mitocondrial delante de la secuencia codificante para el gen azu.

La selección como diana de la azurina en las mitocondrias tiene una ventaja adicional en la concentración de la proteína expresada. Aunque la expresión de los constructos pLNCX-BCP1/2 está inducida por el fuerte promotor constitutivo CMV, la cantidad de azurina en algunos sistemas puede ser insuficiente para la detección eficaz del color azul, porque no hay amplificación enzimática de la señal (= color azul). La selección como diana de las proteínas en las mitocondrias concentra el color azul, lo que debe permitir una detección más precisa. El rendimiento de proteína también puede aumentarse situando un potenciador traduccional directamente en el sentido de 5' de la secuencia codificante para la azurina. De este modo pueden lograrse niveles de expresión de hasta cinco veces más altos. Como resultado de la selección como diana y expresión potenciada, los “píxeles” azules mitocondriales deben detectarse y medirse fácilmente con, por ejemplo, un microscopio electrónico, un microscopio confocal, una cámara de color o el microscopio Tibotec de múltiples muestras tal como se describe en la publicación de patente de los EE.UU. número US2003/0142398.

Hay incontables aplicaciones en las que pueden aplicarse los métodos y composiciones de la presente invención. Por ejemplo, en una realización, la invención proporciona un método para detectar al menos una célula que expresa una proteína de interés. Puede insertarse una molécula de ADN que tiene una secuencia de ADN que codifica para una o más proteína(s) de interés y una molécula de ADN adicional que tiene una secuencia de ADN que codifica para una o más proteína(s) azul(es) de cobre en la célula. Proporcionando las condiciones que permiten a la proteína azul de cobre emitir una señal, puede detectarse la célula que expresa la proteína de interés observando o midiendo la señal de la proteína azul de cobre. La molécula de ADN y la molécula de ADN adicional pueden estar unidas.

En otra realización, la invención proporciona un método para ubicar al menos una proteína de interés en una célula. Aquí, se introduce en la célula una molécula de ADN que comprende una secuencia de ADN que codifica para la al menos una proteína de interés, unida a una secuencia de ADN adicional que codifica para una proteína azul de cobre. Las secuencias se unen de tal modo que la proteína producida por la molécula de ADN tendrá la al menos una proteína de interés fusionada a la proteína azul de cobre. La ubicación de la proteína fusionada puede determinarse a partir de la señal de la proteína de fusión expresada, ubicando así la proteína de interés en la célula.

La invención incluye el uso de estas proteínas o péptidos en tecnologías de descubrimiento de fármacos y pruebas de diagnóstico. En una realización, la invención proporciona un fármaco o tratamiento descubiertos, identificados o diseñados usando los métodos descritos en el presente documento.

Los métodos de la invención son aplicables especialmente en dispositivos de evaluación o prueba de alto rendimiento. La invención también podría usarse en la selección de alto rendimiento de fármacos. En esta área, la velocidad de selección se considera como uno de los obstáculos más importantes en el proceso de descubrimiento de fármacos. Una simplificación de la detección de un indicador o marcador es una forma de acelerar el proceso de selección. Las proteínas azules de cobre son ideales para este fin. No habría necesidad de manipulaciones adicionales para la detección y así podría utilizarse en ensayos homogéneos, haciéndolos adecuados para la automatización. El hecho de no haber necesidad de equipo de detección sofisticado y caro es otra ventaja directa importante.

Está dentro la práctica de la invención preparar una bandeja de muestras o soporte sólido compuesto por numerosos pocillos de reacción, de tal manera que cada reacción permanece aislada de las otras reacciones. La transferencia simultánea de uno o más reactivos a los pocillos de reacción puede lograrse entonces mediante una de las muchas técnicas usadas en la técnica del análisis de alto rendimiento.

Pueden variarse uno o más de los contenidos de cada pocillo de reacción. Por ejemplo, en una realización, cada pocillo de reacción contiene el mismo sistema biológico y una sustancia diana marcada con la proteína azul de cobre. Sin embargo, se añade después un fármaco a cada pocillo de reacción. Los pocillos de reacción pueden formar una serie o pueden emplearse otros medios de identificación o direccionamiento de cada pocillo. La actividad de cada pocillo de reacción puede entonces determinarse automáticamente a partir de la cantidad de señal de la proteína azul de cobre detectada, y registrarse. Otras realizaciones incluyen, pero no se limitan a la variación de la concentración de uno o más de los componentes.

Hay numerosos métodos para el manejo de alto rendimiento, es decir, analizar un gran número de muestras en un periodo de tiempo relativamente corto. Puede aplicarse cualquier método de análisis de alto rendimiento disponible a los métodos de la invención. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a: patente de los EE.UU. número 5.985.215 de Sakazume y cols., titulada *Analyzing Apparatus Having a Function Pipette Samples*; patente de los EE.UU. número 6.046.056 de Parce y cols., titulada *High Throughput Screening Assay Systems in Microscale Fluidic Devices*; documento WO 00/14540 de Pauwels y cols., titulado *Method For the Rapid Screening of Analytes*; documento WO 99/30154 de Beutel y cols., titulado *Continuous Format High Throughput Screening*; y documento WO 99/67639 de Wada y cols., titulado *High Throughput Methods, Systems and Apparatus for Performing Cell Based Screening Assays*.

En una realización específica, las proteínas azules de cobre pueden usarse como indicador en pruebas de diagnóstico, tales como análisis de sensibilidad a fármacos, tal como se realiza según el documento WO 97/27480. En una realización, la invención proporciona un método de selección de un agente terapéutico para tratar una enfermedad que comprende marcar al menos una célula que es una diana de la enfermedad con una proteína azul de cobre. Si el agente terapéutico es eficaz tratando la enfermedad se determina monitorizando la señal observada o medida de la proteína azul de cobre y, por ello, de la célula.

La invención también proporciona un método de selección de un agente terapéutico para tratar una infección vírica o bacteriana. Se marca el virus o la bacteria con una proteína azul de cobre y se proporcionan las condiciones que permiten a la proteína azul de cobre emitir una señal. Si el agente terapéutico es eficaz tratando la infección vírica o bacteriana se determina monitorizando la señal observada o medida del virus.

En una realización, el virus es el virus VIH y se usan las proteínas azules de cobre para la selección de fármacos que son eficaces contra el VIH. Por ejemplo, el gen que codifica para esta proteína podría unirse operativamente a un promotor activo constitutivamente de una célula CD4⁺. Si el fármaco es inactivo contra el virus, la adición del fármaco y del virus VIH a la célula CD4⁺ destruirá esa célula porque el virus es capaz de entrar y destruir la célula. La célula no expresará la proteína de unión a metal más y perderá su color. Si es un fármaco activo contra el virus, el virus no puede destruir la célula y la célula mantendrá su color.

La citotoxicidad de fármacos también podría determinarse con el uso de esos marcadores novedosos. En este caso, el gen que codifica para la proteína azul de cobre puede unirse operativamente a un promotor activo constitutivamente e introducirse en una célula. Las células vivas, que no se ven influenciadas por un fármaco se detectarían ya que continúan soportando la expresión génica y así expresando la proteína de unión a metal dando a la célula un color intenso. Si un fármaco es tóxico para la célula, no habrá más expresión génica del marcador y el color de la célula desaparecería.

Además, puede preverse el uso de una proteína azul de cobre o péptido relacionado en casi cualquier aplicación en la que se usa una proteína verde fluorescente (GFP) (o mutantes relacionados de la misma). Muchos usos de la GFP (proteína verde fluorescente) se describen / cubren por el documento US 5.491.084. Un ejemplo es el uso de la GFP (modificada) en un ensayo de farnesil-transferasa que se describió recientemente (documentos PCT/EP00/04923 y PCT/EP/004919) en la que una proteína de unión a metal coloreada se incorporaba en una proteína de fusión que contenía un sitio de escisión (tal como DVED para caspasas) junto con secuencias de Ras que seleccionan como diana la proteína de fusión entera en la membrana plasmática. Cualquier acción de una proteasa, tal como caspasa, produciría una redistribución detectable de la proteína de unión a metal en la célula.

Una proteína azul de cobre puede también sustituir a los indicadores usados actualmente en pruebas de diagnóstico tales como el procedimiento antiVirogramTM descrito en el documento WO 97/27480.

La invención también proporciona un kit. El kit puede usarse en cualquiera de los métodos descritos en el presente documento. En una realización, el kit puede usarse para monitorizar al menos una sustancia diana en un sistema biológico. El kit de la invención puede comprender una proteína azul de cobre y/o una secuencia de ADN que codifica para una proteína azul de cobre. El kit puede comprender además un plásmido para suministrar la secuencia de ADN que codifica para una proteína azul de cobre a una célula. En otra realización, un kit comprende una célula eucariota que comprende una secuencia de ADN que codifica para una proteína azul de cobre.

Ejemplos

Ejemplo 1

5 Construcción de pLNCX-BCP1 y pLNCX-BCP2

La bacteria *Achromobacter xylosoxidans* subespecie *denitrificans* (o *Alcaligenes denitrificans*) se compró a la ATCC (número ATCC 15173, NCTC 8582). El gen *azu* que codifica para la azurina se amplificó por PCR a partir de ADN bacteriano y se clonó en un vector de expresión de mamífero. El gen *azu* codifica para una preproteína en la que la azurina madura (130 AA) está precedida por un péptido señal de 19 AA. Este péptido probablemente sirva para el fin de translocar la proteína a través de la membrana periplasmática. Se clonó la proteína completa (con el péptido señal) para no tener dificultades con el plegamiento correcto de la proteína. En un segundo constructo, se situó una señal de secreción (= secuencia líder de κ de Ig) antes del gen, para permitir la secreción en el medio.

Se clonó el gen *azu* en el vector retroviral pLNCX (Clontech). Este vector, derivado del virus de la leucemia murina de Moloney (MoMuLV), se diseña para suministro y expresión génica retroviral. Contiene un gen de resistencia a la neomicina (Neo^r) controlado por TLR (Terminaciones Largas Repetidas) virales en 5' (5'TLR) para la selección de antibióticos en células eucariotas y un sitio de clonación (*HindIII*, *HpaI* y *ClaI*) en el sentido de 3' desde un promotor de expresión precoz de citomegalovirus (Pcmv). La secuencia Ψ^+ es una señal de empaquetamiento viral extendida que se requiere para empaquetar en viriones el transcripto del vector viral. pLNCX no contiene los genes estructurales virales (gag-pol y env) necesarios la formación y replicación de partículas, sin embargo, pueden proporcionarse en trans en las líneas celulares de empaquetamiento que expresan de forma estable esos genes.

El gen *azu* se amplificó en ADN bacteriano por PCR usando los cebadores en 5' BCP-1C (SEQ ID: 1) o BCP-2C (SEQ ID: 3), y el cebador en 3' BCP-1NC (SEQ ID: 2)(figura 1). Los cebadores en 5' se diseñan para que contengan una secuencia de iniciación de la traducción (Kozak) antes del codón ATG de iniciación. El cebador BCP-2C (SEQ ID: 3) incluye la secuencia líder de κ de Ig para la secreción de BCP en el medio. Los cebadores en 3' incluyen el codón de terminación nativo de la proteína. Los cebadores también contienen un sitio de restricción (*HindIII* para los cebadores en 5' y *EcoRI* para los cebadores en 3') que permite una subclonación fácil del gen *azu*.

El producto de la PCR se clonó, después de la restricción con *HindIII*, en el sitio *HindIII*-*HpaI* de pLNCX (figura 2).

Ejemplo 2

35 Transfección y detección de azurina en células eucariotas

La proteína azurina es una proteína azul de cobre que se caracteriza por una absorción intensa cerca de 600 nm que produce un color azul cuando el Cu^{2+} está unido a la proteína. La proteína se expresa por diferentes cepas de bacterias. La proteína de color azul se expresó en células eucariotas, y se usó como una alternativa a diferentes sistemas indicadores (β -gal, GFP,...) en ensayos basados en células. El experimento mostró que la expresión y detección constitutivas de la proteína podrían usarse como un marcador de viabilidad.

Se transfectaron transitoriamente células 293T, células renales embrionarias humanas transformadas con el antígeno T, con los constructos pLNCX-BCP1 o pLNCX-BCP2 usando el reactivo de transfección Effectene (Qiagen). SDS-PAGE (al 15%) seguido de inmunotransferencia de tipo Western de los lisados celulares confirmaron la expresión de la azurina por ambos constructos (figura 3).

La azurina se detectó en lisados celulares (lisados celulares (10^6 células/muestra)) con anticuerpo policlonal anti-azurina de *A. denitrificans* (Leiden Institute of chemistry, Gorlaeus laboratories). La inmunotransferencia de tipo Western mostrada en la figura 3 se puede interpretar como sigue:

55	Carril 1: Marcador de amplio rango teñido previamente de Biorad	Carril 2: 15 μl de muestra
	Carril 3: 10 μl de muestra	Carril 4: 7,5 μl de muestra
	Carril 5: 5 μl de muestra	Carril 6: 2,5 μl de muestra
60	Carril 7: control negativo (células no transfectadas)	Carril 8: vacío
	Carril 9: azurina de <i>A. denitrificans</i>	Carril 10: azurina de <i>P. aeruginosa</i>

65

REIVINDICACIONES

1. Método de monitorización de al menos una sustancia diana en un sistema biológico *in vitro* que comprende:

- a) proporcionar dicho sistema biológico que comprende dicha al menos una sustancia diana;
- b) marcar dicha al menos una sustancia diana con al menos una proteína azul de cobre;
- c) proporcionar condiciones que permiten que dicha al menos una proteína azul de cobre emita una señal;
- d) observar o medir la señal;
- e) monitorizar dicha al menos una sustancia diana basándose en la señal observada o medida.

2. Método según la reivindicación 1, en el que dicha etapa de monitorización comprende determinar la ubicación de dicha al menos una sustancia diana en dicho sistema biológico.

3. Método según la reivindicación 1, en el que dicha etapa de monitorización comprende cuantificar la cantidad de dicha al menos una sustancia diana en dicho sistema biológico.

4. Método según la reivindicación 1, en el que dicho sistema biológico se elige de entre un virus, bacteria, planta o animal.

5. Método según la reivindicación 1, en el que dicha al menos una sustancia diana se elige de entre una célula o un tejido.

6. Método según la reivindicación 5, en el que dicha célula se elige de entre una célula bacteriana, fúngica, vegetal o animal.

7. Método según la reivindicación 5, en el que dicha célula se marca transfectando dicha célula con una molécula de ADN que codifica para dicha al menos una proteína azul de cobre.

8. Método según la reivindicación 5, en el que dicha célula se marca uniéndola a dicha al menos una proteína azul de cobre.

9. Método según la reivindicación 5, en el que dicha al menos una proteína azul de cobre se proporciona a dicha célula *in vivo*.

10. Método según la reivindicación 5, en el que dicha al menos una proteína azul de cobre se proporciona a dicha célula *in vitro*.

11. Método de determinación de citotoxicidad de un fármaco de interés que comprende:

- a) exponer al menos una célula al fármaco de interés;
- b) monitorizar la al menos una célula usando el método según la reivindicación 5;
- c) determinar la citotoxicidad del fármaco de interés determinando si la al menos una célula está bajo la influencia del fármaco de interés.

12. Método según la reivindicación 5, en el que dicha al menos una proteína azul de cobre se une a dicho tejido.

13. Método según la reivindicación 1, en el que dicha al menos una sustancia diana es una proteína.

14. Método según la reivindicación 13, en el que dicha proteína se marca preparando una proteína de fusión con dicha proteína y al menos una proteína azul de cobre.

15. Método según la reivindicación 1, en el que dichas condiciones que permiten a dicha al menos una proteína azul de cobre emitir una señal comprenden proporcionar cobre que se une a dicha al menos una proteína azul de cobre.

16. Método según la reivindicación 15, en el que dicha proteína azul de cobre se elige de entre azurina, pseudo-azurina, una plastocianina, y una fitocianina.

17. Método según la reivindicación 15, en el que dicha proteína azul de cobre es una oxidasa azul obtenida de entre ascorbato oxidasa, ceruloplasmina, y lacasa.

18. Método según la reivindicación 15, en el que dicha proteína azul de cobre es una nitrito reductasa.

ES 2 267 556 T3

19. Método para detectar al menos una célula que expresa una proteína de interés que comprende

5 a) introducir en dicha al menos una célula de una molécula de ADN que tiene una secuencia de ADN que codifica para la proteína de interés y una molécula de ADN adicional que tiene una secuencia de ADN que codifica para al menos una proteína azul de cobre;

b) proporcionar condiciones que permiten la expresión de al menos una proteína azul de cobre y la proteína de interés;

10 c) proporcionar condiciones que permiten que la al menos una proteína azul de cobre emita una señal; y

d) detectar la célula que expresa la proteína de interés observando o midiendo la señal de la al menos una proteína azul de cobre.

15 20. Método según la reivindicación 19, en el que dicha molécula de ADN y dicha molécula de ADN adicional se unen.

20 21. Método según la reivindicación 19, en el que dicha célula se elige de entre una célula bacteriana, fúngica, vegetal o animal.

22. Método para ubicar al menos una proteína de interés en una célula que comprende

25 a) introducir en dicha célula una molécula de ADN que comprende una secuencia de ADN que codifica para al menos una proteína de interés, unida a una secuencia adicional de ADN que codifica para al menos una proteína azul de cobre, de manera que la proteína producida por la molécula de ADN tendrá la al menos una proteína de interés fusionada a al menos una proteína azul de cobre;

b) proporcionar condiciones que permiten la expresión de la proteína fusionada;

30 c) proporcionar condiciones que permiten que la al menos una proteína azul de cobre emita una señal; y

d) determinar la ubicación de la proteína fusionada a partir de la señal, ubicando de este modo la proteína de interés en la célula.

35 23. Método de selección de un agente terapéutico para el tratamiento de una enfermedad que comprende:

a) marcar al menos una célula que es una diana de la enfermedad con al menos una proteína azul de cobre;

40 b) proporcionar condiciones que permiten que dicha al menos una proteína azul de cobre emita una señal;

c) observar o medir la señal;

d) determinar si el agente terapéutico es eficaz para tratar la enfermedad mediante la monitorización de la señal observada o medida de la célula.

45 24. Método para seleccionar un agente terapéutico para el tratamiento de una infección vírica o bacteriana que comprende:

a) marcar del virus o la bacteria con al menos una proteína azul de cobre;

50 b) proporcionar condiciones que permiten que dicha al menos una proteína azul de cobre emita una señal;

c) observar o medir la señal;

55 d) determinar si el agente terapéutico es eficaz para tratar la infección vírica o bacteriana mediante la monitorización de la señal observada o medida del virus o la bacteria.

25. Método según la reivindicación 24, en el que dicho virus es el virus VIH.

60 26. Célula eucariota que comprende una secuencia de ADN que codifica para azurina.

27. Célula eucariota según la reivindicación 26, en la que dicha célula eucariota es una célula animal.

28. Célula eucariota según la reivindicación 26, en la que dicha secuencia de ADN comprende el gen azu.

65

Figura 1

Diseño de los cebadores

5' cebador BCP-1C (SEQ ID:1)

5' - gac aga agc ttc gcc acc atg ctg gca aaa gcc ac -3'

< HindIII > < Kozak > gen azu >

3' cebador BCP-1NC (SEQ ID:2)

5' - gac aga att cag ttg ctg agc ttg agc gtg -3'

< EcoRI > < gen azu >

5' cebador BCP-2C (SEQ ID:3)

5' - gac aga agc ttc gcc acc atg gag aca gac aca ctg ctg cta tgg gta ctg ctg
ctc

< HindIII > < Kozak > < secuencia líder de κ de Ig >

tgg gtt cca ggt tcc act ggt gac atg ctg gca aaa gcc ac -3'

< gen azu >

Figura 2

Información del vector pLNCX-BCP1

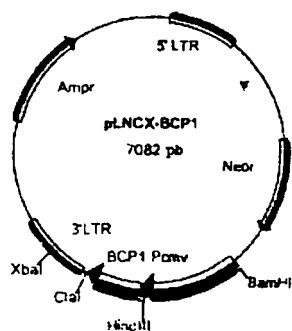


Figura 3-A

Immunotransferencia 1: BCP1 (muestra 1), anticuerpo:
anti-azurina de *A. denitrificans*

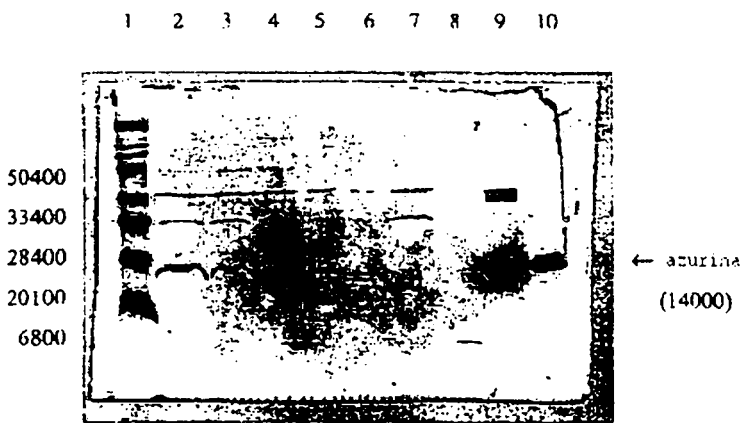


Figura 3-B

Immunotransferencia 2: BCP1 (muestra 2), anticuerpo:
anti-azurina de *P. aeruginosa*

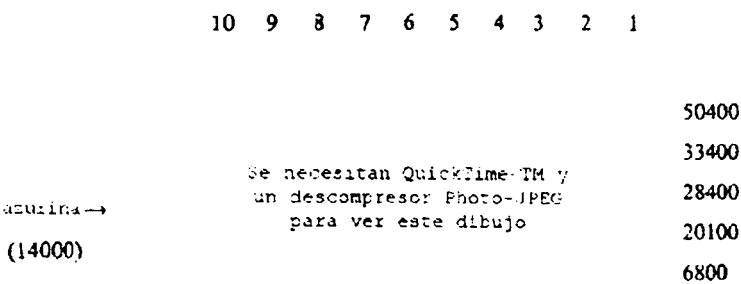


Figura 3-C

Inmunotransferencia 3: BCP2 (muestra 3), anticuerpo:
anti-azurina de *A. denitrificans*

10 9 8 7 6 5 4 3 2 1

		50400
		33400
azurina →	Se necesitan QuickTime-TM y	28400
(14000)	un decompresor Photo-JPEG	20100
	para ver este dibujo	6800

Figura 3-D

Inmunotransferencia 4: BCP2 (muestra 4), anticuerpo:
anti-azurina de *P. aeruginosa*

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

50400		
33400		
28400	Se necesitan QuickTime-TM y	
20100	un decompresor Photo-JPEG	← azurina
6800	para ver este dibujo	(14000)

ES 2 267 556 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> TIBOTEC NV

5 <120> USO DE PROTEÍNAS DE UNIÓN A METAL COLOREADAS
<130> TIP-4PCT
<140>
<141>

10 <150> DOCUMENTO US 60/147.339
<151> 1999-08-06
<160> 3

15 <170> PatentIn Ver. 2.1
<210> 1
<211> 35
<212> ADN

20 <213> Secuencia artificial
<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador en 5' BCP-1C
<400> 1

25
gacagaagct tcgccaccat gctggcaaaa gccac 35

<210> 2

30 <211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador en 3' BCP-1NC
<400> 2

40 gacagaattc agtgctcag cttgagcgtg 30

<210> 3
<211> 98

45 <212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>

50 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador en 5' BCP-2C
<400> 3

55 **gacagaagct tcgccaccat ggagacagac acactcctgc tatgggtact gctgctctgg 60**
gttccaggtt ccactgggtga catgctggca aaagccac 98

60

65