



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 315 039**

② Número de solicitud: 200402723

⑤ Int. Cl.:
C12N 15/53 (2006.01)
C12Q 1/28 (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **05.11.2004**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **16.03.2009**

Fecha de la concesión: **16.12.2009**

⑭ Fecha de anuncio de la concesión: **30.12.2009**

⑮ Fecha de publicación del folleto de la patente:
30.12.2009

⑰ Titular/es: **Universidad de Sevilla**
OTRI-Pabellón de Brasil
Paseo de las Delicias, s/n
41012 Sevilla, ES
Consejo Superior de Investigaciones Científicas

⑱ Inventor/es: **Rosa Acosta, Miguel Ángel de la;**
Cerda Haynes, Berta de la;
Molina Heredia, Fernando Publio;
Rodríguez Roldán, Vicente;
Hervás Morón, Manuel;
García Heredia, José Manuel y
Navarro Carruesco, José Antonio

⑲ Agente: **No consta**

⑳ Título: **Construcción génica que codifica para el citocromo c y procedimiento de obtención.**

㉑ Resumen:

Construcción génica que codifica para el citocromo c y procedimiento de obtención.

Se describe una construcción génica que comprende (i) una primera secuencia de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para un citocromo c, y (ii) una segunda secuencia de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para un péptido señal; en donde el extremo 5' de dicha primera secuencia de ácido nucleico está unido al extremo 3' de dicha segunda secuencia de ácido nucleico. Dicha construcción génica puede ser utilizada para construir vectores útiles para transformar, junto con un vector que comprende los genes necesarios para la maduración del citocromo c, una célula hospedadora y producir citocromo c.

ES 2 315 039 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Construcción génica que codifica para el citocromo *c* y procedimiento de obtención.

5 Campo de la invención

La invención se relaciona, en general, con un procedimiento para la producción de citocromo *c* a partir de genes sintéticos clonados en un sistema apropiado. La invención también se refiere a construcciones génicas que comprenden la secuencia codificante del citocromo *c* unida a una secuencia que codifica un péptido señal, vectores y células hospedadoras apropiadas para la puesta en práctica de dicho procedimiento.

10 Antecedentes de la invención

El citocromo *c* es una proteína soluble mitocondrial que participa en la cadena respiratoria de animales y plantas y en la apoptosis. La proteína se sintetiza en forma de apoproteína de unos 12 kDa, que es transportada a través de la membrana externa de la mitocondria y pasa a localizarse en el espacio intermembrana, donde la enzima citocromo *c* hemo liasa cataliza la unión covalente de una molécula de hemo al extremo amino terminal, quedando constituida la proteína funcional, con una estructura globular y un peso de 12,5 kDa aproximadamente.

En el espacio intermembrana de la mitocondria, el citocromo *c* realiza el transporte de electrones desde el complejo citocromo *c* reductasa a la citocromo *c* oxidasa en la cadena de transporte de electrones respiratoria, lo que proporciona energía en forma de ATP para los procesos celulares dependientes de energía.

Aparte de la función mencionada, el citocromo *c* es uno de los componentes claves en la respuesta celular a daños graves e infecciones, conocida como apoptosis o muerte celular programada. Mediante la apoptosis, los organismos pluricelulares controlan su salud eliminando células que han sido dañadas de modo irreversible por causas diversas y limitan la extensión de las infecciones mediante el suicidio celular.

El citocromo *c* sale de la mitocondria al citosol en respuesta a una serie de estímulos que indican que la célula está estresada. Dichos estímulos causan la apertura de unos poros transitorios en la membrana mitocondrial, que permiten la salida del citocromo *c* al citosol donde se une a otras moléculas (Apaf-1, procaspasa-9 y dATP), para formar el llamado apoptosoma. Dicho apoptosoma activa la caspasa-9, que activa las caspasas-3, 6 y 7 que son enzimas efectoras de la apoptosis.

Actualmente se relaciona la disfunción en la apoptosis (por exceso o por defecto) con enfermedades degenerativas, coronarias y con cáncer, por lo que la producción del citocromo *c* humano tiene indudable interés para el desarrollo de métodos diagnósticos (por ejemplo mediante el diseño de anticuerpos) o cualquier otra aplicación terapéutica. En cuanto a las plantas, la apoptosis es la respuesta a distintos tipos de estrés e infecciones, por lo que las aplicaciones de métodos diagnósticos basados en niveles de citocromo *c* tiene interés en la optimización de cultivos. Por tales motivos, sería conveniente disponer de un sistema que permitiera producir citocromo *c*, de cualquier especie, de forma sencilla y económica, en las cantidades deseadas.

Tanaka *et al.* (J. Biochem., 1988, 103, 954-961) describen la producción de citocromo *c* humano en pequeñas cantidades (sólo realizan estudios analíticos) a partir de ADN complementario (ADNc) clonado en un plásmido y expresado en *Saccharomyces cerevisiae*.

Compendio de la invención

Tal como se ha mencionado previamente, sería conveniente disponer de un sistema útil para producir, en las cantidades deseadas, citocromo *c*, de cualquier especie, de forma sencilla y económica. Los inventores han observado que es posible cumplir dicho objetivo mediante el desarrollo de una construcción génica que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para un citocromo *c* fusionada por su extremo 5' al extremo 3' de una secuencia de nucleótidos que codifica para un péptido señal.

Por tanto, en un aspecto, la invención se relaciona con dicha construcción génica que comprende: (i) una primera secuencia de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para un citocromo *c*, y (ii) una segunda secuencia de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para un péptido señal, en donde el extremo 5' de dicha primera secuencia de ácido nucleico está unido al extremo 3' de dicha segunda secuencia de ácido nucleico. Dicha construcción génica puede contener, además, secuencias de ácido nucleico adicionales que incluyan un sitio de unión al ribosoma y una región terminadora de la traducción.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un vector que comprende dicha construcción génica. Dicho vector puede ser utilizado para transformar una célula hospedadora apropiada capaz de expresar la construcción génica de la invención.

En otro aspecto, la invención se relaciona, por tanto, con una célula hospedadora que comprende dicha construcción o dicho vector.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un procedimiento para la producción de citocromo *c* que comprende cultivar una célula hospedadora co-transformada con (i) un vector que comprende dicha construcción génica y con (ii) un vector que comprende los genes necesarios para la maduración del citocromo *c*, y, si se desea, aislar y purificar el citocromo *c* producido.

Un procedimiento como el proporcionado por esta invención permite obtener citocromo *c* de forma sencilla, económica y reproducible, en las cantidades deseadas.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 ilustra la secuencia de nucleótidos del gen sintético que codifica para el citocromo *c* de *Arabidopsis* sp. Los extremos cohesivos *Bam*HI y *Eco*RI se incorporan a los extremos 5' y 3' respectivamente de la construcción para facilitar la inserción en el vector de expresión pBluescript II (SK+) (PBS).

La Figura 2 muestra la secuencia de nucleótido del gen sintético que codifica para el citocromo *c* humano. Los extremos cohesivos *Bam*HI y *Eco*RI se incorporaron a los extremos 5' y 3' respectivamente de la construcción para facilitar la inserción en el vector de expresión PBS.

La Figura 3 ilustra los vectores pCitH y pCitA que se construyeron insertando el gen sintético en el sitio de clonación del plásmido PBS. El gen se encuentra bajo el control del promotor *lac*. Delante del gen se traduce primero un fragmento truncado del gen *lacZ*, cuya señal de fin de la traducción (en negrita) se solapa con el inicio de la traducción del gen. En los recuadros punteados se muestran las secuencias de unión a ribosomas. Tras el inicio de la traducción del gen aparece la secuencia AAA (en un recuadro) la cual se corresponde con un potenciador del inicio de la traducción.

Descripción detallada de la invención

En un aspecto, la invención se relaciona con una construcción génica, en adelante construcción génica de la invención, que comprende:

- a) una primera secuencia de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para un citocromo *c*, y
- b) una segunda secuencia de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para un péptido señal;

en donde el extremo 5' de dicha primera secuencia de ácido nucleico está unido al extremo 3' de dicha segunda secuencia de ácido nucleico.

La primera secuencia de ácido nucleico contiene la secuencia de nucleótidos que codifica para el citocromo *c* respiratorio de cualquier especie. No obstante, en una realización particular, dicha primera secuencia de ácido nucleico se selecciona entre la secuencia de nucleótidos que codifica para el citocromo *c* de *Arabidopsis thaliana* (SEQ ID NO: 1) y la secuencia de nucleótidos que codifica para el citocromo *c* de *Homo sapiens* (SEQ ID NO: 12).

La segunda secuencia de ácido nucleico contiene la secuencia de nucleótidos que codifica para un péptido señal. Tal como se utiliza en esta descripción, "péptido señal" se refiere a una secuencia de aminoácidos presente en el extremo amino terminal de formas precursoras (pre-proteínas) de proteínas de membrana o de proteínas que se exportan o secretan al exterior celular (es decir, proteínas que sufren una translocación desde su sitio de síntesis hasta la membrana citoplasmática o a través de la misma) que es esencial para iniciar dicha translocación aunque resulta escindido durante la misma. En general, un péptido señal comprende una secuencia de 15-30 restos de aminoácidos de los cuales, en el extremo amino terminal suele haber uno o más aminoácidos básicos, en la parte central suele haber unos 6 ó 7 aminoácidos hidrófobos, y el extremo carboxilo terminal es hidrófilo y contiene la zona reconocida y cortada por la peptidasa del líder. El aparato para la exportación de la proteína consta de una serie de proteínas, denominadas "proteínas Sec" (sistema secretor normal). Las principales proteínas Sec parece que forman un complejo en la membrana citoplasmática. Durante su tránsito a través del sistema Sec, una proteasa especial, denominada endopeptidasa del líder o peptidasa Led rompe el final de la secuencia señal de la pre-proteína y la proteína madura pasa al otro lado de la membrana citoplasmática o queda en dicha membrana. Por tanto, dicho péptido señal, codificado por la segunda secuencia de ácido nucleico de la construcción génica de la invención, interviene en el transporte a través de la membrana de la proteína codificada por dicha primera secuencia de ácido nucleico, así como en su maduración. De forma más concreta, en la presente invención, el péptido señal constituye una señal celular para que la proteína a la que está unida (citocromo *c*) sea transportada a través de la membrana citoplasmática y, a la vez, el sistema de maduración separe a la proteína de dicho péptido señal mediante el reconocimiento de una secuencia de corte para rendir la proteína madura (citocromo *c*). Prácticamente cualquier péptido señal susceptible de ser reconocido por un sistema de expresión apropiado, tal como un sistema de expresión procariota o eucariota, podría ser utilizado en la presente invención. No obstante, en una realización particular, dicho sistema de expresión es un sistema de expresión procariota y dicho péptido señal puede ser un péptido señal perteneciente al sistema Sec (reconocido y madurado correctamente por sistemas procariotas) o péptidos señal de otros sistemas de transporte, tales como los de las hidrogenasas. A modo ilustrativo, dicho péptido señal podría ser, por ejemplo, el péptido señal de la lipoproteína de *Serratia marcescens*, el de la proteína de unión a maltosa MalE, el de la β -lactamasa de *Staphylococcus aureus*, el de la

ES 2 315 039 B1

proteína transportadora PhoE (OmpE) de *Escherichia coli*, el de la fosfatasa alcalina PhoA, etc. No obstante, en una realización particular, dicha segunda secuencia de ácido nucleico de la construcción génica de la invención comprende la secuencia de nucleótidos que codifica para el péptido señal del citocromo *c*₆ de *Anabaena* sp. (SEQ ID NO: 2).

5 La construcción génica de la invención puede contener, ventajosamente, secuencias de ácido nucleico adicionales útiles para aumentar la producción y/o para facilitar la purificación del citocromo *c* codificado por dicha primera secuencia de ácido nucleico presente en la construcción génica de la invención.

10 Por tanto, en una realización particular, la construcción génica de la invención comprende, además de dichas primera y segunda secuencias de ácido nucleico, una tercera secuencia de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que define un sitio de unión al ribosoma, en donde el extremo 3' de dicha tercera secuencia de ácido nucleico está unido al extremo 5' de dicha segunda secuencia de ácido nucleico. El sitio de unión al ribosoma, que precede a la región codificante en el ARN mensajero (ARNm), comprende la región a la que se une el ribosoma para comenzar la traducción. Adicionalmente, si se desea, dicha tercera secuencia de ácido nucleico puede incluir una
15 región potenciadora del inicio de la traducción.

En otra realización particular, la construcción génica de la invención comprende, además de dichas primera y segunda secuencias de ácido nucleico, una cuarta secuencia de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que define una región terminadora de la traducción, en donde el extremo 5' de dicha cuarta secuencia de
20 ácido nucleico está unido al extremo 3' de dicha primera secuencia de ácido nucleico.

En otra realización particular, la construcción génica de la invención comprende, además de dichas primera y segunda secuencias de ácido nucleico, dichas tercera y cuarta secuencias de ácido nucleico previamente definidas. En este caso, dichas tercera y cuarta secuencias de ácido nucleico están separadas entre sí por dichas primera y segunda
25 secuencias de ácido nucleico. A modo ilustrativo, el extremo 3' de dicha tercera secuencia de ácido nucleico está unido al extremo 5' de dicha segunda secuencia de ácido nucleico y, a su vez, dicha segunda secuencia de ácido nucleico está unida por su extremo 3' al extremo 5' de dicha primera secuencia de ácido nucleico, la cuál se encuentra, a su vez, unida por su extremo 3' al extremo 5' de dicha cuarta secuencia de ácido nucleico.

30 Para facilitar el clonaje de la construcción génica de la invención en un vector, dicha construcción génica de la invención puede contener, ventajosamente, una secuencia de ácido nucleico que define una secuencia de reconocimiento de una primera enzima de restricción en el extremo 5' de la construcción génica de la invención, y otra secuencia de ácido nucleico que define una secuencia de reconocimiento de una segunda enzima de restricción en el extremo 3' de dicha construcción, en donde dichas primera y segunda enzimas de restricción pueden reconocer dianas de restricción
35 iguales o diferentes. En una realización particular de la invención, la construcción génica de la invención comprende, en su extremo 5', una secuencia de nucleótidos que define una diana de restricción para la enzima *EcoRI* y, en su extremo 3', una secuencia de nucleótidos que define una diana de restricción para la enzima *BamHI*.

40 La construcción génica de la invención puede obtenerse mediante el empleo de técnicas ampliamente conocidas en el estado de la técnica por los expertos en la materia (Sambrook *et al.* (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2ª ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor Laboratory, NY.).

45 La construcción génica de la invención puede ser insertada en un vector apropiado. Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con un vector que comprende dicha construcción génica de la invención. 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 la construcción génica proporcionada por la invención puede ser un plásmido o un vector que, cuando se introduce en la 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*).

50 El vector de la invención puede ser utilizado para transformar células susceptibles de ser transformadas por dicho vector. Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con una célula hospedadora que comprende la construcción génica de la invención o un vector proporcionado por esta invención, que ha sido transformada con dicho vector proporcionado por esta invención. En general, dicha célula hospedadora proporcionada por esta invención es capaz de expresar la secuencia de ácido nucleico codificante del citocromo *c* y del péptido señal presentes en la construcción
55 génica de la invención.

Aunque dicha célula hospedadora puede ser una célula eucariota, en una realización preferida de esta invención, la célula a transformar es una célula procariota, tal como una bacteria, que puede ser Gram positiva o Gram negativa, tal como *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida*, *Salmonella tiphymurium*, etc. En una realización particular, la
60 bacteria transformada es *Escherichia coli*.

Cuando la célula a transformar con el vector proporcionado por esta invención es una célula eucariota, por ejemplo, una levadura, habría que utilizar plásmidos, codones, secuencias de unión al ribosoma y señales de transporte y maduración propias de dichas células eucariotas.

65 La construcción génica de la invención puede ser utilizada para producir una proteína eucariota (citocromo *c*) en una célula hospedadora. Dicha célula hospedadora puede ser una célula eucariota o, ventajosamente, una célula procariota.

ES 2 315 039 B1

El citocromo *c* lleva como grupo prostético un grupo hemo que la célula hospedadora ha de producir e incorporar a la apoproteína para obtener la proteína madura. Por tanto, para producir citocromo *c* es necesario que la célula hospedadora exprese la maquinaria celular requerida para el transporte y la unión del grupo hemo a la proteína y para el correcto plegamiento y maduración de ésta, lo que puede conseguirse co-transformando la célula hospedadora que comprende la construcción génica de la invención o el vector proporcionado por la invención con un segundo vector que comprende los genes necesarios para la maduración del citocromo *c*. En una realización particular, dicho segundo vector que incluye los genes necesarios para llevar a cabo la maduración del citocromo *c* comprende los genes *ccm* de *E. coli* que, como es conocido, son necesarios para la maduración de citocromo *c* en el periplasma de *E. coli*.

Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con una célula hospedadora que comprende la construcción génica de la invención o un vector proporcionado por la invención y un segundo vector que comprende los genes necesarios para la maduración del citocromo *c*, tal como los genes *ccm*. Dicha célula hospedadora puede obtenerse mediante co-transformación con un vector proporcionado por la invención y con un segundo vector que comprende los genes necesarios para la maduración del citocromo *c*. En una realización particular, dicha célula hospedadora co-transformada con dichos vectores es una célula procariota, tal como una bacteria, por ejemplo, *E. coli*.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un procedimiento para producir citocromo *c*, en forma de proteína madura, que comprende cultivar una célula hospedadora proporcionada por esta invención bajo condiciones que permiten la producción de dicho citocromo *c*. Las condiciones para llevar a cabo y optimizar el cultivo de la célula hospedadora de la invención, dependerán de la célula hospedadora utilizada, y son conocidas por los expertos en la materia.

De forma más concreta, la invención proporciona un procedimiento para producir citocromo *c* que comprende:

- a) co-transformar una célula hospedadora con (i) un vector proporcionado por esta invención que comprende la construcción génica de la invención y con (ii) un vector que comprende los genes necesarios para la maduración del citocromo *c*, tal como los genes *ccm*;
- b) cultivar una célula hospedadora co-transformada según la etapa a), bajo condiciones que permiten la expresión de la secuencia de nucleótidos que codifica para el citocromo *c* fusionado al péptido señal, y
- c) si se desea, aislar y purificar el citocromo *c*.

La co-transformación de dicha célula hospedadora con dichos vectores puede realizarse por métodos convencionales conocidos por los técnicos en la materia (Sambrook *et al.* (1989) citado *supra*). Las condiciones para llevar a cabo y optimizar el cultivo de la célula hospedadora dependen de la célula hospedadora utilizada y son conocidas por los expertos en la materia. Asimismo, el citocromo *c* producido puede ser, si se desea, aislado y purificado mediante procedimientos convencionales conocidos por los expertos en la materia. En el Ejemplo 1.4 se describe un procedimiento para aislar y purificar citocromo *c* de *A. thaliana* y citocromo *c* humano.

Prácticamente cualquier citocromo *c*, de cualquier especie, tanto animal (incluida el hombre) como vegetal, puede ser obtenido mediante el procedimiento proporcionado por esta invención. Para ello, basta con insertar la secuencia de ácido nucleico que codifica para el citocromo *c* deseado. Dicha secuencia es conocida o puede ser obtenida en las bases de datos o bien puede ser obtenida en base a la información de secuencias ortólogas en otras especies cuyas secuencias codificantes del citocromo *c*, o la secuencia de aminoácidos del citocromo *c*, sean conocidas.

En una realización particular, el citocromo *c* producido mediante el procedimiento proporcionado por esta invención es citocromo *c* humano (*H. sapiens*) o citocromo *c* de *A. thaliana*.

El citocromo *c* producido según el procedimiento de esta invención puede ser utilizado en cualquiera de sus aplicaciones habituales. A modo ilustrativo, el citocromo *c* humano puede ser utilizado, por ejemplo, en el desarrollo de métodos diagnósticos contra enfermedades degenerativas y coronarias; asimismo, el citocromo *c* de *A. thaliana* puede ser utilizado en la optimización de cultivos en el caso de vegetales.

El siguiente ejemplo sirve para ilustrar la invención y no debe ser considerado con fines limitativos de la misma.

Ejemplo 1

Producción de citocromo c humano y de Arabidopsis thaliana

1.1 Construcción del gen artificial que comprende la secuencia codificante de citocromo *c* de *Arabidopsis thaliana*

Para el diseño de este gen artificial se partió de la secuencia de aminoácidos del citocromo *c* de *A. thaliana* que se encuentra recogida en la base de datos NCBI con el número de acceso NP_192742. A partir de la secuencia aminoacídica de dicha proteína se diseñó el gen sintético por traducción reversa mediante el empleo de la aplicación informática Backtranslation tool v 2.0, a la que se accede desde la página web de Entelechon, seleccionándose los codones más frecuentes de *E. coli*. La secuencia del gen sintético codificante del citocromo *c* de *A. thaliana* obtenida por traducción reversa tiene la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 1.

ES 2 315 039 B1

A dicho gen sintético se le realizaron las siguientes modificaciones:

- al extremo 5' se le añadieron las siguientes secuencias:

- 5 • una secuencia que comprende la secuencia codificante del péptido de tránsito del citocromo c_6 de *Anabaena* [SEQ ID NO: 2];
- una secuencia que comprende un sitio de unión al ribosoma (aggagg); y
- 10 • una secuencia que comprende un sitio de corte de la enzima de restricción *BamHI* (ggatcc); y

- al extremo 3' se le añadieron las siguientes secuencias:

- 15 • una secuencia que comprende un terminador doble de la traducción (tgatga); y
- una secuencia que comprende un sitio de corte de la enzima de restricción *EcoRI* (gaattc).

La presencia de dichos sitios de corte de las enzimas de restricción *BamHI* en el extremo 5' y *EcoRI* en el 3' es necesaria para unir toda la construcción con el plásmido pBS (Stratagene).

El gen artificial resultante, que comprende la secuencia codificante del citocromo *c* de *A. thaliana*, tiene la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 3.

La obtención de dicho gen sintético se realizó mediante la reacción en cadena de la polimerasa de ADN (PCR), usando dos oligonucleótidos convencionales [SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5] y seis oligonucleótidos [SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 11]. Cinco de dichos oligonucleótidos [SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 10] son largos (de entre 68 y 107 bases) y solapan por sus extremos en unas 20 bases. Los oligonucleótidos fueron generados mediante síntesis química por la empresa Sigma-Genosys.

Brevemente, la mezcla de PCR contenía: 2,2 mM de cada deoxinucleótidotrifosfato (dNTP), 1 μ M de cada oligonucleótido (CR1, CR2, A1, A2, A3, A4, A5 y A6) [SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 11], 1 U de la polimerasa Expand High Fidelity (Roche) y su correspondiente tampón estándar, con $MgCl_2$, en un volumen final de reacción de 50 μ L, más 50 μ L de aceite mineral. El programa de la PCR fue: 1 min a 95°C, 1 min a 46°C, 2 min a 72°C, más 30 ciclos de 1 min a 95°C, 1 min a 55°C, 2 min a 72°C y un paso final de 10 min a 72°C en una máquina Mastercycler 53330 (Eppendorf). De esta primera PCR se obtuvo el ADN molde que se usó en una segunda PCR para amplificar el gen. El ADN que iba a usarse como molde se purificó por medio de un sistema comercial (GFX PCR ADN y Gel Band Purification Kit, de Amersham Biosciences) siguiendo las instrucciones del fabricante y se cuantificó en un gel de agarosa (tal como se explica más adelante). En la segunda PCR se usaron las mismas condiciones que en la primera y la mezcla de reacción fue la siguiente: 1 nM de ADN molde, 2,2 mM de cada dNTP, 1 μ M de los oligonucleótidos CR1 y A6 [SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 11], 1U de la polimerasa Expand High Fidelity (Roche) y su correspondiente tampón estándar, con $MgCl_2$, en un volumen final de reacción de 50 μ L, más 50 μ L de aceite mineral.

El resultado de la PCR se visualizó y cuantificó por electroforesis en un gel de agarosa al 1% (p/v) en tampón TBE (Tris-borato 90 mM, EDTA 2 mM, pH 8) diluido al 50% (v/v) y con bromuro de etidio a una concentración de 5 μ g/mL. Este proceso se realizó según un protocolo estándar (Sambrook *et al.* (1989) citado *supra*). Del gel de agarosa se extrajeron las bandas correspondientes al tamaño de ADN esperado [437 pares de bases (pb)]. Las electroforesis se llevaron a cabo en aparatos ADN Sub Cell (Bio-Rad). A cada muestra se añadió 1/10 del volumen de tampón de carga, que es una mezcla de azul de bromofenol 0,25% (p/v), xileno-cianol 0,25% (ply) y glicerol 30% (v/v) en agua.

Para determinar el tamaño y la cantidad de ADN de los fragmentos sometidos a electroforesis se compararon con marcadores comerciales (DNA molecular Weight Marker VII, X y XIII de Roche Applied Science).

Tras la electroforesis se visualizó el ADN iluminando con luz UV de 302 nm, utilizándose para ello un transiluminador LKB modelo Macro Vue. Los geles se fotografiaron con un equipo UVP Imagestore GDS-5000. Los fragmentos fueron purificados mediante el sistema comercial GFX PCR ADN y Gel Band Purification Kit de Amersham Biosciences según las instrucciones del fabricante, resultando el ADN puro para las siguientes manipulaciones. Las secuencias amplificadas fueron clonadas en el vector pGEM-T (del pGEM-T cloning kit II de Promega) que es un plásmido linealizado en *EcoRV* y que lleva una timidina terminal añadida a cada extremo 3'. Esta característica mejora su ligación con fragmentos de ADN procedentes de PCR, ya que muchas polimerasas de ADN añaden una adenina al extremo 3' de las cadenas de ADN que sintetizan. Éste es el caso de una parte de las moléculas de ADN que sintetiza la polimerasa de ADN Expand High Fidelity. Para la clonación en pGEM-T se realizó una ligación, en la cual se mezclaron en un vial cantidades de plásmido y de ADN amplificado en proporción 1:3, junto con 3 U de ADN ligasa T4 y su tampón, en un volumen final de 10 μ L, se incubó la reacción durante 16 horas a 16°C y posteriormente se utilizó el ADN resultante en una transformación de *E. coli*. Para esta parte del trabajo se utilizó la estirpe DH5 α . Para realizar una transformación es necesario preparar previamente las células de forma que puedan adquirir el ADN, denominándose entonces células competentes.

ES 2 315 039 B1

1.2 Construcción del gen artificial que comprende la secuencia codificante de citocromo *c* de *Homo sapiens*

Para el diseño de este gen artificial se siguió sustancialmente el mismo protocolo que el descrito previamente en relación con la construcción del gen artificial que comprende la secuencia codificante de citocromo *c* de *A. thaliana* (apartado 1.1). En este caso, se partió de la secuencia de aminoácidos del citocromo *c* de *H. sapiens* que se encuentra recogida en la base de datos NCBI con el número de acceso AAH05299 y, a partir de dicha secuencia de aminoácidos se diseñó el gen sintético por traducción reversa mediante el empleo de la aplicación informática Backtranslation tool v 2.0, seleccionándose el empleo de codones de *E. coli*. La secuencia del gen sintético codificante del citocromo *c* de *H. sapiens* obtenida por traducción reversa tiene la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 12.

A dicho gen sintético se le realizaron las mismas modificaciones que al gen sintético codificante del citocromo *c* de *A. thaliana* obtenida por traducción reversa (apartado 1.1). El gen artificial resultante, que comprende la secuencia codificante del citocromo *c* de *H. sapiens*, tiene la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 13.

La obtención de dicho gen sintético se realizó mediante PCR, usando dos oligonucleótidos convencionales [SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5] y ocho oligonucleótidos [SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20 y SEQ ID NO: 21]. Algunos de dichos oligonucleótidos [SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 y SEQ ID NO: 20] son largos (de entre 61 y 101 bases) y solapan por sus extremos en unas 20 bases. Los oligonucleótidos fueron generados mediante síntesis química por la empresa Sigma-Genosys.

Brevemente, la mezcla de PCR contenía: 2,2 mM de cada dNTP, 1 μ M de cada oligonucleótido (CR1, CR2, H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7 y H8) [SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20 y SEQ ID NO: 21], 1 U de la polimerasa Expand High Fidelity (Roche) y su correspondiente tampón estándar, con MgCl₂, en un volumen final de reacción de 50 μ L, más 50 μ L de aceite mineral. El programa de la PCR fue el mismo que el utilizado en el apartado 1.1. De la primera PCR se obtuvo el ADN molde que se usó en una segunda PCR para amplificar el gen. El ADN que iba a usarse como molde se purificó tal como se ha indicado previamente y se cuantificó en un gel de agarosa (apartado 1.1). En la segunda PCR se usaron las mismas condiciones que en la primera y la mezcla de reacción fue la siguiente: 1 nM de ADN molde, 2,2 mM de cada dNTP, 1 μ M de los oligonucleótidos CR1 y H8 [SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 21], 1U de la polimerasa Expand High Fidelity (Roche) y su correspondiente tampón estándar, con MgCl₂, en un volumen final de reacción de 50 μ L, más 50 μ L de aceite.

El resultado de la PCR se visualizó y cuantificó por electroforesis en un gel de agarosa al 1% (p/v) en tampón TBE diluido al 50% (v/v) y con bromuro de etidio a una concentración de 5 μ g/mL, tal como se ha indicado previamente (apartado 1.1). Del gel de agarosa se extrajeron las bandas correspondientes al tamaño de ADN esperado [416 pb]. Las electroforesis se llevaron a cabo de la forma indicada en el apartado 1.1.

El tamaño y la cantidad de ADN de los fragmentos sometidos a electroforesis fueron determinados comparando con marcadores comerciales (DNA molecular Weight Marker VII, X y XIII de Roche Applied Science) tal como se indica en el apartado 1.1.

Tras la electroforesis el ADN se visualizó con luz UV de 302 nm y los geles se fotografiaron (apartado 1.1). Los fragmentos fueron purificados según lo indicado en el apartado 1.1, resultando el ADN puro para las siguientes manipulaciones. Las secuencias amplificadas fueron clonadas en el vector pGEM-T (Promega) según el protocolo mencionado en el apartado 1.1 y el ADN resultante se utilizó posteriormente para transformar células competentes de *E. coli* DH5 α según el protocolo que se describe a continuación.

1.3 Transformación de células competentes de *E. coli*

Para la preparación de células competentes de *E. coli* se cultivaron en 100 mL de medio líquido SOB (Tryptona 20 g/L, extracto de levadura 5 g/L, NaCl 0,5 g/L, KCl 2,5 mM y MgCl₂ 10 mM) con agitación vigorosa hasta alcanzar una absorbancia de 0,45-0,65 a 580 nm. Tras mantener el cultivo en hielo durante 10 min, las células se recogieron por centrifugación (5 min a 750 x g, 4°C) y se resuspendieron en 30 mL de solución RF1 (tampón acetato potásico 30 mM, pH 5,8, RbCl₂ 100 mM, MnCl₂ 50 mM, CaCl₂ 10 mM y glicerol al 15% (p/v)) fría esterilizada por filtración. Tras mantener la solución en hielo durante 5 min, se repitió el proceso de centrifugación anterior y se resuspendieron las células en 4 mL de solución RF2 fría (tampón MOPS-NaOH 10 mM, pH 7,0, RbCl₂ 10 mM, CaCl₂ 75 mM y glicerol al 15%(p/v)). Las células así preparadas se congelaron en nitrógeno líquido y se conservaron a -80°C en alícuotas de 200 L. La competencia de las células se comprobó transformándolas con cantidades conocidas de ADN plasmídico, obteniéndose en torno a 10⁷ transformantes/ μ g de ADN.

Para transformar las células competentes, el ADN transformante se mezcló con una alícuota de células competentes descongelada en hielo. Tras incubar 30 minutos en hielo, se sometieron a choque térmico de 100 s a 42°C y se volvieron a incubar en hielo durante 2 min. La suspensión se suplementó posteriormente con 0,8 mL de medio LB (NaCl 10 g/L, Tryptona 10g/L, Extracto de levadura 5 g/L, pH 7) y se incubó durante 1 hora a 37°C en agitación. A continuación, las células se sembraron en medio LB sólido (LB más agar a 15 g/L) con ampicilina 100 μ g/mL y se recogieron las placas a las 12 horas.

Dado que el plásmido pGEM-T permite identificar clones portadores de moléculas recombinantes gracias a la inactivación por inserción del gen *lacZ*, el medio se suplementó con X-Gal (0,2 μ M) e IPTG (16 μ M) para seleccionar en medio sólido colonias que llevaran algún inserto que inactivase el gen *lacZ*. Las colonias con plásmidos recombinantes mostraron color blanco, frente al color azul de las que llevaban el plásmido sin inserto. Tras incubar 12 h a 37°C se seleccionaron varios clones de color blanco para analizar su ADN plasmídico, para lo cual se cultivaron en medio LB líquido durante 12h a 37°C y se realizó una minipreparación de ADN de los cultivos mediante el sistema High Pure Plasmid Isolation Kit de Roche. Una pequeña parte del ADN se sometió a análisis de restricción, cortando los plásmidos con *Bam*HI y *Eco*RI (de Roche) y visualizándolos por electroforesis en gel de agarosa. Se seleccionaron los clones que portaban los genes sintéticos.

Se procedió entonces a la clonación direccional en el plásmido que se iba a usar como vector de expresión de las proteínas (pBS). Para ello, se purificaron, tal como se ha explicado con anterioridad, las bandas de ADN correspondientes a los genes cortados en sus extremos con *Bam*HI y *Eco*RI y el plásmido pBS cortado con *Bam*HI y *Eco*RI. Posteriormente se realizó una ligación dirigida de estos fragmentos con el plásmido de modo similar a lo explicado anteriormente, obteniéndose los plásmidos recombinantes pCitA (con el gen sintético que codifica el citocromo *c* de *A. thaliana*) y pCitH (con el gen sintético que codifica el citocromo *c* de *H. sapiens*) [Figura 1]. Una vez construidos los plásmidos por ligación se realizó una transformación de *E. coli* DH5 α con cada uno de los plásmidos recombinantes, se cultivaron en las placas de LB como se ha explicado anteriormente, se seleccionaron los clones de color blanco, se cultivaron los clones en LB líquido, se extrajo el ADN plasmídico de los clones y se analizó mediante restricción con *Bam*HI y *Eco*RI y electroforesis en gel de agarosa, de modo que se seleccionaron tanto los clones de *E. coli* DH5 α que contenían el plásmido pCitA como aquellos que contenían pCitH. Por último, se enviaron los plásmidos purificados a un servicio de secuenciación de ADN (Sistemas Genómicos) para comprobar que la PCR no había introducido modificaciones en las secuencias y se guardaron los clones positivos.

1.4 Expresión y purificación de las proteínas

El citocromo *c* lleva como grupo prostético un grupo hemo que la bacteria ha de producir e incorporar a la apoproteína para obtener la proteína madura. Para superproducir el citocromo *c* es necesario, pues, que *E. coli* sobreexpresara toda la maquinaria celular requerida para el transporte y la unión del grupo hemo a la proteína, y para el correcto plegamiento y maduración de ésta, y eso se consigue co-transformando las células con pCitA o bien pCitH junto con el plásmido pEC86 (Arslan *et al.*, 1998, Biochem. Biophys. Res. Commun. 251, 744-747) que sobreexpresa los genes *ccm* (Th6ny-Meyer *et al.*, 1995, J. Bacteriol. 177, 4321-4326) necesarios para la maduración de citocromos de tipo *c* en el periplasma de *E. coli*. pEC86 se selecciona con una resistencia a cloranfenicol, y los plásmidos derivados de pBS se seleccionan con una resistencia a ampicilina, así que para producir los citocromos *c* se transformó la estirpe de *E. coli* BL21 con ambos plásmidos y se cultivó con los dos antibióticos. La estirpe y las condiciones óptimas para la producción de las proteínas se seleccionaron mediante una serie de pruebas de expresión, en las que se varía la estirpe de *E. coli*, el tiempo, temperatura y condiciones de oxigenación de los cultivos y se valora la producción de citocromo *c* en las diferentes condiciones. La estimación de la producción de citocromo *c* se realiza comparando el espectro de absorción de la solución resultante de la extracción del periplasma de las bacterias, ya que los citocromos *c* en estado reducido tienen un espectro de absorción característico con un máximo a 550 nm.

Para obtener cantidades reproducibles de proteína en las sucesivas rondas de producción, se estableció una fuente común de inóculos bacterianos transformados y congelados. La estirpe seleccionada de *E. coli* fue BL21, y se explica a continuación el protocolo de preparación de dichas células. Brevemente, las células se cultivaron a partir de una colonia en un frasco de LB líquido con 25 mL durante una noche; de ahí se tomó 1 mL y se cultivó de nuevo en un frasco con 25 mL de LB hasta alcanzar la fase de crecimiento exponencial (4-5 h), momento en el que se recogieron las células por centrifugación. A partir de aquí se realizó todo el resto del proceso a 4°C. Se lavaron las células con una solución estéril de glicerol al 10% (p/v) y por último se resuspendieron las células en 2 mL de la misma solución, se congelaron en nitrógeno líquido y se conservaron a -80°C en alícuotas de 50 μ L.

La transformación se realizó por electroporación, tomándose para ello una cubeta de electroporación estéril a la que se añadieron 50 μ L de células electroporables más 1 pL de ADN de pEC86 y 1 μ L de pCitA o pCitH (aproximadamente 40 ng de cada plásmido); la mezcla se incubó en hielo durante 1 minuto y se dio un pulso de corriente en el electroporador Easyject óptima de Equibio a 2.500 V. Inmediatamente se añadió 1 mL de LB, después se incubó en agitación a 37°C durante 1 h y se inoculó con ello un matraz de 50 mL de LB selectivo (con los dos antibióticos). Se mantuvo en agitación a 37°C durante una noche y después se recogieron 30 mL del cultivo por centrifugación, se resuspendieron en 7 mL de una solución de glicerol estéril al 80% y se guardaron las células en alícuotas de 1 mL congeladas en nitrógeno líquido y conservadas a -80°C.

Para producir las proteínas se utilizó una de las alícuotas anteriores para inocular un precultivo de 50 mL, que se dejó crecer hasta alcanzar la fase exponencial, y del cual se tomaron 10 mL para inocular matraces de 5 L conteniendo 3 L de medio LB más hierro para hacer el grupo hemo, en forma de citrato férrico-amónico (6 mg/L) más los dos antibióticos (ampicilina a 100 mg/L y cloranfenicol a 20 mg/L) y se cultivaron las bacterias a 37°C con una agitación de 200 rpm durante 20 h. Las células se recogieron por centrifugación y se resuspendieron en 50 mL de una solución de agua con pequeñas cantidades de benzamidina, fluoruro de fenilmetilsulfonilo, ácido aminocaproico y DNasa I. El periplasma se les extrajo con un choque térmico (congelación en nitrógeno líquido seguida de descongelación a 37°C). Después del choque térmico se centrifugó a 25000 g durante 5 min para separar el extracto de periplasma de los restos celulares y se recogió el sobrenadante. Después de una dilución de 2 volúmenes en tampón borato 1,5 mM, pH 8,5 se

ES 2 315 039 B1

realizó una cromatografía en una columna de carboxi-metil celulosa equilibrada en el mismo tampón. El citocromo *c* salió de la columna a 0,25 M de NaCl, y después de concentrarlo y cambiarlo de tampón a Tricina 20 mM pH 7,5, NaCl 150 mM se realizó una filtración en gel por cromatografía líquida de rápida resolución (FPLC). Al final de todo este proceso se obtuvo un rendimiento de proteína pura de 1 mg/L para el citocromo *c* de *A. thaliana* y de 0,7 mg/L para el citocromo *c* humano.

En la Tabla 1 se recogen algunos parámetros físico-químicos (peso molecular, punto isoeléctrico y potencial red-ox a pH 7,5) de los citocromos *c* de *H. sapiens* y de *A. thaliana* producidos y purificados a partir de *E. coli*. Los espectros de absorción (datos no mostrados) y el potencial redox ponen de manifiesto que los productos obtenidos corresponden a citocromos *c* con sus grupos hemo bien ensamblados y funcionales; asimismo, el punto isoeléctrico y el análisis por MALDI-TOF (Matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight) del peso molecular y de la digestión triptica de ambas proteínas, confirman los datos ya que se han producido los resultados esperados en base a la secuencia de la proteína. La secuencia del extremo amino terminal de las dos proteínas demuestra una correcta maduración de las mismas.

TABLA 1

Comparación de los parámetros físico-químicos de los citocromos c de H. sapiens (humano) y de A. thaliana producidos y purificados de E. coli

	Citocromo <i>c</i> humano	Citocromo <i>c</i> de <i>A. thaliana</i>
Peso molecular	12.236 Da	12.725 Da
Punto isoeléctrico	9,6	9,25
Potencial redox (pH 7)	270,6 ± 0,5 mV	259,0 ± 1,9 mV
Secuencia del extremo amino terminal	GDVEK	ASFDEA

REIVINDICACIONES

1. Una construcción génica que codifica para el citocromo *c* que comprende:

- a) una primera secuencia de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para un citocromo *c*, y
- b) una segunda secuencia de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para un péptido señal;

en donde el extremo 5' de dicha primera secuencia de ácido nucleico está unido al extremo 3' de dicha segunda secuencia de ácido nucleico.

2. Construcción génica que codifica para el citocromo *c* según la reivindicación 1, en la que dicha primera secuencia de ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para el citocromo *c* de *Arabidopsis thaliana*.

3. Construcción génica que codifica para el citocromo *c* según la reivindicación 1 ó 2, en la que dicha primera secuencia de ácido nucleico comprende la secuencia de nucleótidos identificada como SEQ ID NO: 1.

4. Construcción génica que codifica para el citocromo *c* según la reivindicación 1, en la que dicha primera secuencia de ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para el citocromo *c* de *Homo sapiens*.

5. Construcción génica que codifica para el citocromo *c* según la reivindicación 1 ó 4, en la que dicha primera secuencia de ácido nucleico comprende la secuencia de nucleótidos identificada como SEQ ID NO: 12.

6. Construcción génica que codifica para el citocromo *c* según la reivindicación 1, en la que dicha segunda secuencia de ácido nucleico comprende la secuencia de nucleótidos que codifica para el péptido señal del citocromo *c*₆ de *Anabaena* sp.

7. Construcción génica que codifica para el citocromo *c* según la reivindicación 1 ó 6, en la que dicha segunda secuencia de ácido nucleico comprende la secuencia de nucleótidos identificada como SEQ ID NO: 2.

8. Construcción génica que codifica para el citocromo *c* según la reivindicación 1, que comprende, además, una tercera secuencia de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que define un sitio de unión al ribosoma, en donde el extremo 3' de dicha tercera secuencia de ácido nucleico está unido al extremo 5' de dicha segunda secuencia de ácido nucleico.

9. Construcción génica que codifica para el citocromo *c* según la reivindicación 8, en la que dicha tercera secuencia de ácido nucleico comprende, además, una región potenciadora del inicio de la traducción.

10. Construcción génica que codifica para el citocromo *c* según la reivindicación 1, que comprende, además, una cuarta secuencia de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que define una región terminadora de la traducción, en donde el extremo 5' de dicha cuarta secuencia de ácido nucleico está unido al extremo 3' de dicha primera secuencia de ácido nucleico.

11. Construcción génica que codifica para el citocromo *c* según la reivindicación 1, 8, 9 ó 10, que comprende, además, una secuencia de ácido nucleico que define una secuencia de reconocimiento de una primera enzima de restricción en el extremo 5' de dicha construcción y otra secuencia de ácido nucleico que define una secuencia de reconocimiento de una segunda enzima de restricción en el extremo 3' de dicha construcción, en donde dichas primera y segunda enzimas de restricción reconocen dianas de restricción iguales o diferentes.

12. Construcción génica que codifica para el citocromo *c* según la reivindicación 1, que comprende la secuencia de nucleótidos identificada como SEQ ID NO: 3 o la secuencia de nucleótidos identificada como SEQ ID NO: 13.

13. Un vector que comprende una construcción génica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12.

14. Una célula hospedadora que comprende una construcción génica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 o un vector según la reivindicación 13.

15. Célula según la reivindicación 14, que comprende, además, un vector que comprende los genes necesarios para la maduración del citocromo *c*.

16. Célula según la reivindicación 15, en la que dicho vector que comprende los genes necesarios para la maduración del citocromo *c* es un vector que comprende los genes *ccm*.

17. Célula según cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16, en la que dicha célula hospedadora es una bacteria.

ES 2 315 039 B1

18. Célula según la reivindicación 17, en la que dicha bacteria es *Escherichia coli*.

19. Un procedimiento para la producción de citocromo *c* que comprende:

- 5
- a) co-transformar una célula hospedadora con (i) un vector según la reivindicación 13 y con (ii) un vector que comprende los genes necesarios para la maduración del citocromo *c*;
 - 10 b) cultivar una célula hospedadora co-transformada según la etapa a), bajo condiciones que permiten la expresión de la secuencia de nucleótidos que codifica para el citocromo *c* fusionado al péptido señal, y, si se desea,
 - c) aislar y purificar el citocromo *c*.

15 20. Un procedimiento para la producción de citocromo *c* que comprende cultivar una célula hospedadora transformada según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 18 bajo condiciones que permiten la expresión de la secuencia de nucleótidos que codifica para el citocromo *c* fusionado al péptido señal, y, si se desea, aislar y purificar el citocromo *c*.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Secuencia de unión al ribosoma y sitio de reconocimiento *Bam*HI:

AGGATCCAGGAGGTGACC

Subrayado: Sitio de reconocimiento *Bam*HI

Negrilla: Sitio de unión al ribosoma

Secuencia del péptido de tránsito por traducción reversa:

ATGAAAAAATCTTTTCCCTGGTACTGCTGGGCATCGCCCTGTTCACCTTTGCTT
TTTCTTCGCCGGCCCTGGCT

Negrilla: Potenciador de la traducción

Secuencia del gen del citromo *c* de *A. thaliana* por traducción reversa:

GCGTCATTTGATGAAGCGCCGCCGGGTAACCCGAAAGCGGGCGAAAAATTTT
CCGTACCAAATGTGCGCAGTGCCACACCGTTGAAAAAGGTGCGGGCCATAAAC
AGGGTCCGAATCTGAATGGCCTGTTTCGGCAGACAGTCCGGCACCAACCCCGGGC
TATAGCTATTCGGCGGCCAACAAATCTATGGCCGTCAATTGGGAAGAAAAAAC
CCTGTATGATTACCTGCTGAACCCGAAAAAATACATTCCGGGCACCAAAATGG
TGTTTCCGGGTCTGAAAAAACCGCAGGATCGCGCCGATCTGATTGCGTACCTGA
AAGAAGGCACCGCG

Terminador fuerte de la traducción con sitio de reconocimiento *Eco*RI:

TGATGAATTCT

Negrilla: Terminador doble

Subrayado: Sitio de reconocimiento *Eco*RI)

Secuencia completa del gen sintético:

AGGATCCAGGAGGTGACCATGAAAAAATCTTTTCCCTGGTACTGCTGGGCAT
CGCCCTGTTCACCTTTGCTTTTCTTCGCCGGCCCTGGCTGCGTCAATTTGATGAA
GCGCCGCCGGGTAACCCGAAAGCGGGCGAAAAATTTTCCGTACCAAATGTGC
GCAGTGCCACACCGTTGAAAAAGGTGCGGGCCATAAACAGGGTCCGAATCTGA
ATGGCCTGTTTCGGCAGACAGTCCGGCACCAACCCCGGGCTATAGCTATTCGGCG
GCCAACAAATCTATGGCCGTCAATTGGGAAGAAAAAACCTGTATGATTACCT
GCTGAACCCGAAAAAATACATTCCGGGCACCAAAATGGTGTTCGGGTCTGA
AAAAACCGCAGGATCGCGCCGATCTGATTGCGTACCTGAAAGAAGGCACCGCG
TGATGAATTCT

Figura 1

ES 2 315 039 B1

Secuencia de unión al ribosoma y sitio de reconocimiento *Bam*HI:

AGGATCCAGGAGGTGACC

Subrayado: Sitio de reconocimiento *Bam*HI

Negrilla: Sitio de unión al ribosoma

Secuencia del péptido de tránsito por traducción reversa:

ATGAAAAAAAAATCTTTTCCCTGGTACTGCTGGGCATCGCCCTGTTACCTTTGCTT
TTTCTTCGCCGGCCCTGGCT

Negrilla: Potenciador de la traducción

Secuencia del gen del citocromo *c* humano por traducción reversa:

GGTGATGTCGAAAAAGGCAAAAAATTTTTATTATGAAATGCTCACAATGTCA
TACCGTTGAAAAAGGCGGTAAACATAAAACCGGTCCGAATCTGCATGGCCTGT
TCGGCCGTAAAACCGGCCAGGCCCGGGTTACAGCTATACCGCGGCGAACAAA
AACAAAGGTATTATCTGGGGCGAAGATACCCTGATGGAATACCTGGAAAACCC
GAAAAAATATATTCCGGGCACCAAAATGATCTTCGTGGGCATTAAAAAAAAAAG
AAGAACGCGCTGATCTGATCGCGTATCTGAAAAAAGCGACCAATGAA

Terminador fuerte de la traducción con sitio de reconocimiento *Eco*RI:

TGATGAATTCT

Negrilla: Terminador doble

Subrayado: Sitio de reconocimiento *Eco*RI)

Secuencia completa del gen sintético:

AGGATCCAGGAGGTGACCATGAAAAAATCTTTTCCCTGGTACTGCTGGGCAT
CGCCCTGTTACCTTTGCTTTTTCTTCGCCGGCCCTGGCTGGTGATGTCGAAAAA
GGCAAAAAAATTTTTATTATGAAATGCTCACAATGTCATACCGTTGAAAAAGG
CGGTAAACATAAAACCGGTCCGAATCTGCATGGCCTGTTTCGGCCGTAAAACCG
GCCAGGCCCGGGTTACAGCTATACCGCGGCGAACAAAAACAAAGGTATTATC
TGGGGCGAAGATACCCTGATGGAATACCTGGAAAACCCGAAAAAATATATTCC
GGGCACCAAAATGATCTTCGTGGGCATTAAAAAAAAAAGAAGAACGCGCTGATC
TGATCGCGTATCTGAAAAAAGCGACCAATGAATGATGAATTCT

Figura 2

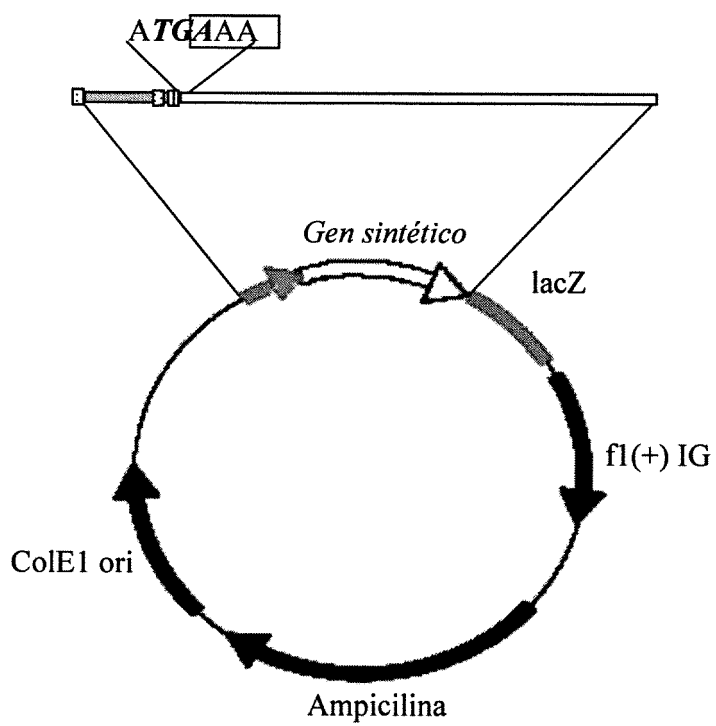


Figura 3

ES 2 315 039 B1

LISTA DE SECUENCIAS

<110> UNIVERSIDAD DE SEVILLA

5 <110> CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

<120> Procedimiento para la obtención de citocromo *c*

10 <160> 21

<210> 1

<211> 333

15 <212> ADN complementario

<213> *Arabidopsis thaliana*

<223> citocromo *c*

20

<400> 1

25 gcgctcatttg atgaagcgcg gccgggtaac ccgaaagcgg gcgaaaaaat tttccgtacc 60
aaatgtgcgc agtgccacac cgttgaaaaa ggtgcggggc ataaacaggg tccgaatctg 120
aatggcctgt tcggcagaca gtccggcacc accccgggct atagctattc ggcggccaac 180
aaatctatgg ccgtcaattg ggaagaaaaa accctgtatg attacctgct gaacccgaaa 240
aaatacattc cgggcaccaa aatggtggtt ccgggtctga aaaaaccgca ggatcgcgcc 300
gatctgattg cgtacctgaa agaaggcacc gcg 333

30

<210> 2

<211> 75

35 <212> ADN

<213> *Anabaena* sp

<223> secuencia que codifica para el péptido de tránsito del citocromo *c*₆

40

<400> 2

45 atgaaaaaaa tcttttccct ggtactgctg ggcacgccc tgttcacctt tgctttttct 60
tcgccggccc tggt 75

45

<210> 3

<211> 437

50 <212> ADN

<213> secuencia artificial

<220> ADN sintético

55 <223> Secuencia que comprende la secuencia codificante del citocromo *c* de *A. thaliana*

<400> 3

60 aggatccagg aggtgaccat gaaaaaaatc ttttccctgg tactgctggg catcgccttg 60
ttcacctttg ctttttcttc gccggccctg gctgcgctcat ttgatgaagc gccgcccgggt 120
aacccgaaag cgggcaaaaa aattttccgt accaaatgtg cgcagtgcca caccgttgaa 180
aaaggtgcgg gccataaaca gggtcggaat ctgaatggcc tggtcggcag acagtcgggc 240
accaccccg gctatagcta ttcggcggcc aacaaatcta tggccgtcaa ttgggaagaa 300
aaaaccctgt atgattacct gctgaaccgg aaaaaatata ttccgggcac caaaatgggtg 360
65 tttccgggtc tgaaaaaacc gcaggatcgc gccgatctga ttgcgtacct gaaagaaggg 420
accgcgtgat gaattct 437

ES 2 315 039 B1

<210> 8
<211> 101
<212> ADN
5 <213> secuencia artificial

<220> ADN sintético
<223> oligonucleótido A3 diseñado para amplificar ADN complementario de citocromo *c* de *A. thaliana*
10

<400> 8

15 gacagtccgg caccaccccc ggctatagct attcggcggc caacaaatct atggccgtca 60
attgggaaga aaaaaccctg tatgattacc tgctgaacct g 101

<210> 9
20 <211> 80
<212> ADN
<213> secuencia artificial

25 <220> ADN sintético
<223> Oligonucleótido A4 diseñado para amplificar ADN complementario de citocromo *c* de *A. thaliana*

<400> 9
30

cgatcctgcg gttttttcag acccggaaac accattttgg tgcccggaat gtattttttc 60
gggttcagca ggtaatcata 80

35 <210> 10
<211> 68
<212> ADN
<213> secuencia artificial
40

<220> ADN sintético
<223> Oligonucleótido A5 diseñado para amplificar ADN complementario de citocromo *c* de *A. thaliana*

45 <400> 10

ctgaaaaaac cgcaggatcg cgccgatctg attgctgacc tgaagaagg caccgcgtga 60
tgaattct 68

50

<210> 11
<211> 28
<212> ADN
55 <213> secuencia artificial

<220> ADN sintético
60 <223> Oligonucleótido A6 diseñado para amplificar ADN complementario de citocromo *c* de *A. thaliana*

<400> 11

65 agaattcatc acgcggtgcc ttctttca 28

ES 2 315 039 B1

<210> 12
<211> 312
<212> ADN complementario
5 <213> *Homo sapiens*

<223> citocromo *c*

10 <400> 12

 ggtgatgtcg aaaaaggcaa aaaaatTTTT attatgaaat gtcacaatg tcataccgtt 60
 gaaaaaggcg gtaaacataa aaccggcccg aatctgcatg gcctgttcgg ccgtaaaacc 120
15 ggccaggccc cgggttacag ctataccgcg gcgaacaaaa acaaaggat tatctggggc 180
 gaagataccc tgatggaata cctggaaaac ccgaaaaaat atattccggg caccaaaatg 240
 atcttcgtgg gcattaaaaa aaaagaagaa cgcgctgatc tgatcgcgta tctgaaaaaa 300
 gcgaccaatg aa 312

20

<210> 13
<211> 416
<212> ADN
25 <213> secuencia artificial

<220> ADN sintético
30 <223> Secuencia que comprende la secuencia codificante del citocromo *c* de *H. sapiens*

<400> 13

35 aggatccagg aggtgaccat gaaaaaaaaatc ttttccctgg tactgctggg catcgccctg 60
 ttcacctttg ctttttcttc gccggccctg gctggtgatg tcgaaaaagg caaaaaaatt 120
 tttattatga aatgctcaca atgtcatacc gttgaaaaag gcggtaaaca taaaaccggt 180
 ccgaatctgc atggcctggt cggccgtaaa accggccagg ccccgggtta cagctatacc 240
 gcggcgaaca aaaacaaagg tattatctgg ggcgaaagata ccctgatgga atacctggaa 300
40 aaccgaaaaa aatatattcc gggcaccaaa atgatcttcg tgggcattaa aaaaaaagaa 360
 gaacgcgctg atctgatcgc gtatctgaaa aaagcgacca atgaatgatg aattct 416

45

<210> 14
<211> 100
<212> ADN
<213> secuencia artificial
50

<220> ADN sintético
<223> Oligonucleótido H1 diseñado para amplificar ADN complementario de citocromo *c* de *H. sapiens*

55 <400> 14

 cttttcttc gccggccctg gctggtgatg tcgaaaaagg caaaaaaatt tttattatga 60
 aatgctcaca atgtcatacc gttgaaaaag gcggtaaaca 100

60

<210> 15
<211> 100
65 <212> ADN
<213> secuencia artificial

ES 2 315 039 B1

<220> ADN sintético

<223> Oligonucleótido H2 diseñado para amplificar ADN complementario de citocromo *c* de *H. sapiens*

5 <400> 15

```
tgttcgccgc ggtatagctg taacccgggg cctggccggt ttacggccg aacaggccat 60
gcagattcgg accggtttta tgtttaccgc ctttttcaac 100
```

10

<210> 16

<211> 101

15 <212> ADN

<213> secuencia artificial

<220> ADN sintético

20 <223> Oligonucleótido H3 diseñado para amplificar ADN complementario de citocromo *c* de *H. sapiens*

<400> 16

```
acagctatac cgcggcgaac aaaaacaaag gtattatctg gggcgaagat accctgatgg 60
aatacctgga aaaccgaaa aaatatattc cgggcaccaa a 101
```

30 <210> 17

<211> 108

<212> ADN

<213> secuencia artificial

35

<220> ADN sintético

<223> Oligonucleótido H4 diseñado para amplificar ADN complementario de citocromo *c* de *H. sapiens*

40 <400> 17

```
agaattcatc attcattggt cgcttttttc agatcgcga tcagatcagc gcgttcttct 60
ttttttttaa atgccacga agatcatttt ggtgcccgga atatattt 108
```

45

<210> 18

<211> 67

<212> ADN

50 <213> secuencia artificial

<220> ADN sintético

55 <223> Oligonucleótido H5 diseñado para amplificar ADN complementario de citocromo *c* de *H. sapiens*

<400> 18

```
aaaaaaaaaga agaacgcgct gatctgatcg cgtatctgaa aaaagcgacc aatgaatgat 60
gaattctt 67
```

<210> 19

<211> 101

65 <212> ADN

<213> secuencia artificial

ES 2 315 039 B1

<220> ADN sintético

<223> Oligonucleótido H6 diseñado para amplificar ADN complementario de citocromo *c* de *H. sapiens*

5 <400> 19

```
tgttcgcgcg ggtatagctg taaccggggg cctggccggt tttacggccg aacaggccat 60
gcagattcgg accggtttta tgtttaccgc ctttttcaac g 101
```

10

<210> 20

<211> 61

15 <212> ADN

<213> secuencia artificial

<220> ADN sintético

20 <223> Oligonucleótido H7 diseñado para amplificar ADN complementario de citocromo *c* de *H. sapiens*

<400> 20

```
25 cagcgcggtt ttcttttttt ttaatgccca cgaagatcat tttggtgccc ggaatatatt 60
t 61
```

30 <210> 21

<211> 27

<212> ADN

<213> secuencia artificial

35

<220> ADN sintético

<223> Oligonucleótido H8 diseñado para amplificar ADN complementario de citocromo *c* de *H. sapiens*

40 <400> 21

```
agaattcatc attcattggt cgctttt 27
```

45

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 315 039

② Nº de solicitud: 200402723

③ Fecha de presentación de la solicitud: **05.11.2004**

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: **C12N 15/53** (2006.01)
C12Q 1/28 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	WO 02059339 A1 (NIHON UNIVERSITY) 01.08.2002, resumen.	1, 13, 14, 17, 18
A	GUPTA, R. et al. "Functional relationship of cytochrome c6 and plastocyanin in Arabidopsis". NATURE. 30.05.2002. Vol. 417, páginas 567-571, todo el documento.	1-20

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
25.02.2009

Examinador
M. Novoa Sanjurjo

Página
1/4

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

C12N, C12Q

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

INVENES, EPODOC, EMBL, BIOSIS

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 25.02.2009

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	2-12, 15, 16, 19, 20	SÍ
	Reivindicaciones	1, 13, 14, 17, 18	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	2-12, 15, 16, 19, 20	SÍ
	Reivindicaciones	1, 13, 14, 17, 18	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de **aplicación industrial**. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión:

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como ha sido publicada.

1. Documentos considerados:

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	WO 02059339 A1	01.08.2002
D02	GUPTA, R. et al. "Functional relationship of cytochrome c6 and plastocyanin in Arabidopsis". NATURE. 30.05.2002. Vol. 417, páginas 567-571.	30.05.2002

Observaciones sobre documentos:

El documento D01 menciona en el resumen, que la invención que describe incluye un ADN que codifica para un péptido señal y para un citocromo c.

El documento D02, refleja el estado de la técnica relacionado con la invención.

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La reivindicación nº 1 de la presente solicitud, está redactada en unos términos tan generales, que a la luz del documento D01, carece de novedad pues está redactada incluyendo los mismos términos. Las reivindicaciones 13, 14, 17 y 18, en la medida en que dependen de la reivindicación 1, también carecen de novedad.

No se ha encontrado en el estado de la técnica, ningún documento que describa las construcciones de SEQ ID nºs 3 y 13, cuya obtención se incluye en la descripción de la invención; por tanto, las reivindicaciones 2-12, 15, 16, 19 y 20, cumplen los requisitos de novedad, actividad inventiva y aplicación industrial de acuerdo al Art. 4.1 de la Ley de Patentes.