



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 358 856**

51 Int. Cl.:
C12N 15/10 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07847173 .7**
96 Fecha de presentación : **15.11.2007**
97 Número de publicación de la solicitud: **2094845**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.09.2009**

54 Título: **Proteínas de unión artificiales basadas en una región de hélice alfa modificada de ubiquitina.**

30 Prioridad: **15.11.2006 EP 06124137**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.05.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.05.2011

73 Titular/es: **Scil Proteins GmbH**
Heinrich-Damerow-Strasse 1
06120 Halle/Saale, DE

72 Inventor/es: **Schraeml, Michael y**
Fiedler, Erik

74 Agente: **Temño Ceniceros, Ignacio**

ES 2 358 856 T3

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

DESCRIPCION

Proteínas de unión artificiales basadas en una región de hélice alfa modificada de ubiquitina

- 5 La presente invención se refiere a proteínas de unión derivadas de la superfamilia de proteínas de ubiquitina como proteínas con modificaciones en su región de hélice alfa. La presente invención se refiere adicionalmente a un método para la generación de esas proteínas así como a una proteína que se puede obtener por dicho método. Además, la invención proporciona el uso de una proteína para el reconocimiento, unión y neutralización específicos de una molécula diana pre-descrita, para la detección, determinación cuantitativa, separación y/o aislamiento de un compañero de unión correspondiente y el uso de una proteína de la invención, para el diagnóstico, profilaxis y tratamiento de enfermedades en las que el compañero de unión correspondiente está directa o indirectamente implicado.

Antecedentes de la invención

- 15 La ubiquitina es una proteína pequeña, monomérica, y citosólica de secuencia altamente conservada y que está presente en todas las células eucariotas conocidas desde protozoos a vertebrados. En el organismo, desempeña una tarea crucial en la regulación de la degradación controlada de las proteínas celulares. Para este propósito, las proteínas destinadas para su degradación se unen covalentemente a la ubiquitina o las cadenas de poliubiquitina durante su paso a través de una cascada de enzimas y se degradan selectivamente a causa de este marcador. De acuerdo con recientes resultados, la ubiquitina o el marcaje de las proteínas por la ubiquitina, respectivamente, desempeña una tarea importante también en otros procesos celulares tales como la importación de varias proteínas o la regulación génica de las mismas (Marx, 2002).

- 25 Más allá del esclarecimiento de su función biológica, la ubiquitina es un objeto de investigación principalmente a causa de sus propiedades estructurales y proteoquímicas. La cadena polipeptídica de la ubiquitina consta de 76 aminoácidos plegados en una estructura alfa/beta extraordinariamente compacta (Vijay-Kumar, 1987): casi el 87% de la cadena polipeptídica está implicada en la formación de los elementos estructurales secundarios mediante enlaces de hidrógeno. Como estructuras secundarias prominentes pueden mencionarse tres giros y medio de hélice alfa así como una lámina beta antiparalela que consta de cuatro cadenas. La disposición característica de estos elementos - una lámina beta antiparalela expuesta en la superficie de la proteína sobre cuyo lado posterior está empaquetada una hélice alfa que descansa verticalmente sobre la parte superior de la misma - se considera generalmente como el llamado motivo de plegamiento tipo ubiquitina. Por lo tanto, la ubiquitina es el nombre que se da a la respectiva superfamilia de proteínas ("proteínas tipo ubiquitina") o a la familia de proteínas ("proteínas relacionadas con ubiquitina"), respectivamente, (Murzin et al., 1995) que comprende proteínas tales como, por ejemplo, SUMO-1 (Müller et al., 2001), FAU (Michiels et al., 1993), NEDD-8 (Kumar et al., 1993), UBL-1 (Jones y Candino, 1993), y GDX (Filippi et al., 1990) que albergan este motivo así como un alto grado de identidad con la ubiquitina en su secuencia primaria.

- 40 La ubiquitina humana es - como se ha mencionado anteriormente - un polipéptido de 76 aminoácidos de longitud (Fig. 1). Es una proteína pequeña, globular de 7,5 kDa con un extremo C-terminal forzado hacia el exterior. Las características estructurales principales de la ubiquitina se muestran en la Fig.1. Los restos hidrófobos de la lámina y de la hélice componen el núcleo hidrófobo de la proteína y estabilizan la orientación de la hélice (Fig. 2). El empaquetado hidrófobo altamente denso del núcleo de la proteína se refleja por su excelente estabilidad termodinámica, que debe hacer que la proteína sea un candidato ideal para su uso como esqueleto para enfoques de ingeniería proteica.

- 45 A causa de su pequeño tamaño, la preparación artificial de la ubiquitina puede realizarse tanto por síntesis química como por métodos biotecnológicos. Debido a las propiedades favorables de plegamiento, la ubiquitina puede producirse por ingeniería genética usando microorganismos tales como *Escherichia coli* en cantidades relativamente grandes en el citosol o en el espacio periplásmico. A causa de las condiciones oxidantes que predominan en el periplasma la última estrategia generalmente se reserva para la producción de proteínas de secreción. Debido a la preparación bacteriana simple y eficaz, la ubiquitina puede usarse como compañero de fusión para otras proteínas foráneas a preparar cuya producción es problemática. Mediante la fusión de la ubiquitina, puede conseguirse una solubilidad mejorada y de este modo un rendimiento mejorado. El enfoque puesto en práctica en la presente invención para proporcionar ubiquitina como proteína de unión artificial universal permite una utilización completamente nueva de sus propiedades proteoquímicas.

- 55 Entre las proteínas cuya función natural se utiliza en diagnóstico y farmacéutica, las inmunoglobulinas desempeñan una tarea predominante. Su capacidad de unión específica, no covalente a un amplio rango de diferentes sustancias hace que sean la herramienta más importante para aplicación biocientífica. Los métodos desarrollados en los últimos años para la biosíntesis funcional de fragmentos de anticuerpo en *E. coli* han ampliado adicionalmente las posibilidades de usar las inmunoglobulinas pero al mismo tiempo han demostrado sus limitaciones.

- 65 Además de los fragmentos Fab y Fv (Skerra y Plückthun, 1988) que pueden obtenerse principalmente por métodos convencionales, podrían desarrollar diferentes construcciones artificiales mediante métodos de ingeniería proteica. Con la ayuda de la estructura modular de las inmunoglobulinas (revisado en Dübel y Kontermann, 2001), podrían generarse notablemente fragmentos Fv de cadena sencilla (scFv) (Bird et al., 1988), fragmentos Fv con unidos por puente disulfuro (dsFv) (Brinkmann et al., 1993) así como fragmentos de anticuerpo bivalentes (Carter et al., 1992) y biespecíficos (por ejemplo, diacuerpos, Holliger et al., 1993). Para el diagnóstico y el uso en terapia, pueden obtenerse proteínas bifuncionales por fusión génica de los fragmentos de Ig recombinantes a los módulos efectores. Por tanto, están disponibles fusiones a la fosfatasa alcalina (Müller et al., 1999) y la proteína fluorescente verde (GFP; Griep et al., 1999) entre otras. Las fusiones de fragmentos de anticuerpo a radioisótopos o sustancias citotóxicas son de gran importancia

potencial para el tratamiento del cáncer (inmunotoxinas; Reiter y Pastan, 1998). En este caso, la unión selectiva de los fragmentos de Ig respectivos a las proteínas superficiales específicas en células tumorales se utiliza para la aplicación específica de sitio de agentes terapéuticos (direccionamiento tumoral).

5 Sin embargo, los métodos para la preparación de fragmentos de anticuerpo en *E. coli* no solamente permite proporcionarlos para diagnóstico y terapia en suficiente calidad y cantidad sino también para una modificación simple y rápida de sus propiedades proteoquímicas e inmuoquímicas. La fácil manipulación de un hospedador bacteriano posibilita una alteración sencilla de los genes codificados en el vector para la proteína foránea mediante métodos de biología molecular convencionales. Mediante ingeniería dirigida de anticuerpos (Kontermann y Dübel, 2001) pueden optimizarse de este modo los fragmentos de anticuerpo, por ejemplo, con respecto a su afinidad de unión o su compatibilidad de hospedador. Además, pueden prepararse de forma artificial anticuerpos específicos o fragmentos de los mismos, respectivamente, es decir, fuera del sistema inmune, que están dirigidos contra las sustancias diana más diferentes tales como estructuras de bajo peso molecular o proteínas, por ejemplo. Mediante dichos métodos evolutivos, se preparan bibliotecas sintéticas de fragmentos de anticuerpo por la introducción de mutaciones aleatorias que en su medida pueden ser cercanas al repertorio humano (Knappik et al., 2000). Mediante estrategias de selección adecuadas tales como presentación en fagos o presentación en ribosomas (Winter, 1998, Hoogenboom et al., 1998; Hanes et al., 2000) se aíslan fragmentos funcionales de Ig que tienen la propiedad de unión deseada en el caso de éxito. De esto modo, también es posible, por ejemplo, obtener proteínas de unión para aquellos antígenos que durante una inmunización clásica provocarían efectos tóxicos o solamente una respuesta inmune débil.

20 A pesar de los logros mencionados anteriormente y las posibilidades proporcionadas por la ingeniería de anticuerpos, ciertas desventajas pueden limitar el uso práctico de los anticuerpos. Por tanto, es un problema proporcionarlos en cantidades suficientes.

25 La producción de anticuerpos funcionales se realiza principalmente en sistemas de cultivo de células eucariotas, que es un método extraordinariamente caro. Además, la baja penetración tisular de las moléculas de anticuerpo debido a su tamaño y su largo tiempo de residencia en el suero (baja eliminación sanguínea), respectivamente, obstaculizan muchas aplicaciones terapéuticas. Aunque pueden prepararse fragmentos más pequeños de anticuerpos tales como fragmentos scFv o Fab (véase anteriormente) en bacterias y por tanto básicamente a costes inferiores, los rendimientos de esta producción recombinante, sin embargo, son más bajos que el niveles deseado debido a sus propiedades de plegamiento desfavorables y la formación necesaria de varios enlaces disulfuro. Además, los fragmentos recombinantes de anticuerpo a menudo muestran una estabilidad termodinámica reducida, una actividad de unión inferior y tendencias de agregación mayores, en comparación con los anticuerpos precursores.

35 Para eludir dichas limitaciones, se han hecho intentos por conferir el principio de unión del anticuerpo - concretamente la unión mediante una región hipervariable expuesta en la superficie localizada sobre una estructura proteica conservada - a otras proteínas (Skerra, 2000). Esto significa que se varían esencialmente todos los bucles variables para generar una propiedad de unión artificial. Para este propósito, habitualmente se han usado proteínas de unión natural tales como, por ejemplo, lipocalinas (Beste et al., 1999) o el dominio de fibronectina tipo III (Koide et al., 1998) como punto de partida para que se formen los sitios de unión de un modo análogo a los anticuerpos a partir de estructuras flexibles de "bucle" cuya modificación posibilita el reconocimiento de acoplamiento inducido de ligandos.

40 El documento WO2004/106368 se refiere a proteínas modificadas de la superfamilia de "proteínas tipo ubiquitina", proteínas que tienen un plegamiento tipo ubiquitina. Como resultado de dicha modificación, las proteínas tienen afinidad de unión con respecto a un compañero de unión predeterminado, que no existía previamente. La invención también se refiere a un método para la producción y utilización de dichas proteínas. De acuerdo con el documento WO2004/106368, se proporciona una proteína seleccionada entre el grupo compuesto por proteínas de la superfamilia de proteínas de "proteínas tipo ubiquitina" donde debido a una o más modificaciones de aminoácidos en la cadena de lámina beta de la región de lámina beta, la proteína muestra una afinidad de unión modificada. Por tanto, se ensambló un sitio de unión de novo en la ubiquitina humana mediante nuevas sustituciones de aminoácidos en las posiciones Q2, F4, K6, Q62, K63, E64, S65 y T66 (Fig. 6, 7).

45 El documento WO 2004/106368 describe de forma más detallada la mutación de una región de lámina beta sobre la superficie de la ubiquitina. El descubrimiento general en la descripción y todos los ejemplos de trabajo específicos se refiere a variantes de ubiquitina, que comprenden varios aminoácidos mutados en la región de lámina beta. Por tanto, la afinidad de unión se obtiene por mutaciones en la lámina beta. También se describe que, además de las mutaciones en las regiones de lámina beta, pueden estar presentes mutaciones en otras regiones de la proteína y en la región de hélice alfa. Sin embargo, estas mutaciones solamente se refieren al "ajuste fino" de la afinidad de unión básica, que necesariamente requiere una fuerte afinidad de unión en la región de lámina beta.

60 Krantz et al. "Discerning the Structure and Energy of Multiple Transition States in Protein Folding using psi-Analysis", Journal of Molecular Biology, Londres, GB, vol. 337, nº 2, marzo de 2004, se refiere a la introducción de sitios de unión a zinc en la ubiquitina por mutagénesis dirigida al sitio. Sin embargo, este documento solamente describe mutantes con dos sustituciones de aminoácidos.

65 Desafortunadamente, debido a la cercana proximidad del sitio de unión de novo al extremo N-terminal de la proteína, la composición de codones de los aminoácidos recién introducidos provocaba tasas de expresión dispares de las variantes proteicas y una posterior fusión génica N-terminal o marcaje N-terminal post-traduccional gravemente limitado de las variantes. Finalmente, el desarrollo de polipéptidos de alta afinidad de unión usando la topología de lámina beta convexa como paratopo era dependiente de la presencia de una estructura cóncava de la molécula diana.

Sumario de la invención

- 5 Por lo tanto, un objeto de la presente invención es proporcionar proteínas modificadas que tienen afinidades de unión nuevas y/o mejoradas que no existían previamente (en comparación con la proteína de tipo silvestre) por compañeros de unión o moléculas diana seleccionados sin mostrar las desventajas descritas anteriormente, es decir, que pueden usarse para otras moléculas diana diferentes a las que tienen estructura cóncava. Otro objeto de la presente invención es crear moléculas sustitutas para anticuerpos que, sin embargo, no muestran las desventajas mencionadas anteriormente de los anticuerpos.
- 10 Además, un objeto de la presente invención es proporcionar métodos respectivos para la preparación de las proteínas modificadas basadas en ubiquitina mencionadas anteriormente y usos para estas proteínas modificadas.
- 15 Los objetos anteriores se consiguen mediante la materia de las reivindicaciones independientes. Las realizaciones preferidas se exponen en las reivindicaciones dependientes.
- 20 Para superar las limitaciones de la estrategia de biblioteca basada en láminas beta, se usó un nuevo enfoque para generar un sitio de unión alternativo en la superficie de la ubiquitina. En la topología casi convexa de esta proteína globular, la hélice alfa de la ubiquitina de tipo silvestre muestra excepcionalmente una topología plana expuesta al disolvente de aproximadamente 750 \AA^2 , que a primera vista parece bastante inaplicable para la generación de un nuevo sitio de unión. Sin embargo, inesperadamente resultó que la hélice puede servir como excelente base para la generación de moléculas de ubiquitina nuevas y modificadas que tienen afinidad de unión por compañeros de unión predeterminados.
- 25 El presente enfoque se basó en la presunción de que la hélice alfa de la ubiquitina podría mutagenizarse sin perturbar el núcleo hidrófobo estabilizador y - incluso más importante - la vía de plegamiento de la ubiquitina. Esto estaba en total contraste con el hecho de que la hélice de la ubiquitina desempeña un papel central en la vía de plegamiento de la proteína. Durante la traducción de la ubiquitina, las dos primeras cadenas de la ubiquitina se elongan desde el ribosoma y se pliegan rápidamente en una lámina de dos cadenas, que es en sí misma una estructura estable (Bofill y Searle 2005). Teóricamente, esta pequeña lámina después sirve como molde estructural para la hélice. La lámina y la hélice forman el estado de transición de la proteína durante su vía de plegamiento (Crespo, Simpson et al. 2006; Jackson 2006; Pandit, Jha et al. 2006). El resto de la cadena polipeptídica se pliega posteriormente a través de su colisión con este complejo.
- 35 Por lo tanto, mutaciones en el complejo de estado de transición de la ubiquitina deberían influir fuertemente en la vía de plegamiento de la proteína. Podría esperarse que la solubilidad, la estabilidad y la integridad estructural global de la proteína mutada estén fuertemente limitadas por dicho enfoque.
- 40 En la presente invención, se ilustra un resultado ejemplar que, ha demostrado muy asombrosamente que podría producirse una variante de unión monomérica, derivada de ubiquitina de alta afinidad por un enfoque mutacional usando la hélice alfa de ubiquitina como estructura central. Además, mediante este enfoque, el extremo N-terminal de la proteína permanece libre de mutaciones, lo que posibilita un rendimiento de expresión homogéneo de las variantes heterólogas de secuencia mediante una secuencia de ADN de codones optimizados de los primeros 19 aminoácidos. Las fusiones genéticas N terminales así como los enfoques de marcaje posteriores llegan a ser adicionalmente posibles.
- 45

Descripción detallada de la invención

- 50 La presente invención, en un aspecto principal se refiere a un método para la generación de una proteína seleccionada entre el grupo compuesto por proteínas de la superfamilia de proteínas de "proteínas tipo ubiquitina", proteínas que tienen un motivo de plegamiento tipo ubiquitina así como fragmentos o proteínas de fusión de las mismas cada una de las cuales tiene el motivo de plegamiento tipo ubiquitina, donde la proteína debido a una o más modificaciones de aminoácidos en la región de hélice alfa muestra una afinidad de unión mejorada con respecto a un agente cuya afinidad de unión no existía o no existía a ese grado en la proteína no modificada, de acuerdo con la reivindicación 1.
- 55 Además, la presente invención describe una proteína seleccionada entre el grupo compuesto por proteínas de la superfamilia de proteínas de "proteínas tipo ubiquitina" que tienen cada una un motivo de plegamiento tipo ubiquitina así como fragmentos o proteínas de fusión de los mismos que tienen cada una el motivo de plegamiento tipo ubiquitina y las siguientes características:
- 60 - la proteína debido a modificaciones de esos aminoácidos que forma la región de hélice alfa de la proteína tiene una afinidad de unión nueva o potenciada con respecto a un compañero de unión predeterminado (agente);
 - la afinidad de unión no existía o no existía a ese grado en la proteína no modificada; y
 - al menos cuatro aminoácidos expuestos en superficie en la hélice alfa o regiones adyacentes están modificados.
- 65 Por tanto, la invención describe proteínas o polipéptidos, respectivamente, preparados por modificación de proteínas o polipéptidos, respectivamente, que tienen un motivo de plegamiento tipo ubiquitina como se define en la presente solicitud. Estas incluyen proteínas de la superfamilia de proteínas de "proteínas tipo ubiquitina", que tienen todas las proteínas un motivo de plegamiento tipo ubiquitina y fragmentos o proteínas de fusión de estas proteínas, con la condición de que también tengan un motivo de plegamiento tipo ubiquitina. Partiendo de estas proteínas o polipéptidos, respectivamente, se modifican al menos cuatro aminoácidos expuestos en superficie en la región de hélice alfa de la
- 70

proteína o polipéptido original, respectivamente. Estas modificaciones comprenden particularmente la sustitución de aminoácidos, pero también inserciones y deleciones de uno o más aminoácidos así como modificaciones químicas de aminoácidos.

5 Se aprecia que la expresión "región de hélice alfa" como se usa en este documento indica que comprende los tres giros de hélice alfa en el plegamiento tipo ubiquitina. Con respecto a la ubiquitina humana las posiciones de T22 a D32 pertenecen a la región de núcleo helicoidal de ubiquitina. Esta expresión, sin embargo, también abarca los aminoácidos 16-21 (posiciones cadena arriba de la hélice) y 38-55 (posiciones cadena abajo de la hélice) que descansan fuera de la hélice alfa. O en otras palabras, la expresión "región de hélice alfa" es equivalente a la expresión "hélice alfa o regiones adyacentes" como se usa en este documento.

10 La modificación de los al menos cuatro aminoácidos en la región de hélice alfa significa que el aminoácido debe localizarse en la superficie de la proteína para que sea accesible al compañero de unión o el ligando, respectivamente, capaz de unirse a la proteína modificada con una afinidad que puede determinarse.

15 Por tanto, de acuerdo con la invención, al menos cuatro aminoácidos expuestos en superficie en la hélice alfa o regiones adyacentes están modificados. Resultó que podía potenciarse la probabilidad de afinidades de unión nuevas y/o mejoradas a un compañero de unión predeterminado, si están modificados al menos cuatro aminoácidos expuestos en superficie en la hélice alfa o regiones adyacentes.

20 Se aprecia que para establecer una interacción proteína-proteína no transitoria, se requiere un área expuesta en superficie suficiente, que se ensambla a partir de restos aminoacídicos que, de forma rutinaria, participan en dicha interacción. Se supone que cuatro aminoácidos expuestos en superficie son el mínimo absoluto para generar dicha interacción. Para establecer esta interacción de forma más eficaz, se prefiere que la cantidad de aminoácidos expuestos en superficie sea al menos 6, más preferiblemente al menos 8. Se prefiere adicionalmente que los aminoácidos expuestos en la hélice alfa o regiones adyacentes estén proporcionando un área superficial accesible al disolvente de al menos 400 Å², más preferiblemente de 600 Å². Los ejemplos de esas áreas superficiales accesibles en la superficie se indican en la Tabla 1:

30 Tab. 1: Cálculo de SASA (Área Superficial Accesible en la Superficie) de la ubiquitina (PDB 1UBQ) mediante PyMOL versión 0.98.

aminoácidos	posición del aminoácido	Å ²
4	T22, E24, N25, A28	266.814
6	T22, E24, N25, A28, Q31, D32	473.884
35 8	D21, T22, E24, N25, A28, Q31, D32, P38	544.976
10	S20, D21, T22, E24, N25, A28, K29, Q31, D32, P38	711.029
12	S20, D21, T22, E24, N25, A28, K29, Q31, D32, P38, D52, G53	847.595
40 14	S20, D21, T22, E24, N25, A28, K29, Q31, D32, P38, D52, G53, R54, T55, E16, E18, S20, D21, T22, E24, N25, A28, K29, Q31, D32, P38, D52, G53,	1010.998
45 16	R54, T55, E16, E18, S20, D21, T22,	1239.035
18	E24, N25, A28, K29, Q31, K33, D32, P38, D39, D52, G53, R54, T55	1484.749

50 Para información adicional, se hace referencia a Fletcher, S. y A. D. Hamilton (2005). "Protein surface recognition and proteomimetics: mimics of protein surface structure and function." *Curr Opin Chem Biol* 9(6): 632-8.

55 Se aprecia que las proteínas de la presente invención preferiblemente llevan modificaciones respecto a la proteína de tipo silvestre (wt) en su región de hélice alfa solamente. Sin embargo, las modificaciones que caen fuera del intervalo definido anteriormente, que pueden contribuir adicionalmente a la estabilidad global, la eficacia de plegamiento, la solubilidad, la especificidad o afinidad de diana se incluyen de acuerdo con una realización.

60 Esto implica estrategias adicionales para madurar una variante de unión a ubiquitina mediante mutagénesis aleatoria (por ejemplo, PCR propensa a errores), por re-aleatorización dirigida al sitio de posiciones dentro del casete de unión preseleccionado, por sustituciones dirigidas de un único aminoácido o por modificaciones químicas. Están disponibles diferentes técnicas conocidas *per se* para la modificación de uno o más aminoácidos para los especialistas en la técnica. Estas se describirán en más detalle a continuación. Además, se hace referencia a las publicaciones de Ausubel *et al.*, 1994, así como Sambrook *et al.*, 1989.

65 Ya se conocen modificaciones de aminoácidos de la región central no expuesta en superficie de la ubiquitina (Finucane *et al.*, *Biochemistry*, vol. 38, N° 36, 1999 o Lazar *et al.*, *Protein Science* (1997), 6: 1167-1178). Las alteraciones hechas en la misma están dirigidas a posiciones no implicadas en la unión que debido a su localización dentro del núcleo hidrófobo no son accesibles al disolvente o a posibles compañeros de unión.

70 A continuación, se explicará el significado de la expresión "afinidad de unión que no existía o no existía a ese grado en la proteína no modificada" y sitio de unión artificial generado *de novo*, respectivamente, en el contexto de esta invención. Estas expresiones significan que la proteína modificada previamente muestra ninguna o poca propiedad de unión a un

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65
70

compañero de unión predeterminado. En otra realización de la invención, las proteínas a modificar se seleccionan para que no tengan afinidad de unión por el compañero de unión predeterminado. Los compañeros de unión que también pueden definirse como ligandos tienen una afinidad medible por la proteína modificada de acuerdo con la invención. Como valor mínimo para la presencia de una propiedad de unión cuantificable, es decir, la afinidad con la que se une el compañero, tiene que considerarse de acuerdo con la invención una constante de equilibrio para el complejo formado de $K_D = 10^{-5}$ M o más pequeña. Un valor de 10^{-5} M y por debajo se considera como afinidad de unión cuantificable. Dependiendo de la aplicación, se prefiere un valor de 10^{-8} M a 10^{-12} M, de forma adicional preferiblemente de 10^{-7} a 10^{-11} M para, por ejemplo, aplicaciones cromatográficas o de 10^{-9} a 10^{-12} M para, por ejemplo, aplicaciones de diagnóstico o terapéuticas. Afinidades de unión preferidas adicionales están en el intervalo de 10^{-8} a 10^{-10} M, preferiblemente hasta 10^{-11} M. Los métodos para la determinación de las afinidades de unión son conocidos *per se* y se describen adicionalmente en las siguientes páginas.

El término "modificación" de acuerdo con la invención pretende indicar sustituciones de aminoácidos, inserciones, delecciones o modificaciones químicas.

Como proteínas a modificar de acuerdo con la invención, pueden usarse proteínas de la superfamilia de "proteínas tipo ubiquitina". De acuerdo con la invención, esta superfamilia comprende los subgrupos enumerados en Murzin *et al.* (1995). Estos incluyen, por ejemplo, las familias de proteínas de "proteínas relacionadas con ubiquitina", "dominio UBX", "tipo GABARAP", "dominio de unión a RAS", etc. Preferiblemente, se usan proteínas de la familia de proteínas de "proteínas relacionadas con ubiquitina". De acuerdo con la invención, también están comprendidas aquellas proteínas que tienen un motivo de plegamiento tipo ubiquitina. Son ejemplos de éstas SUMO-1, FAU, NEDD-8, UBL-1, y GDX así como Rub1, APG8, ISG15, URM1, HUB1, elongina B, PLIC2 (dominio N-terminal), parking human (dominio N-terminal).

Las proteínas que pueden usarse de acuerdo con la invención de la superfamilia de proteínas tipo ubiquitina se han caracterizado en gran medida. Por consiguiente, la familia de proteínas tipo ubiquitina se define como una superfamilia a la que pertenece la familia de proteínas relacionadas con ubiquitina. Una característica de los miembros de las proteínas tipo ubiquitina por tanto es una lámina B antiparalela expuesta en una superficie de la proteína sobre cuyo lado posterior está empaquetada un hélice α que descansa perpendicularmente sobre la parte superior de la misma. Este motivo de plegamiento tipo ubiquitina es una característica de las proteínas que pueden usarse y modificarse de acuerdo con la invención y distingue claramente los miembros de la familia de otras proteínas. En vista de esta definición, la invención también comprende el dominio N-terminal tipo ubiquitina de PLIC-2 y el dominio tipo ubiquitina de parkina.

Los especialistas en la técnica pueden evaluar de forma preliminar con respecto a comparaciones de secuencia, los llamados alineamientos, o por consideraciones estructurales si las proteínas son un miembro de la superfamilia de proteínas de proteínas tipo ubiquitina o no. Naturalmente, la última evidencia se proporciona siempre por un análisis estructural, por ejemplo, un análisis estructural por cristalografía de rayos X o espectroscopia de resonancia magnética nuclear multidimensional. En los últimos tiempos, el análisis estructural usando algoritmos genéticos también puede proporcionar buenas predicciones.

Las proteínas de la familia y superfamilia mencionada anteriormente están altamente conservadas. De acuerdo con el actual conocimiento, la ubiquitina, por ejemplo, tiene una secuencia de aminoácidos idéntica en todos los mamíferos. La ubiquitina de levaduras difiere solamente en tres aminoácidos de esta secuencia. La ubiquitina humana o la ubiquitina de mamíferos, respectivamente, consta de 76 aminoácidos y tiene la estructura descrita al principio.

Las siguientes realizaciones se refieren al aspecto del método y al aspecto de la proteína de la presente invención.

De acuerdo con la invención, la proteína modificada debe tener al menos el 30%, preferiblemente al menos el 40% o el 50%, de forma adicionalmente preferible al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90%, o al menos el 95% de identidad en su secuencia de aminoácidos con la proteína de partida que está modificada, por ejemplo, con la ubiquitina humana donde la proteína en cualquier caso tiene un motivo de plegamiento tipo ubiquitina como se ha definido con detalle anteriormente.

De acuerdo con la invención, también los fragmentos de las proteínas mencionadas están comprendidos siempre que comprendan el motivo de plegamiento tipo ubiquitina descrito anteriormente, así como fusiones de las proteínas mencionadas con otras proteínas. En el caso de dichos fragmentos y proteínas de fusión, las posiciones de aminoácidos mencionadas en el marco de la invención se refieren a la posición respectiva en la ubiquitina humana. Ejemplos de compañeros de fusión son enzimas (informadores), toxinas, proteasas, proteínas que prolongan o reducen la vida media de la construcción u otras proteínas de unión etc. Además, puede realizarse el acoplamiento químico, por ejemplo, a sustancias de bajo peso molecular tales como biotina, digoxigenina, sustancias fluorescentes y/o luminescentes etc.

De acuerdo con una realización preferida más, la proteína se une de un modo específico de sitio y covalente a una proteína de la misma especificidad o una especificidad diferente y por tanto muestra propiedades de unión bivalentes o biespecíficas, respectivamente.

En el caso de generar proteínas de fusión, un fragmento de la construcción o todos los compañeros de la fusión pueden modificarse de acuerdo con la invención. La invención también comprende, sin embargo, que se fusione un segmento, seguido de un método de modificación, que puede comprender una modificación post-traducciona, una maduración de la afinidad, estabilidad o solubilidad o una selección adicional para la unión a la diana principal o contra una segunda molécula diana. En cada caso, esto puede hacerse de acuerdo con métodos conocidos para los especialistas en la técnica.

Puede encontrarse información más detallada respecto a cómo generar y usar proteínas de fusión o conjugados que comprenden la proteína modificada de la presente invención en el documento WO 2006/040129. Se aprecia que la presente invención también abarca la generación de homo- o heterodímeros de la proteína de la invención.

De acuerdo con la presente invención, la proteína seleccionada para la preparación de la proteína modificada preferiblemente es ubiquitina humana o ubiquitina de otro origen, por ejemplo otra ubiquitina de mamífero. Por lo tanto, la invención se describirá a continuación usando particularmente ubiquitina humana como ejemplo. La modificación de la ubiquitina humana se describirá con respecto a varios ejemplos para obtener una proteína que también puede mencionarse como muteína y que muestra afinidad de unión con respecto a un compañero de unión predeterminado que no existía previamente. Como ubiquitinas de mamífero pueden usarse particularmente ubiquitinas de roedores, animales domésticos y animales agrícolas entre el campo de los mamíferos. Si el campo de uso de las proteínas preparadas de acuerdo con la invención es conocido, es decir, si la proteína modificada se usará, por ejemplo, como una composición farmacéutica para el tratamiento de enfermedades en seres humanos, puede usarse preferiblemente una proteína humana como proteína de partida a modificar; esto también se aplica a los campos correspondientes de uso. Debe señalarse que las explicaciones dadas a continuación se basan en ubiquitina humana solamente a modo de ejemplo. En base a esta memoria descriptiva detallada y los ejemplos mencionados será posible para los especialistas en la técnica modificar proteínas adicionales que tengan motivos de plegamiento específicos de ubiquitina de acuerdo con la invención. Por tanto, la invención no está limitada a la ubiquitina humana o a la ubiquitina en general. Las indicaciones y explicaciones a este respecto se considerarán como realizaciones ejemplares de la invención que, sin embargo, son particularmente preferidas.

Lo siguientes es un corto resumen con respecto a la selección y modificación de los aminoácidos a modificar.

En base a los datos estructurales correspondientes tales como, por ejemplo, los disponibles de forma libre en Protein Data Bank™ (Berman *et al.*, 2000; <http://www.rcsb.org/pdb>), las posiciones de aquellos aminoácidos en la proteína de partida, por ejemplo, en la estructura proteica de la ubiquitina, cuyas cadenas laterales están expuestas en superficie, es decir, dirigidas hacia el disolvente o un compañero de unión potencial, pueden localizarse mediante análisis informático (Fraternali y Cavallo 2002). Además, aquellos aminoácidos en la proteína de partida, por ejemplo, en la ubiquitina, cuya sustitución aleatoria presumiblemente no tendría ninguno o solamente un ligero efecto negativo sobre la estabilidad de la estructura proteica, podrían identificarse por análisis informático. Esta información puede proporcionar una primera indicación en cuanto a la idoneidad de cada aminoácido individual como elemento de un sitio de unión y entonces requeriría verificación experimental adicional. Mediante sustituciones aleatorias de aminoácidos ("aleatorización") en la región analizada, por pueden generarse - de forma análoga al sitio de unión a antígeno de los anticuerpos - una región expuesta en superficie hipervariable sobre la estructura proteica por lo demás intacta de la ubiquitina.

De acuerdo con una realización preferida - partiendo de los datos estructurales disponibles de la ubiquitina humana (PDB 1UBQ) - se seleccionaron primero 10 posiciones de aminoácidos en la región del sitio de unión a generar. Mediante mutagénesis aleatoria específica de sitio de la secuencia primaria y la posterior selección específica, se obtuvieron aquellas variaciones que mostraron la actividad de unión deseada con respecto a un compañero de unión predeterminado. Aunque se confiere una propiedad de unión *de novo* a las proteínas modificadas obtenidas de este modo, permanecen a un elevado grado idénticas en estructura y propiedades proteoquímicas a la proteína de partida. Proporcionan ventajas tales como, por ejemplo, tamaño pequeño, alta estabilidad, preparación económica así como fácil modificación junto con alta afinidad y especificidad por un ligando previamente definido. A este respecto, la idoneidad de la ubiquitina como estructura de andamio para la generación de proteínas de unión artificiales no podía esperarse ya que 1) la tolerancia de la estructura a la sustitución extensiva de aminoácidos no podía esperarse debido al pequeño tamaño de la ubiquitina y 2) la funcionalidad del sitio de unión artificial que implica la estructura central de la hélice que se considera rígida e inflexible no parecía posible de antemano.

De acuerdo con la invención, antígeno hará referencia a una sustancia unida por un anticuerpo. El término antígeno comprende haptenos, péptidos, proteína, azúcares, ADN etc. A partir de the Roche Lexikon Medizin (4ª edición; <http://www.gesundheit.de/roche>) puede obtenerse la siguiente definición de antígeno y hapteno que también se usa para la presente invención:

Antígeno (AG): denominación para cualquier sustancia reconocida como foránea ("no propia") por el sistema inmune. Inicia en la mayoría de los casos una reacción inmune que conduce a inmunidad (= "inmunógeno"); en el caso de alergia (= "alérgeno") y atopía ("atopígeno"), respectivamente, esta reacción inmune está exagerada. El AG induce una reacción de defensa humoral (reacción antígeno-anticuerpo) y/o celular (véase inmunidad a continuación). Si el AG se tolera por el sistema inmune (tolerancia inmune) también se conoce como "tolerógeno". Son eficaces como antígeno principalmente sustancias complejas de alto peso molecular (cuerpos proteicos, polisacáridos, nucleótidos y muchos compuestos sintéticos) que tienen funcionalidades químicamente identificables (determinantes) responsables de la respuesta inmune. Se clasifican como 1) AG completo, principalmente de alto peso molecular y capaces de provocar una reacción inmune por sí mismo, 2) como hapteno de bajo peso molecular (= medio antígeno) que actúa como inmunógeno solamente después de acoplarse a una molécula vehículo más grande. Mencionados, por ejemplo, como AG autólogo, xeno-, alo- o isogénico; auto-, hetero-AG, de transplante, anti-virus tumoral.

Hapteno: compuesto químico simple, de bajo peso molecular responsable de la especificidad de un antígeno (AG) o cono capacidad de unión específica del anticuerpo debido a su estructura (determinante), respectivamente, pero incapaz de generar una alergia en contraste con un AG completo. Llega a ser un antígeno completo (antígeno) después de unirse a un cuerpo proteico llamado vehículo.

Debe señalarse que usando la presente invención también es posible generar variaciones de ubiquitina que tienen una propiedad de unión con respecto a sustancias no inmunogénicas como compañeros de unión, tales como, por ejemplo, marcadores tumorales.

5 En una realización preferida de la presente invención, se realiza una modificación, preferiblemente una sustitución, al menos parcialmente en dos o más aminoácidos directamente adyacentes en la secuencia primaria donde los aminoácidos directamente adyacentes entre sí en la estructura terciaria de forma adicionalmente preferible están localizados al menos parcialmente en la hélice de la proteína. En general, cada sustitución de un aminoácido en una proteína está acompañada por una disminución potencial de la estabilidad de la proteína. Las sustituciones sencillas pueden tolerarse principalmente debido a la influencia de aminoácidos adyacentes sin desestabilizaciones extensivas. Sin embargo, si una región completa, es decir, por ejemplo, una entidad estructural que consta de varios aminoácidos adyacentes, se cambia, ya no puede esperarse un efecto estabilizador debido a los aminoácidos directamente adyacentes.

10
15 Particularmente en el caso de la ubiquitina relativamente pequeña, la modificación de aminoácidos directamente adyacentes tiene adicionalmente la ventaja de que es más fácil de preparar una modificación de este tipo por ingeniería genética que en el caso de aminoácidos que no están directamente adyacentes entre sí. Por tanto, de acuerdo con esta realización, la generación simplificada de una gran cantidad de proteínas modificadas puede proporcionarse tanto a nivel de proteínas como a nivel de ADN.

20
25 Preferiblemente, la cantidad de sustituciones de aminoácidos directamente adyacentes es de 2 a 10, más preferiblemente de 2 a 8 aminoácidos directamente adyacentes entre sí en la secuencia primaria, de forma adicionalmente preferible de 3 a 7 o de 4 a 6 o de 2 a 4 aminoácidos directamente adyacentes entre sí en la secuencia primaria.

30 En una realización preferida adicional, se modifican 5 o más aminoácidos directamente adyacentes, preferiblemente se sustituyen, donde dos o más, preferiblemente dos o tres, aminoácidos directamente adyacentes desde el inicio o el final de una región de hélice alfa. En este caso, preferiblemente 8, 9 ó 10 aminoácidos, particularmente preferiblemente 8 aminoácidos pueden considerarse como un límite superior para la cantidad total de aminoácidos modificados directamente adyacentes.

35 En una realización preferida de la presente invención, esos aminoácidos se modifican para la generación de una región que tiene las nuevas propiedades de unión que forman una región contigua sobre la superficie de la proteína. De este modo, puede generarse una región contigua que tiene una propiedad de unión que no existía previamente. "Región contigua" de acuerdo con la invención se refiere a lo siguiente: debido a la carga, la estructura espacial y la hidrofobicidad/hidrofilicidad de sus cadenas laterales, los aminoácidos interaccionan con su entorno del modo correspondiente. El entorno puede ser el disolvente, generalmente agua, u otras moléculas, por ejemplo, aminoácidos espacialmente cercanos. Mediante la información estructural acerca de la proteína así como el software respectivo, puede caracterizarse la superficie de las proteínas. Por ejemplo, la región de superficie de contacto entre los átomos de la proteína y el disolvente puede visualizarse de este modo incluyendo la información acerca de cómo se estructura esta región de superficie de contacto, siendo dichas áreas superficiales accesibles para el disolvente o cómo se distribuyen las cargas en la superficie. Una región contigua puede ponerse de manifiesto, por ejemplo, por visualización de este tipo usando un software adecuado. Dichos métodos son conocidos para los especialistas en la técnica. De acuerdo con la invención, puede usarse básicamente también la región expuesta en superficie completa como región contigua en la superficie a modificar para la generación de nuevas propiedades de unión.

40
45
50 Para la mutagénesis de la estructura de de hélice alfa, se seleccionan preferiblemente esas regiones en la proteína que están cercanas a la superficie. Los aminoácidos expuestos en superficie pueden identificarse con respecto a la estructura cristalográfica de rayos x disponible (Vijay-Kumar, Bugg et al. 1987). Si no está disponible la estructura cristalina, pueden hacerse intentos mediante análisis informático para predecir las regiones de lámina beta expuestas en superficie y la accesibilidad de las posiciones de los aminoácidos individuales con respecto a la estructura primaria disponible (www.embl-heidelberg.de/predictprotein/predictprotein.html) o para modelar la estructura proteica 3d (www.expasy.ch/swissmo/SWISS-MODEL.html) y para obtener información acerca de los aminoácidos potenciales expuestos en superficie de este modo.

55
60 También es posible, sin embargo, realizar mutagénesis en la hélice alfa para la que puede omitirse la preselección que lleva mucho tiempo de las posiciones de aminoácidos a mutagenizar. Esas regiones de ADN que codifican las estructuras de hélice alfa se aíslan de su entorno de ADN, se someten a mutagénesis aleatoria y se re-integran después en el ADN que codifica la proteína de la que se retiraron previamente. Esto viene seguido de un proceso de selección de mutantes con las propiedades de unión deseadas.

65 Las variaciones de la estructura proteica de la ubiquitina que difieren en sustituciones de aminoácidos en la región del sitio de unión artificial generado *de novo* de la proteína precursora y entre sí pueden generarse por mutagénesis dirigida de los segmentos de secuencia respectivos. En este caso, los aminoácidos que tienen ciertas propiedades tales como polaridad, carga, solubilidad, hidrofobicidad o hidrofilicidad pueden remplazarse o sustituirse, respectivamente, por aminoácidos con otras propiedades respectivas. Más allá de las sustituciones, el término "mutagénesis" comprende también inserciones y deleciones. A nivel de proteínas, las modificaciones también pueden realizarse por alteración química de las cadenas laterales de los aminoácidos de acuerdo con métodos conocidos para los especialistas en la técnica.

70

- 5 Como punto de partida para la mutagénesis de los segmentos de secuencia respectivos, por ejemplo, pueden servir el ADNc de una proteína tipo ubiquitina, que puede prepararse, alterarse, y amplificarse por métodos conocidos para los especialistas en la técnica. Para la alteración específica de sitio de la ubiquitina en regiones relativamente pequeñas de la secuencia primaria (aproximadamente 1-3 aminoácidos), se tienen a mano reactivos y métodos disponibles en el mercado ("Quick Change", Stratagene; "Mutagene Phagemid *in vitro* Mutagenesis Kit", Biorad). Para la mutagénesis dirigida al sitio de regiones más grandes, están disponibles realizaciones específicas de, por ejemplo, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para los especialistas en la técnica. Para este propósito, puede usarse una mezcla de oligodesoxinucleótidos sintéticos que tiene composiciones de pares de bases degeneradas en las posiciones deseadas, por ejemplo, para la introducción de la mutación. Esto también puede conseguirse usando análogos de pares de bases que no existen de forma natural en el ADN genómico, tal como, por ejemplo, inosina.
- 10 El punto de partida para la mutagénesis de la región de hélice alfa puede ser, por ejemplo, el ADNc de una proteína tipo ubiquitina o también el ADN genómico. Además, el gen que codifica la proteína también puede prepararse sintéticamente.
- 15 Están disponibles diferentes métodos conocidos *per se* para la mutagénesis, que son métodos para la mutagénesis específica de sitio, métodos para mutagénesis aleatoria, mutagénesis usando PCR o métodos comparables.
- 20 En una realización preferida de la invención, se predeterminan las posiciones de aminoácidos a mutagenizar. La selección de aminoácidos a modificar se realiza dependiendo de la proteína a modificar y/o dependiendo del compañero de unión seleccionado. En cada caso, generalmente se establece una biblioteca de diferentes mutantes que se explora usando métodos conocidos *per se*. Naturalmente, una preselección de los aminoácidos a modificar puede realizarse de forma particularmente fácil si está disponible suficiente información estructural para la proteína a modificar. Sin embargo, también sin dicha información estructural usando métodos que emplean mutagénesis aleatoria y selección posterior es posible cambiar la proteína que tiene el motivo de plegamiento tipo ubiquitina para que adopte una afinidad de unión por el antígeno o compañero de unión predeterminado, respectivamente.
- 25 Pueden generarse bibliotecas basadas en, por ejemplo, 8, 10, 14 ó 18 posiciones de aminoácidos (véase el capítulo de Ejemplos). Las coordenadas de biblioteca preferidas son: E16, E18, S20, D21, T22, E24, N25, A28, K29, Q31, D32, K33, P38, D39, D52, G53, R54, T55.
- 30 Los métodos para la mutagénesis dirigida así como mutagénesis de segmentos de secuencia más largos, por ejemplo, mediante PCR, por mutagénesis química o usando cepas bacterianas de mutación también pertenecen a la técnica previa y pueden usarse de acuerdo con la invención.
- 35 En una realización de la invención, la mutagénesis se realiza por ensamblaje de oligonucleótidos de ADN que llevan la estequiometría de codones de triplete NNK. Debe entenderse, sin embargo, que también pueden usarse otras estequiometrías de codones, preferiblemente motivos NNB y NWB.
- 40 En una realización adicional de la invención, se usan estequiometrías de codones de triplete, que codifican al menos 2 ó 3 aminoácidos, preferiblemente 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 ó 19 aminoácidos.
- 45 Las mutaciones se realizan de tal modo que se mantiene la estructura secundaria. Las mutagénesis específicas de sitio que comprenden una región relativamente pequeña en la estructura primaria (aproximadamente 3-5 aminoácidos) pueden generarse con los kits disponibles en el mercado de Stratagene (QuickChange) o Bio-Rad (Mutagene phagemid *in vitro* mutagenesis kit) (cf. US-A-5.789.166; US-A-4.873.192).
- 50 Si regiones más extensas se someten a mutagénesis específica de sitio, debe prepararse un casete de ADN donde se obtiene la región a mutagenizar por el ensamblaje de oligonucleótidos que contienen las posiciones mutadas y las no cambiadas (Nord *et al.*, 1997; McConell y Hoess, 1995). Las mutagénesis aleatorias pueden introducirse por propagación del ADN en cepas de mutación o por amplificación de PCR (PCR propensa a errores) (por ejemplo, Pannekoek *et al.*, 1993). Para este propósito, se usa una polimerasa con una tasa aumentada de errores. Para potenciar el grado de la mutagénesis introducida o para combinar diferentes mutaciones, respectivamente, las mutaciones en los fragmentos de PCR pueden combinarse mediante Arrastre de ADN (Stemmer, 1994). Se proporciona una revisión de estas estrategias de mutagénesis con respecto a enzimas en la revisión de Kuchner y Arnold (1997). Para realizar esta mutagénesis aleatoria en una región de ADN seleccionada, también debe construirse un casete de ADN que se usa para la mutagénesis.
- 55 De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, solamente se modifican las posiciones de aminoácidos para la generación de una nueva propiedad de unión que no pertenecen a regiones que en la ubiquitina no modificada están implicadas en uniones a compañeros de unión naturales de la ubiquitina. Esto asegura que no se alteren solamente las propiedades de unión ya presentes.
- 60 Las regiones para modificación pueden seleccionarse básicamente en cuanto si pueden estar accesibles para un posible compañero de unión y si la estructura global de la proteína supuestamente mostrará tolerancia a una modificación.
- 65 En la proteína, preferiblemente la ubiquitina para mamíferos, al menos el 15% de los aminoácidos presentes en la región de hélice alfa, preferiblemente al menos el 20%, adicionalmente preferible al menos el 25%, puede modificarse, preferiblemente sustituirse, de acuerdo con la presente invención para generar una propiedad de unión que no existía
- 70

previamente. Se modifica, preferiblemente se sustituye un máximo de forma preferible de aproximadamente el 40% de los aminoácidos presentes en la región de hélice alfa, adicionalmente preferible un máximo de aproximadamente el 35% e incluso de forma más preferible aproximadamente el 30%.

5 De acuerdo con una realización preferida, las modificaciones comprenden una región contigua de 5 a 10 aminoácidos, preferiblemente de 6 a 8 aminoácidos donde preferiblemente de 2 a 4 aminoácidos de la misma descansan en una región expuesta en superficie de la hélice alfa.

10 En la proteína usada en la presente invención, se modifican los aminoácidos de la cadena de hélice alfa y de forma opcionalmente adicional se modifican los aminoácidos en las posiciones cadena arriba de la hélice o en las posiciones cadena abajo de la hélice que descansan fuera de la hélice alfa. Como se ha mencionado anteriormente, en una realización altamente preferida, se modifican los aminoácidos 22-32 de la cadena de hélice alfa y de forma opcionalmente adicional (en aminoácidos de ubiquitina de mamífero) se modifican las regiones de los aminoácidos 16-21 (posiciones cadena arriba de la hélice) o 38-55 (posiciones cadena abajo de la hélice) que descansan fuera de la hélice alfa. Preferiblemente, en la proteína de la invención, la proteína modificada es ubiquitina humana sustituida, delecionada, insertada y/o modificada químicamente, preferiblemente sustituida, en 4 o más de las posiciones 16, 18, 20, 21, 22, 24, 25, 28, 29, 31, 32, 33, 38, 39, 52, 53, 54, y/o 55.

20 En la proteína usada en la presente invención, preferiblemente, una parte de los aminoácidos modificados directamente adyacentes entre sí en la secuencia primaria está en una región de inicio o de final de la región de hélice alfa donde esta parte tiene una longitud de dos o más aminoácidos, preferiblemente dos o tres aminoácidos.

25 En una realización adicional, la proteína usada en la invención se ubiquitina humana o una proteína homóloga a la misma, donde al menos 4 aminoácidos de la hélice en la ubiquitina están modificados, preferiblemente sustituidos, de modo que estos aminoácidos modificados comprenden la región con afinidad de unión por el compañero de unión.

30 Como se ha mencionado anteriormente, la presente invención, en un aspecto principal, se refiere a un método para la generación de una proteína seleccionada entre el grupo compuesto por proteínas de la superfamilia de proteínas de "proteínas tipo ubiquitina", proteínas que tienen un motivo de plegamiento tipo ubiquitina así como fragmentos o proteínas de fusión de las mismas cada una de las cuales tiene el motivo de plegamiento tipo ubiquitina, donde la proteína, debido a una o más modificaciones de aminoácidos en la región de hélice alfa muestra una afinidad de unión mejorada con respecto a un agente cuya afinidad de unión no existía o no existía a ese grado en la proteína no modificada, con las siguientes etapas:

35 a) seleccionar una proteína no modificada de la superfamilia de "proteínas tipo ubiquitina";
b) proporcionar un agente para el que la proteína no modificada tiene baja o ninguna afinidad de unión;
c) seleccionar aminoácidos en una región expuesta en superficie de la proteína incluyendo la región de hélice alfa;

40 d) modificar los aminoácidos seleccionados preferiblemente por sustitución, inserción, deleción y/o modificación química, donde se modifican al menos cuatro aminoácidos expuestos en superficie en la hélice alfa o regiones adyacentes;

e) poner en contacto la proteína modificada con el agente proporcionado en la etapa b);
f) detectar las proteínas que tienen una afinidad de unión nueva o potenciada con respecto al agente proporcionado en la etapa b), y opcionalmente

45 g) producir la proteína modificada en un sistema de expresión de proteínas procarionota, eucariota, *in vitro* adecuado o por síntesis química;

h) aislar las proteínas después de su producción por un método de purificación adecuado; y adicionalmente de forma opcional

50 i) realizar una maduración de la proteína modificada repitiendo las etapas d - h), donde la afinidad de unión, expresada en KD, de la proteína modificada por el agente es de 10^{-5} M a 10^{-12} M, de forma adicionalmente preferible de 10^{-6} a 10^{-12} M o de 10^{-9} a 10^{-12} M.

55 En una realización preferida, la etapa d) se realiza por síntesis química de la proteína modificada, o como alternativa, la modificación de la etapa d) se realiza mediante ingeniería genética para alterar un ADN que pertenece a la proteína modificada correspondiente. Como se ha mencionado anteriormente, en la etapa d) se establece preferiblemente una genoteca por mutagénesis aleatoria o se realiza una sustitución aleatoria de los aminoácidos seleccionados.

60 En la etapa e), el contacto con el compañero de unión predeterminado se realiza preferiblemente mediante un método de selección adecuado, preferiblemente el método de presentación en fagos, presentación en ribosomas, presentación de ARNm, presentación CIS o presentación en superficie celular, presentación en superficie de levaduras, presentación en superficie de bacterias, de forma particularmente preferible mediante el método de presentación en fagos.

65 En la etapa f), la detección de las proteínas que tienen afinidad de unión por el compañero de unión predeterminado se realiza preferiblemente por uno o más de los siguientes métodos: ELISA, espectroscopía por resonancia de plasmón superficial, perfilado de resonancia, tecnologías de perlas, espectroscopía de fluorescencia, FACS, calorimetría por valoración isotérmica o ultracentrifugación analítica.

En una realización, la proteína se madura por métodos conocidos *per se* con respecto a su afinidad de unión, su especificidad de unión y/u otras propiedades proteoquímicas tales como estabilidad, solubilidad, o rendimiento.

Además, la proteína de la invención se une covalentemente de un modo específico de sitio o de tipo aleatorio a al menos una proteína de la misma o diferente especificidad y por tanto muestra propiedades de unión bivalentes o multivalentes o biespecíficas, respectivamente.

5 La presente invención describe adicionalmente una proteína que se puede obtener por los métodos descritos anteriormente en este documento.

La presente invención describe un ácido nucleico que codifica esta proteína. Generalmente, el término "ácido nucleico" como se usa en este documento abarca tanto ARN como ADN, incluyendo ADNc, ADN genómico, y ADN sintético (por ejemplo, sintetizado químicamente).

10 La etapa de modificación de los aminoácidos seleccionados se realiza de acuerdo con la invención preferiblemente por mutagénesis a nivel genético por mutagénesis aleatoria, es decir, una sustitución aleatoria de los aminoácidos seleccionados. Preferiblemente, la modificación de la etapa d) se realiza mediante métodos de ingeniería genética para la alteración de un ADN que pertenece a la proteína respectiva. Preferiblemente, la expresión de la proteína entonces se realiza en organismos procariotas o eucariotas.

De acuerdo con la invención, una proteína modificada puede prepararse de forma adicionalmente preferible por síntesis química. En esta realización, las etapas c) a d) de la segunda realización entonces se realizan en una etapa.

20 A continuación se ilustran la selección y determinación, respectivamente, de los aminoácidos con afinidad de unión con respecto a un compañero de unión predeterminado, también llamado simplemente "agente" en este documento:

Después de haber establecido una biblioteca de proteínas por modificación de aminoácidos seleccionados, las proteínas modificadas se ponen en contacto, de acuerdo con la invención, con un compañero de unión predeterminado para posibilitar opcionalmente la unión de los compañeros entre sí si existe afinidad de unión.

25 El contacto de acuerdo con la invención se realiza preferiblemente mediante un método de presentación y selección adecuado tal como los métodos de presentación en fagos, presentación en ribosomas, presentación de ARNm o presentación en superficie celular, presentación en superficie de levaduras o presentación en superficie de bacterias, preferiblemente mediante el método de presentación en fagos. Para una descripción completa, se hace referencia también a las siguientes referencias: Hoess, Curr. Opin. Struct. Biol. 3 (1993), 572-579; Wells y Lowmann, Curr. Opin. Struct. Biol. 2 (1992), 597-604; Kay et al., Phage Display of Peptides and Proteins - A Laboratory Manual (1996), Academic Press. Los métodos mencionados anteriormente son conocidos para los especialistas en la técnica y pueden usarse de acuerdo con la invención incluyendo modificaciones de los mismos.

30 La determinación de si la proteína modificada tiene una afinidad de unión cuantificable con respecto a un compañero de unión predeterminado puede realizarse de acuerdo con la invención preferiblemente por uno o más de los siguientes métodos: ELISA, espectroscopía por resonancia de plasmón superficial, espectroscopía de fluorescencia, FACS, calorimetría por valoración isotérmica y ultracentrifugación analítica.

35 A continuación se describe un tipo de procedimiento de *presentación en fagos* adaptado a esta aplicación como un ejemplo para un procedimiento de selección de acuerdo con la invención con respecto a variaciones de ubiquitina que muestran propiedades de unión. Del mismo modo, por ejemplo, pueden aplicarse métodos para la presentación en bacterias (*presentación en superficie de bacterias*; Daugherty *et al.*, 1998) o células de levadura (*presentación en superficie de levaduras* Kieke *et al.*, 1997) o sistemas de selección sin células tales como *presentación en ribosomas* (Hanes y Pluckthun, 1997; He y Taussig, 1997) o *presentación cis* (Odegrip *et al.*, 2003) o la presentación de ARNm. En el último caso, se consigue una unión física transitoria del genotipo y el fenotipo acoplando la proteína variante con el ARNm apropiado mediante el ribosoma.

40 En el procedimiento de *presentación en fagos* descrito en este documento, se presentan variaciones recombinantes de la ubiquitina en fagos filamentosos mientras que el ADN codificante de la variación presentada está presente al mismo tiempo empaquetado en forma monocatenaria en la envuelta del fago. Por tanto, en el marco del enriquecimiento de la afinidad, pueden seleccionarse variaciones que tengan ciertas propiedades a partir de una biblioteca y pueden amplificarse su información genérica por infección de bacterias adecuadas o añadirse a otro ciclo de enriquecimiento, respectivamente. La presentación de la ubiquitina mutada en la superficie del fago se consigue por fusión genética a una secuencia señal amino-terminal - preferiblemente la secuencia señal PelB - y una proteína de cápsida o superficial del fago - se prefiere la fusión carboxi-terminal a la proteína de cápsida pIII o un fragmento de la misma. Además, la proteína de fusión codificada puede contener adicionalmente elementos funcionales tales como, por ejemplo, una marca de afinidad o un epítipo de anticuerpo para la detección y/o purificación por cromatografía de afinidad o una secuencia de reconocimiento de proteasa para la escisión específica de la proteína de fusión en el transcurso del enriquecimiento de la afinidad. Además, puede estar presente un codón de parada ámbar, por ejemplo, entre el gen para la ubiquitina variante y la región codificante de la proteína de cápsida del fago o el fragmento de la misma que no se reconoce durante la traducción en una cepa supresora adecuada parcialmente debido a la introducción de un aminoácido.

65 El vector bacteriano adecuado para el procedimiento de selección en el contexto del aislamiento de variaciones de ubiquitina con propiedades de unión por un hapteno o antígeno predeterminado y en el que está insertado el casete genético para la proteína de fusión descrita, se conoce como fasmido. Entre otros, contiene la región intergénica de un fago filamentosos (por ejemplo, M13 o f1) o una parte de la misma que en el caso de una superinfección de la célula bacteriana que lleva el fagómido, mediante fagos auxiliares tales como, por ejemplo, M13K07, provoca el empaquetado de una cadena cerrada del ADN fasmídico en una cápsida del fago. Los fagómidos generados de este modo se secretan

5 por la bacteria y presentan la variación de ubiquitina respectiva codificada - debido a su fusión con la proteína de cápsida pIII o el fragmento de la misma - en su superficie. Las proteínas de cápsida pIII nativas están presentes en el fagómido de modo que se retiene su capacidad de re-infectar cepas bacterianas adecuadas y por lo tanto la posibilidad de amplificar el ADN correspondiente. Por tanto, se asegura la unión física entre el fenotipo de la variación de ubiquitina - es decir su propiedad de unión potencial - y su genotipo.

10 Los fagómidos obtenidos pueden seleccionarse con respecto a la unión de la variación de ubiquitina presentada en los mismos a haptenos o antígenos predeterminados mediante métodos conocidos para los especialistas en la técnica. Para este propósito, las variaciones de ubiquitina presentadas pueden inmovilizarse de forma transitoria en la sustancia diana unida, por ejemplo, en microplacas de titulación y pueden eluirse específicamente después de que se haya separado las variaciones no de unión. La elución se realiza preferiblemente por soluciones básicas tales como, por ejemplo, trietilamina 100 mM. Como alternativa, la elución puede realizarse en condiciones ácidas, por proteólisis o adición directa de bacterias infectadas. Los fagómidos obtenidos de este modo pueden volver a amplificarse y enriquecerse por ciclos sucesivos de selección y amplificación de variaciones de ubiquitina con propiedades de unión por un hapteno o antígeno predeterminado.

15 Puede realizarse caracterización adicional de las variaciones de ubiquitina obtenidas de este modo en forma del fagómido, es decir, fusionadas al fago, o después de clonación del casete génico correspondiente en un vector de expresión adecuado en forma de una proteína soluble. Los métodos apropiados son conocidos para los especialistas en la técnica o se describen en la bibliografía. La caracterización puede comprender, por ejemplo, la determinación de la secuencia de ADN y por tanto de la secuencia primaria de las variaciones aisladas. Además, la afinidad y la especificidad de las variaciones aisladas pueden detectarse, por ejemplo, mediante métodos inmunológicos convencionales tales como ELISA o espectroscopía por resonancia de plasmón superficial, espectroscopía de fluorescencia, FACS, calorimetría por valoración isotérmica o ultracentrifugación analítica. En vista del análisis de estabilidad, por ejemplo, los métodos espectroscópicos en relación al desplegamiento químico o físico son conocidos para los especialistas en la técnica.

20 En el procedimiento también usado de *presentación en ribosomas*, se preparan variaciones de ubiquitina mediante un sistema de transcripción/traducción sin células y se presentan en forma de un complejo con el ARNm correspondiente así como el ribosoma. Para este propósito, se usa una biblioteca de ADN como se ha descrito anteriormente como base en la que los genes de las variaciones están presentes en forma de fusiones con las secuencias reguladoras correspondientes para la expresión y biosíntesis de proteínas. Debido a la delección del codón de parada en el extremo 3' de la genoteca así como las condiciones experimentales adecuadas (baja temperatura, elevada concentración de Mg^{2+}), se mantiene el complejo ternario que consta de la proteína naciente, el ARNm y el ribosoma durante la transcripción/traducción *in vitro*.

35 Estos complejos pueden seleccionarse con respecto a la unión de la variación de ubiquitina presentada en los mismos a haptenos o antígenos predeterminados mediante métodos conocidos para los especialistas en la técnica. Para este propósito, las variaciones de ubiquitina presentadas en los complejos ribosómicos pueden inmovilizarse transitoriamente en la sustancia diana unida, por ejemplo, a microplacas de titulación o pueden unirse a partículas magnéticas después de la unión en solución, respectivamente. Depuse de la separación de las variaciones no de unión, la información genética de las variaciones con actividad de unión pueden eluirse específicamente en forma del ARNm por destrucción del complejo ribosómico. La elución se realiza preferiblemente con EDTA 50 mM. El ARNm obtenido de este modo puede aislarse y transcribirse de forma inversa en ADN usando métodos adecuados (reacción de transcriptasa inversa), y el ADN obtenidos de este modo puede volver a amplificarse.

40 Mediante ciclos sucesivos de transcripción/traducción, selección, y amplificación *in vitro*, pueden enriquecerse variaciones de ubiquitina con propiedades de unión por un hapteno o antígeno predeterminado.

45 La caracterización adicional de las variaciones de ubiquitina obtenidas de este modo puede realizarse en forma de una proteína soluble como se ha detallado anteriormente después de la clonación del casete génico correspondiente en un vector de expresión adecuado. Los métodos apropiados son conocidos para los especialistas en la técnica o se describen en la bibliografía.

50 Después de la expresión de las proteínas modificadas de acuerdo con la invención que tienen el motivo de plegamiento tipo ubiquitina, éstas pueden purificarse y enriquecerse adicionalmente por métodos conocidos *per se*. Los métodos seleccionados dependen de varios factores conocidos *per se* para los especialistas en la técnica, por ejemplo, el vector de expresión usado, el organismo hospedador, el campo pretendido de uso, el tamaño de la proteína y otros factores. Para una purificación simplificada, las proteínas modificadas de acuerdo con la invención pueden fusionarse con otras secuencias peptídicas que tienen una afinidad aumentada por materiales de separación. Preferiblemente, se seleccionan fusiones que no tienen un efecto perjudicial sobre la funcionalidad de la proteína ubiquitina o pueden separarse después de la purificación debido a la introducción de sitios de escisión específicos para proteasa. Dichos métodos son también conocidos *per se* para los especialistas en la técnica.

55 De acuerdo con la invención y particularmente de acuerdo con el procedimiento descrito inmediatamente arriba, pueden aislarse en general variaciones de ubiquitina con afinidad de unión con respecto a un compañero de unión predeterminado tal como, por ejemplo, un hapteno o antígeno. Se aprecia que la expresión "compañero de unión predeterminado" corresponde al término "agente". Por tanto, "un compañero de unión predeterminado para el que no existía o no existía a ese grado una afinidad de unión" corresponde a "un agente para el que la proteína no modificada tiene baja o ninguna afinidad de unión".

5 Como compañero de unión (agente) para las proteínas modificadas proporcionadas de acuerdo con la invención, pueden emplearse todas las moléculas biológica y médicamente activas y relevantes. Los posibles compañeros de unión se describirán a continuación a modo de ejemplo. Debe apreciarse, sin embargo, que puede añadirse una pluralidad de otros posibles ligandos a esta lista. De forma similar a la relación entre un anticuerpo y un antígeno, puede completarse la lista de compañeros de unión potenciales por ligandos potenciales adicionales.

10 Preferiblemente, el compañero de unión es un receptor biológico, preferiblemente un receptor acoplado a proteína G (GPCR; por ejemplo, receptor GLP-1 humano, receptor PTH humano, receptor adrenérgico humano), o el receptor EGF, IGF1R, HER2, HER3, VEGF/R1-4, Ep-CAM, o un ligando o un dominio del mismo, un marcador tumoral (antígeno de membrana específico de próstata (PSMA)), citoquinas (factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), factor de necrosis tumoral beta (TNF- β), interleuquinas (por ejemplo, IL-2, IL-6, IL-8, IL-11, IL-12, IL-13), factores de crecimiento (por ejemplo, NGF (factor de crecimiento de nervios) y la pro-forma de los mismos, ProNGF, BMP, EGF, MIA, MIA-2, FGF, factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), PDGF, PIGF, IGF), quinasas, integrinas (por ejemplo, receptor de glucoproteína IIb/IIIa (GPIIb/IIIa)), HSA (albúmina sérica humana), fimbria F4, antígeno de células T y B, preferiblemente CD4, CD11, CD14, CD16, CD20, CD22, CD25, CD34, CD47, CD56, CD83, CD154, CTLA-4, una inmunoglobulina o una parte de la misma, por ejemplo, un anticuerpo completo (por ejemplo, inmunoglobulina G, E, M), una parte Fc de, por ejemplo, la inmunoglobulina M humana o un segmento de un anticuerpo en la región del sitio de unión a antígeno, o un azúcar (Lewis Y, Lewis X), o una toxina, por ejemplo micotoxina, o una hormona, por ejemplo, hidrocortisona.

20 Las proteínas de la presente invención pueden usarse adicionalmente para la detección y para la determinación cuantitativa así como para la separación y aislamiento del compañero de unión respectivo.

25 Otra aplicación es en el diagnóstico y tratamiento de enfermedades en las que está implicado el compañero de unión respectivo.

30 Como ya se ha mencionado, la presente invención también se refiere a la alteración dirigida de posiciones individuales de aminoácidos que están localizadas fuera del sitio de unión artificial generado *de novo*. De este modo, por ejemplo, las posiciones ocupadas por aminoácidos responsables de su función biológica en la ubiquitina natural pueden ocuparse por otros aminoácidos. De este modo, se obtiene una estructura proteica de ubiquitina que con respecto a sus funciones biológicas tal como, por ejemplo, con respecto a la interacción con enzimas de la cascada de ubiquitinación, es inactiva pero con respecto a su estructura y propiedades proteoquímicas es en gran medida idéntica a la proteína de partida.

35 Para las proteínas modificadas y seleccionadas de acuerdo con la invención, por tanto, está disponible un amplio espectro de posibles aplicaciones. Pueden usarse no solamente en el campo médico-farmacéutico sino también en los campos de la analítica, de la industria de nutrientes y productos alimentarios, de suplementos nutricionales, de cosméticos, de diagnóstico y análisis médico y no médico etc. Naturalmente, el campo de uso depende del tipo de compañero de unión seleccionado.

40 En el campo de la terapia y profilaxis médica humana y veterinaria, pueden prepararse medicamentos farmacéuticamente eficaces por métodos conocidos *per se*. Dependiendo de la preparación galénica, estas composiciones pueden administrarse por vía intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, transdérmica, o por otros métodos de aplicación. El tipo de preparación farmacéutica depende del tipo de enfermedad a tratar, la gravedad de la enfermedad, el paciente a tratar y otros factores conocidos para los especialistas en la técnica de la medicina. La administración puede ser parenteral por inyección o por infusión, inhalación, sistémica, oral, rectal o por otros métodos empleados convencionalmente.

50 Las composiciones se adaptan para que contengan una dosis terapéuticamente eficaz. La cantidad de la dosis a administrarse depende del organismo a tratar, el tipo de enfermedad, la edad y peso del paciente y factores adicionales conocidos *per se*.

Las composiciones pueden contener agentes auxiliares conocidos *per se*. Estos incluyen, por ejemplo, agentes estabilizadores, agentes tensioactivos, sales, tampones, agentes colorantes, etc.

55 La composición farmacéutica puede estar en forma de una preparación líquida, una crema, una loción para aplicación tópica, un aerosol, en forma de polvos, gránulos, comprimidos, supositorios, o cápsulas, en forma de una emulsión o una preparación liposómica. Las composiciones son preferiblemente estériles, no pirogénicas e isotónicas y contienen los aditivos farmacéuticamente convencionales y aceptables conocidos *per se*. Además, se hace referencia a las regulaciones de la farmacopea de EEUU.

60 Los siguientes Ejemplos se proporcionan para ilustración adicional de la invención. La invención se demuestra particularmente con respecto a la modificación de la ubiquitina como ejemplo. La invención, sin embargo, no está limitada a la misma, y los siguientes Ejemplos simplemente muestran la practicabilidad de la invención en base a la anterior descripción. Para una descripción completa de la invención, se hace referencia también a la bibliografía citada en la solicitud y en el anexo.

65 A continuación, la presente invención se describirá en más detalle con respecto a los Ejemplos y las Figuras adjuntas donde se ilustra lo siguiente:

70 Fig. 1: Diagrama de cintas de la ubiquitina humana de tipo silvestre. (PDB 1D3Z; Pymol, Versión 0.98)

Fig. 2: Diagrama de cintas de la ubiquitina humana de tipo silvestre. (PDB 1D3Z). Los aminoácidos que ensamblan el núcleo hidrófobo de la proteína están pintados como esferas verdes. (Pymol, Versión 0.98).

5 Fig. 3: Diagrama de cintas de la ubiquitina humana de tipo silvestre. (PDB 1D3Z) Los aminoácidos T22, E24, N25, A28, K29, Q31, D32 y K33 pertenecen a la hélice (rojo). Las posiciones cadena arriba de la hélice E16, E18, S20, D21 están pintadas en verde. Las posiciones cadena abajo de la hélice P38, D39, D52, G53, R54, T55 están pintadas en naranja. La parte dominante de la biblioteca es la hélice. (Pymol, Versión 0.98)

10 Fig. 4: Presentación superficial de la ubiquitina humana de tipo silvestre. (PDB 1D3Z) Los aminoácidos T22, E24, N25, A28, K29, Q31, D32 y K33 pertenecen a la hélice (rojo). Las posiciones cadena arriba de la hélice E16, E18, S20, D21 están pintadas en verde. Las posiciones cadena abajo de la hélice P38, D39, D52, G53, R54, T55 están pintadas en naranja. La parte dominante de la biblioteca es la hélice. (Pymol, Versión 0.98)

15 Fig. 5: Presentación superficial de la ubiquitina humana de tipo silvestre. (PDB 1D3Z; Pymol, Versión 0.98). El sitio de unión máxima de 1485 \AA^2 está coloreado en rojo.

Fig. 6: Diagrama de cintas de la ubiquitina humana de tipo silvestre. (PDB 1D3Z; Pymol, Versión 0.98) Las posiciones de los aminoácidos que ensamblan la biblioteca basada en lámina están coloreadas en azul.

20 Fig. 7: Presentación superficial de la ubiquitina humana de tipo silvestre. (PDB 1D3Z; Pymol, Versión 0,98). Los aminoácidos que ensamblan la biblioteca basada en lámina están coloreados en azul.

25 Fig. 8: La construcción de presentación en ribosomas SPA10. Los cebadores están pintados como flechas azules. Se usaron los cebadores forw.MunRD y R3MunEco para generar los sitios de restricción EcoRI y MunI para el posterior ligamiento de restricción del fragmento de biblioteca y el fragmento espaciador. El cebador RDRT se usó para la transcripción inversa. Se usaron los pares de cebadores F1/RDRT y F1A/RDRT para las amplificaciones de PCR durante el procedimiento de selección por presentación en ribosomas. Las cruces rojas marcan los cebadores SPAF2, SPAF3 y SPAR2, que introducen las mutaciones dirigidas al sitio para generar la biblioteca.

30 Fig. 9: Hit-ELISA ejemplar que muestra variantes de la biblioteca SPA10 frente a $\text{TNF}\alpha$ (rojo) y BSA (azul) como fondo.

Fig. 10: Secuencia de aminoácidos de la variante de ubiquitina de unión a $\text{TNF}\alpha$ 2E11. Están marcadas 10 posiciones de aminoácidos sustituidos en amarillo. La posición K33 se convirtió en E (rojo).

35 Fig. 11: Perfil cromatográfico de SEC (Superdex 75, 1,6 x 60, GE Healthcare) durante la purificación de la variante de ubiquitina 2E11. La fracción B5 se usó para estudios de unión adicionales.

40 Fig. 12: ELISA que muestra la características de unión dependientes de concentración de $\text{TNF}\alpha$ de SPA 14 variante 2E11. Círculos rellenos: Variante 2E11 frente a $\text{TNF}\alpha$. Círculos vacíos: Variante 2E11 frente a BSA. Por un ajuste de curva sigmoidea no lineal se determinó una afinidad aparente de 400 nM ($R = 0,99$). El ajuste se creó con Sigma Plot (Vers. 6.10)

Ejemplos

45 A continuación, se presentan datos que describen cómo se construyó una biblioteca de ubiquitina usando la hélice como motivo de estructura secundaria central. Se seleccionaron variantes de unión activa frente a $\text{TNF}\alpha$ mediante algunas realizaciones de la tecnología de selección por presentación en ribosomas. Los compuestos de unión se produjeron de forma recombinante en forma de proteínas solubles en *E. coli*. Las variantes que mostraban actividad de unión a $\text{TNF}\alpha$ se identificaron por un procedimiento de exploración hit-ELISA. Por un ELISA dependiente de la concentración, se determinó la afinidad aparente de uno de estos compuestos de unión de "primera generación" a $\text{TNF}\alpha$ a 400 nM.

Coordenadas de biblioteca de la biblioteca de ubiquitina y diferentes realizaciones de la misma

55 Los aminoácidos T22, E24, N25, A28, K29, Q31, D32 y K33 pertenecen a la hélice alfa de la ubiquitina humana y representan las posiciones centrales de la biblioteca (Fig. 3). Las posiciones cadena arriba de la hélice E16, E18, S20, D21 y las posiciones cadena abajo de la hélice P38, D39, D52, G53, R54, T55 aumentan adicionalmente el área accesible en superficie hasta un máximo de 1485 \AA^2 (Fig. 4, 5). Estas posiciones adyacentes pertenecen a los bucles de giro de conexión de la ubiquitina. La posición F45 se mutó en W para aumentar el coeficiente de extinción para facilitar los análisis espectroscópicos (Khorasanizadeh, Peters et al. 1993). Se aleatorios en total un máximo de 11 restos. Se construyeron diferentes realizaciones de la biblioteca de hélice. En una primera realización, se generó la biblioteca SPA10, en la que se aleatorizaron 10 posiciones de aminoácidos a nivel de ADN usando la estequiometría de codones NNK (S20, T22, E24, N25, A28, Q31, P38, G53, R54, T55). La biblioteca SPA10 debe generar una superficie de 750 \AA^2 . En un segundo enfoque, se aleatorizaron 14 posiciones (SPA14: S20, D21, T22, E24, N25, A28, K29, Q31, D32, P38, D52, G53, R54, T55) para generar una superficie aumentada de 1011 \AA^2 . El enfoque final fue la biblioteca SPA18, por la que se mutagenizaron 18 restos para generar una superficie máxima de 1485 \AA^2 (E16, E18, S20, D21, T22, E24, N25, A28, K29, Q31, D32, K33, P38, D39, D52, G53, R54, T55).

70 A continuación se describe un ejemplo donde se seleccionaron variantes de ubiquitina de unión a $\text{TNF}\alpha$ a partir de la biblioteca SPA10.

Ejemplo 1:

Se describe la síntesis basada en PCR de la biblioteca SPA10

5 En una *PCR de ligamiento con extensión solapante* se ensamblaron cinco oligonucleótidos para sintetizar el fragmento de ADN de la biblioteca (Fig. 8). Tres de los cebadores de síntesis, SPAF2, SPAF3 y SPAR2, se sintetizaron como oligonucleótidos aleatorizados específicos de secuencia, que codificaban la biblioteca de hélice SPA10.

10 La primera etapa de síntesis se realizó del siguiente modo: 100 μ l de volumen de PCR que contenía dNTP 0,2 mM (solución madre 10 mM, dNTPmix, ROCHE); 5 unidades de polimerasa PWO (solución madre de 250 unidades, ROCHE); cebador SPAF1 5'-GTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACA TATGCAGATTTTTGTGAAAACCC-3' 1 μ M; cebador SPAF2 5'-CACTCTGGAAGTGGAGCCCNKAGACNNKATCNCNNKNNKGTGAAGNKAAGATCNCNKAC AAGGAGGGCATCCCG-3' 0,25 μ M; cebador SPAF3 5'-CTGGGCGGGTAAACAGCTCGAAGACNNKNNKCTGAGCATTACAACATCCAGAAAGAAAGC-3' 0,25 μ M; cebador SPAR1 5'-CGCAGACGCAGCACC AGATGCAGGGTGCTTTCTTTCTGGATGTTGTAATCGC-3' 1 μ M; cebador SPAR2 5'-CGAGCTGTTTACCCGCCAGATCAGACGCTGCTGATCMNNCGG GATGCCCTCCTTGTC-3' 0,25 μ M; cebador SPAR3 5'-GGGCTCCACTTCCAG AGTGATGGTCTTGCCGGTCAGGGTTTTACAAAAATCTGC-3' 0,25 μ M. El perfil de PCR fue el siguiente: (30 segundos a 94°C; 60 segundos a 55°C; 40 segundos a 72°C) x 30.

20 El producto de PCR se resolvió en un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio al 1,5%. La banda de ADN diana se extrajo a 250 pb del gel usando el kit Qiagen Gel Extraction de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para generar un tamaño de biblioteca de aproximadamente 10^{11} variantes, se transfirieron al menos 100 ng del producto de PCR purificado de la primera etapa de síntesis como molde en la siguiente etapa de PCR accesoria. En esta etapa de síntesis, el fragmento de la biblioteca se volvió a amplificar por cebadores terminales que añadían en las secuencias reguladoras similares el motivo del gen RBS 10 (cebador F1) y un sitio de restricción EcoRI para el posterior procedimiento de ligamiento por restricción. El ensayo de PCR reunió un volumen de 100 μ l que contenía dNTP 0,2 mM (solución madre 10 mM, dNTPmix, ROCHE); 5 unidades de polimerasa PWO (solución madre de 250 unidades, ROCHE); cebador F1 5'-GGAGACCACAACGGTTTCCCTCTAGAAA TAATTT GTTTAACTTTA AGAAGGAGATATACATATG-3' 1 μ M y cebador R3 MunEco 5'-GAATTCAC TACCTCCGCCGCCAGC AGACGCAGCACCAGATGC-3' 1 μ M.

El perfil de PCR fue: (30 segundos a 94°C; 60 segundos a 65°C; 40 segundos a 72°C) x 30.

35 El producto de PCR se resolvió de nuevo en un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio al 1,5%. La banda de ADN diana a 305 pb se aisló del gel y se purificó como se ha descrito anteriormente.

40 Se transfirieron 100 ng del producto de PCR de la etapa 2 a la PCR de síntesis final como molde. El ajuste de PCR fue como se ha descrito anteriormente, usando los cebadores F1A 5'-CATACGAAATTAATACGACTCA CTATAGGGAGACCACAACGGTTTCCC-3' y R3MunEco a 1 μ M cada uno. El cebador directo F1A introduce una secuencia promotora T7 cadena arriba del fragmento de ADN. El perfil de PCR fue: (30 segundos a 94°C; 60 segundos a 60°C; 40 segundos a 72°C) x 30.

45 El producto de PCR se aisló de nuevo a partir de un gel de agarosa al 1,5 preparativo teñido con bromuro de etidio a 333 pb. El producto de PCR, que se parece al fragmento de ADN que codifica SPA10, se purificó como ya se ha descrito anteriormente.

50 El espaciador de presentación en ribosomas se generó del siguiente modo. El plásmido pIVEX2.3MCSRd contenía la secuencia de ADN del espaciador de presentación en ribosomas. La secuencia no tiene secuencias afines de origen natural. No contiene ningún codón de parada para atascar al ribosoma de traducción en el extremo 3' del ARNm. La secuencia del espaciador de 315 pb es: 5'-GGAGGTAGTCAATTGGCTGGCTCTGGAGCTG GTGCAG GCTCTGGTGTGCGCAGGTTCTGGCGCTGGTGCTGTTCTGGCACTGGTGCTTCTCCGGCAGCTGTTCCGGCAG CCGTTCCAGCAGCGGTGCCGGCAGCAGTTCTGCTGCGGTGGCGAAGGAGAAGGAGAAGGCGAGGGAGAGGGC GAAGGATACCCGTACGACGTACCGGACTACGCCGAAGGTGGTGGTGGCTCCGAGCAGAAGCTCATCTCCGAAGAA GACCTGGAGGGTGGTGGTGGCTCCACAGACTACAAGGACGACGACGACAAATCC-3'.

55 El ajuste de PCR contenía dNTP 0,2 mM (solución madre 10 mM, dNTPmix, ROCHE); 5 unidades de polimerasa PWO (solución madre de 250 unidades, ROCHE); 5 ng de ADN plasmídico de pIVEX2.3MCSRd en un volumen de 100 μ l. Se usaron los cebadores forw.MunRD 5'-GGCGGCGGAGGTAGTGAATTCGCTGGCTGGAGCTGGT-3' y RDRT 5'-GGATTTGTCGTCGTCCTTGTAGTCTGTGGAGCCACC-3' a 1 μ M cada uno.

60 El cebador directo forw.MunRD introdujo un sitio de restricción MunI para el posterior procedimiento de ligamiento por restricción del espaciador de presentación en ribosomas con el fragmento de ADN de la biblioteca.

65 El perfil de PCR fue: (30 segundos a 94°C; 60 segundos a 50°C; 40 segundos a 72°C) x 30.

El ensayo de PCR completo se sometió a electroforesis en un gel preparativo de agarosa al 1,5%. El gel se tiñó con EtBr y se aisló del gel a 220 pb. El ADN se purificó como ya se ha descrito anteriormente.

La biblioteca de hélice se ligo al espaciador de presentación en ribosomas usando un procedimiento de ligamiento por restricción. En esta etapa de síntesis se ligó el fragmento de ADN de la biblioteca con el fragmento de ADN espaciador de presentación en ribosomas para generar una construcción de presentación en ribosomas completamente funcional.

- 5 La reacción contenía 10 unidades (1 μ l) de MnlI (n° cat. R0589S, NEB), 10 unidades (1 μ l) de EcoRI (n° cat. R0101S, NEB), 5 μ l de tampón NEB4 10x, solución de ATP 1,25 mM (solución madre 25 mM, Fermentas), 2.000 unidades (2,5 μ l) de ADN ligasa T4 (NEB conc.) 1 μ g del fragmento de la biblioteca extraído y 1 μ g del espaciador de presentación, cada uno en 19 μ l de solución. Después de incubar durante una noche a temperatura ambiente, el ensayo completo se sometió a electroforesis en un gel preparativo de agarosa. El producto de reacción se aisló del gel a 633 pb y se extrajo usando el kit Qiagen Gel Extraction de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Finalmente, se concentraron 50 μ l de eluato cinco veces usando el kit Qiagen Minelute de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Inmovilización de la molécula diana en estreptavidina y avidina - placas MTP recubiertas

- 15 Un volumen de reacción (RV) de un pocillo de MTP se lavó tres veces con tampón de conjugado Universal (Roche). Se resolvieron 0,1 μ g de TNF α humano biotilado en 100 μ l de tampón de conjugado y se cargaron en el pocillo de la MTP preparada. El ligando biotilado se inmovilizó en los pocillos de placas MT recubiertas con estreptavidina-(ROCHE) o avidina (PIERCÉ). La solución de ligando se incubó durante 30 min. a temperatura ambiente en la placa MT en agitación a 500 rpm. Se recubrieron pocillos de MTP adicionales con 100 μ l de reactivo de bloqueo (BSA al 5% en tampón de conjugado) omitiendo el ligando. Estos pocillos se usaron después para una preincubación de 10 min. de las mezclas de presentación en ribosomas para eliminar los complejos ternarios de unión no específica. Todos los pocillos se lavaron con 3 RV de reactivo de bloqueo. Se incubaron 300 μ l de reactivo de bloqueo en cada pocillo durante 1 h a 4°C y 200 rpm. Antes de aplicar la mezcla de traducción detenida, los pocillos se lavaron con 3 RV de tampón WB enfriado en hielo (Tris 50 mM, pH 7,5 (4°C); acetato de magnesio 50 mM; NaCl 150 mM; KCl 33 mM; TWEEN 20 al 0,1%; BSA al 5%). Las placas se almacenaron en hielo. Durante los ciclos de selección, las placas se usaron alternativamente para eliminar las variantes de unión de fondo.

Presentación en ribosomas con la biblioteca SPA10 frente a TNF α humano

- 30 Se reunieron 100 μ l de mezcla RTS 100 *E. coli* HY (Roche) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La mezcla se abasteció con 40 unidades (1 μ l) de RNAsin plus (inhibidor de RNasa termoestable, Promega) y 10 μ l del molde de ADN de presentación en ribosomas. La transcripción y la traducción se realizaron en un tubo de reacción de 1,5 ml limpio a 30°C durante 40 min. en agitación a 550 rpm.
- 35 La reacción se detuvo inmediatamente con 500 μ l de tampón SB enfriado en hielo (Tris 50 mM, pH 7,5 (4°C); acetato de magnesio 50 mM; NaCl 150 mM; KCl 33 mM; TWEEN 20 al 0,1%; BSA al 5%; 5 μ g de ARNt (*E. coli*); GSSG 4 mM; cloranfenicol 25 μ M). La mezcla se centrifugó a > 10.000 g a 2°C durante 10 min.
- 40 El sobrenadante se transfirió a un tubo de reacción de 1,5 ml enfriado en hielo reciente. Se transfirieron 250 μ l de la mezcla a un pocillo de preincubación vacío de una MTP recubierta con estreptavidina y se incubaron a 4°C durante 10 min. a 300 rpm. La mezcla después se transfirió al pocillo de selección, en el que se inmovilizó el TNF α humano biotilado. La mezcla se incubó durante 30 min. a 4°C y 300 rpm.
- 45 Para retirar la proteína de fondo y los complejos ternarios de unión débil, los pocillos se lavaron 5 veces con 300 μ l de tampón WB enfriado en hielo (Tris 50 mM, pH 7,5 (4°C); acetato de magnesio 50 mM; NaCl 150 mM; KCl 33 mM; TWEEN 20 al 0,1%; BSA al 5%). La elución se realizó con 100 μ l de tampón EB enfriado en hielo (Tris 50 mM, pH 7,5 (4°C); EDTA 20 mM; NaCl 150 mM; KCl 33 mM; TWEEN 20 al 0,1%; BSA al 5% durante 10 min. a 4°C y 750 rpm.
- 50 Se mezclaron 100 μ l del eluato con 350 μ l de tampón RLT del kit Qiagen RNA Easy. La solución se centrifugó con vórtice brevemente. La posterior purificación de ARNm fue de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ARNm se eluyó con 50 μ l de agua libre de RNasa. El eluato se volvió a usar para una segunda etapa de elución.
- 55 Para evitar la contaminación con ADN de la etapa de traducción, el molde de ADN restante en el eluato se retiró usando el kit libre de ADN Ambion (DNA-Digestion). Los 50 μ l de eluato se suplementaron con 5,7 μ l de tampón de DNasa I y 1,3 μ l de solución que contenía DNasa I. La mezcla se incubó a 37°C durante 30 min. Se añadieron 6,5 μ l de reactivo de inactivación de DNasa I. La suspensión se incubó en el ensayo de digestión durante 3 min. a temperatura ambiente seguido de 1 min. de centrifugación a 11.000 g. El sobrenadante se usó en el ensayo de transcripción inversa. Para la transcripción inversa del ARNm, se usó la transcriptasa inversa Transcriptor (Roche). El volumen de reacción completo fue 20 μ l: 12 μ l de eluato de ARNm; cebador RTRD 5'-GGATTTGTCGTCGTCGTCCTTG-TAGTCTGTGGAGCCACCACC-3' 1 μ M; 4 μ l de tampón de reacción Transcriptor 5x, RNAsin plus 0,5 μ l (20 unidades, Promega), dNTP-mix 1 mM. La mezcla se centrifugó cuidadosamente. El tubo de reacción se puso en un termociclador pre-equilibrado a 65°C. Después de 5 min. a 65°C se añadió la transcriptasa inversa a 10 unidades (0,5 μ l). La mezcla se incubó posteriormente a 65°C durante 45 min.
- 65 El ADNc se amplificó posteriormente en una PWO-PCR convencional de 100 μ l que contenía 12 μ l de la mezcla de transcripción, 5 unidades de la ADN polimerasa PWO y los cebadores RTRD y F1. El perfil de PCR fue: (30 segundos a 94°C, 60 segundos a 65°C; 40 segundos a 72°C) x 25 ciclos.

El producto de PCR obtenido se sometió a electroforesis en un gel de agarosa al 1,5%. La banda de ADN diana respectiva se extrajo del gel teñido con bromuro de etidio usando el kit Qiagen Gel Extraction Kit Minelute. El producto de PCR se eluyó en 10 µl de tampón EB (Qiagen).

5 El producto de PCR se volvió a amplificar en una PCR de 100 µl que contenía los 10 µl de eluato, 5 unidades de ADN polimerasa PWO (inicio caliente) y los cebadores F1A y RDRT. Perfil de PCR: (30 segundos a 94°C; 60 segundos a 60°C; 40 segundos a 72°C) x 30 ciclos. El ensayo de PCR completo se sometió a electroforesis en un gel preparativo de agarosa al 1,5% y se teñió con bromuro de etidio. La banda diana se aisló usando el kit Qiagen Gel Extraction de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El producto de PCR se eluyó en 50 µl de tampón EB. Esta muestra se usó para el siguiente ciclo de presentación en ribosomas.

15 El procedimiento de presentación en ribosomas se repitió 6 veces. En una realización adicional de la selección, en el tercero, cuarto y quinto ciclos de presentación todos los aminoácidos necesarios se suplementario por separado a 2 mM cada uno para el sistema RTS100HY con la excepción de cisteína. Por tanto, las variantes que contenían cisteína se eliminaron durante la selección. En otras realizaciones del procedimiento de selección, la selección se realizó como una selección en solución y como una competición en solución usando perlas magnéticas recubiertas con estreptavidina.

20 Las perlas se prepararon del siguiente modo: se lavaron 20 µl de la solución de perlas (Invitrogen, M270 Dynabeads) cinco veces en 300 µl de tampón NaH₂PO₄, pH 8. Después de ello, las perlas se lavaron 5 veces en 300 µl de tampón WB y se almacenaron en 20 µl de tampón WB a 4°C.

25 En el cuarto ciclo de presentación, se realizó selección en solución. Se incubaron 100 ng del TNF α humano biotinilado durante 1 h a 4°C en la mezcla de traducción de presentación en ribosomas detenida. En el quinto ciclo, se practicó la competición en solución. Se incubaron 100 ng del TNF α humano biotinilado junto con 10 µg de TNF α no biotinilado en la mezcla de traducción de presentación en ribosomas detenida. En ambos ciclos, después se pipetearon 10 µl de la solución de perlas preparada a la mezcla y se incubaron durante 30 min. a 4°C para capturar el TNF α biotinilado junto con los complejos ternarios unidos a cuevas de la mezcla. Las etapas posteriores del proceso permanecieron inalteradas. El ARNm se eluyó de los complejos ternarios por incubación de las perlas en tampón EB.

30 Finalmente, la combinación de ADN obtenida de la quinta ronda de selección se subclonó en el vector pET20b(+) mediante los sitios de restricción NdeI y XhoI. Por lo tanto se amplificaron 100 ng del ADN molde lineal del primer ciclo de PCR de presentación en ribosomas de la quinta ronda de selección en una PCR de 100 µl que contenía 5 unidades de ADN polimerasa PWO y los cebadores SPAF1 5'-GTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGC
35 AGATTTTTGTGAAAACCC-3'; y WubiFlagXholrv 5'-CCATTCCACCTCGAGAC
CTTTATCATCATCATCTTTGTAATCGCCGCCACGCAGACGCAGC-3'. Usando este par de cebadores, se fusionaron las secuencias de ADN que codifican las variantes de ubiquitina de forma C-terminal con el epítopo Flag y la secuencia de hexahistidina. El perfil de PCR fue: (30 segundos a 94°C, 60 segundos a 65°C; 40 segundos a 72°C) x 30 ciclos. El producto de PCR se purificó usando el kit de purificación de PCR Qiagen de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El producto de PCR purificado se restringió en una digestión doble usando las enzimas NdeI y XhoI. La reacción de
40 digestión de 40 µl contenía 500 ng del producto de PCR en 10 µl de tampón Tris 10 mM pH 8, 12 unidades de NdeI (Promega); 12 unidades de XhoI (Promega), 4 µl de tampón D (Promega), 0,1 mg/ml de BSA. La mezcla se incubó a 37°C durante 12 h. El fragmento de ADN digerido se purificó por un gel preparativo de agarosa como el descrito anteriormente.

45 El ADN del vector pet20b(+) se digirió en una reacción de 60 µl. Se pipeteó 1 µg de ADN plasmídico en 30 µl de tampón Tris 10 mM pH 8 para 6 µl de tampón D (Promega), 0,1 mg/ml de BSA, 24 unidades de NdeI y XhoI cada una (Promega). La mezcla se incubó a 37°C durante 12 h. El fragmento de ADN digerido se purificó por un gel preparativo de agarosa como el descrito anteriormente. La reacción de ligamiento se realizó usando el kit Rapid Ligation (Roche) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La reacción de ligamiento se purificó usando el kit Qiagen Reaction Cleanup de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El producto de ligamiento purificado se introdujo por transformación en células electrocompetentes de E. coli (Novablue, Novagen).

55 Los transformantes se sembraron en una placa de agar de caldo Luria-Bertanii selectivo (Q-Tray) que contenía ampicilina a 100 µg/ml. La placa se incubó durante 12 h a 37°C. Las colonias individuales se separaron en 5 MTP que contenían 250 µl de medio de caldo Luria-Bertanii que contenía ampicilina a 60 µg/ml. Las MTP se incubaron a 37°C durante 12 h. Se inocularon 1,5 ml de medio de caldo Luria-Bertanii que contenía ampicilina a 60 µg/ml con 60 µl de los cultivos preparatorios. Los volúmenes de cultivo restantes se almacenaron a -20°C. Después de 2 h de incubación a 37°C y agitación vigorosa a 700 rpm, se indujo la producción de proteína recombinante por IPTG 0,1 mM durante 4 h a 30°C. Los bloques de pocillos profundos se centrifugaron durante 15 min. a 3600 x g a 4°C en el Heraeus Multifuge 3 L-R usando el rotor 75006445 (Heraeus). El sobrenadante se retiró y los sedimentos celulares se lisaron 30 min. a temperatura ambiente usando 300 µl de tampón NP10 (NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 300 mM, 1 mg/ml de lisozima T4, 10 ml/ml de Bugbuster (Novagen); MgCl₂ 4 mM; PMSF 0,8 mM; 20 unidades/10 ml de Benzonase (VWR)).

65 Los desechos celulares se centrifugaron de nuevo durante 15 min. a 3600 x g a 4°C en el Heraeus Multifuge 3 L-R. El sobrenadante se transfirió a una MTP limpia.

Hit-ELISA para identificar las variantes de unión de ubiquitina

Placas Nunc Medisorb ELISA se lavaron tres veces con 300 μ l de tampón PBST (PBS pH 7,4; TWEEN 20 al 0,1%). Se diluyó TNF α en tampón PBS a 1 μ g/ml. Se incubaron 50 μ l de la solución durante 1 h a temperatura ambiente en las columnas con números pares de las placas.

- 5 Se diluyó BSA a 10 μ g/ml en tampón PBS y fueron 50 μ l de PBS. Se incubaron 50 μ l de la solución durante 1 h a temperatura ambiente en las columnas con números impares. Las placas se lavaron con 300 μ l de tampón PBST. Los pocillos se cargaron con 300 μ l de tampón de bloqueo (PBS pH 7,4; BSA al 3%; Tween 20 al 0,5%) y se incubaron a temperatura ambiente durante 4 h. Las placas se lavaron tres veces con 300 μ l de tampón PBST. Se aplicaron 60 μ l de cada muestra de sobrenadante centrifugada a un pocillo recubierto con TNF α con número par y al pocillo recubierto con número impar adyacente y se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente. Las placas se lavaron tres veces con 300 μ l de tampón PBST. Se añadieron 50 μ l del conjugado Anti-Flag-POD M2 (Sigma) a los pocillos (dilución 1:2000 en PBST pH 7,4) y se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente. La placa se lavó tres veces con 300 μ l de tampón PBST. Se pipetearon 50 μ l de solución de sustrato TMB (KEM-EN-Tec) a los pocillos y se incubaron durante 15 min. La reacción se detuvo por 50 μ l de H₂SO₄ 0,2 M. Las placas ELISA se leyeron usando el lector ELISA TECAN Sunrise. Las mediciones de absorbancia fotométrica se hicieron a 450 nm usando 620 nm como referencia (Fig. 9).

Visualización de variantes de ubiquitina expresadas

- 20 Se resolvieron 10 μ l del sobrenadante de *E. coli* por electroforesis PAGE. Los geles de acrilamida se tiñeron con coomassie para analizar la parte proteica soluble de las variantes.

Los clones, que aparecieron como fracción soluble en el gel teñido con coomassie y que mostraron actividad de unión a la molécula diana en el hit-ELISA se seleccionaron para el proceso de secuenciación de ADN.

25 Producción y purificación de la variante de ubiquitina de unión a TNF α 2E11

- Para estudiar las propiedades de unión de un mutante seleccionado en detalle, se purificó la variante de ubiquitina 2E11 (Fig. 10). Se transformaron células de *E. coli* Nova Blue (Novagen) con plásmidos pET 20b+122E11. Los clones se cultivaron diluyendo un precultivo 1:100 con medio LB/100 μ g/ml de ampicilina y agitando el cultivo a 200 rpm y 37°C hasta una OD₆₀₀ de 0,5. La expresión se indujo añadiendo IPTG (concentración final 1 mM). El cultivo se continuó durante una noche a 30°C y 200 rpm. Las células bacterianas se recogieron por centrifugación a 4°C, 6.000 x g durante 20 min. El sedimento celular se suspendió en 30 ml de tampón NPI-20 que incluía DNasa y 10 mg/ml de lisozima. La variante 2E11 se purificó con CHAPS 5 mM en todos los sistemas de tampón. Las células se alteraron dos veces usando una prensa Gaulin a 55-69 bares (800-1000 PSIG). El sobrenadante que contenía las proteínas solubles se obtuvo después de centrifugación de la suspensión celular a 4°C y 40000 x g durante 30 min.

- 40 Se equilibró una columna de Ni-NTA-Agarosa (5 ml, GE Healthcare) con 5 CV de NPI-20. El sobrenadante que contenía las proteínas solubles se aplicó a la columna, seguido de lavado con 5 CV de NPI-20. La proteína unida se eluyó con un gradiente lineal hasta NPI-500 al 50% en 20 CV. Las fracciones se eluyeron a 2 ml cada una y se analizaron por SDS-PAGE con respecto a su pureza. Las fracciones que contenían la proteína diana se combinaron y se aplicaron a una columna de filtración en gel (Superdex 75, 1,6 x 60, GE Healthcare) equilibrada con PBS (pH 7,4) a un caudal de 1 ml/min (Fig. 11). La proteína purificada se usó para experimentos de unión.

45 ELISA para determinar la unión específica

- La unión específica del mutante 2E11 a TNF α humano se ensayó por un ELISA dependiente de la concentración. Se aplicaron cantidades crecientes de Affilin 2E11 purificado a placas NUNC-medisorp recubiertas con BSA como controles. El recubrimiento con antígeno con 50 μ l (1 μ g/ml) por pocillo se realizó a 4°C durante una noche. Después de lavar las placas con PBS, TWEEN 20 al 0,1% pH 7,4 (PBST) los pocillos se bloquearon usando solución de bloqueo (PBS pH 7,4; BSA al 3%; Tween 20 al 0,5%) a 37°C durante 2 h. Los pocillos se lavaron de nuevo con PBST. Después se incubaron diferentes concentraciones de 2E11 en 50 μ l en los pocillos a 37°C durante 1 h. Después de lavar los pocillos con PBST, se aplicó el conjugado anti-FLAG POD (Sigma) en una dilución de 1:2000 en PBST. La reacción de sustrato y la lectura de la señal se hicieron como se ha descrito en el capítulo de hit-ELISA. La Figura 12 muestra la unión específica de la variante 2E11 a TNF α humano con un valor de KD aparente de 400 nM.

55

LISTA DE SECUENCIAS

<110> scil Proteins GmbH et al.
 <120> Proteínas de unión artificiales basadas en una región de hélice alfa modificada de ubiquitina
 5 <130> p23577
 <150> EP 06124137.8
 <151> 15-11-2006
 <160> 13
 <170> Patentin versión 3.3
 10 <210> 1
 <211> 49
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 15 <223> Cebador SPAF1
 <400> 1
 gtttaacttt aagaaggaga tatacatatg cagatttttg tgaaaaccc 49
 <210> 2
 <211> 73
 20 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador SPAF2
 <220>
 25 <221> misc_feature
 <222> (20)..(21)
 <223> n es a, c, g, o t
 <220>
 <221> misc_feature
 30 <222> (26)..(27)
 <223> n es a, c, g, o t
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (32)..(33)
 35 <223> n es a, c, g, o t
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (35)..(36)
 <223> n es a, c, g, o t
 40 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (44)..(45)
 <223> n es a, c, g, o t
 <220>
 45 <221> misc_feature
 <222> (53)..(54)
 <223> n es a, c, g, o t
 <400> 2
 50 cactctggaa gtggagcccn nkgacnkat cnknknkgtg aagnkaaga tcnkgacaa 60
 ggagggcatc ccg 73
 <210> 3
 <211> 64
 <212> ADN
 <213> Artificial
 55 <220>
 <223> Cebador SPAF3
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (26)..(27)
 60 <223> n es a, c, g, o t
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (29)..(30)
 <223> n es a, c, g, o t
 65 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (32)..(33)
 <223> n es a, c, g, o t
 <400> 3

ctgggagggt aaacagctcg aagacnkn knkctgagc gattacaaca tccagaaga 60
aagc 64
 <210> 4
 <211> 52
 <212> ADN
 5 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador SPAR1
 <400> 4
 10 cgcagacgca gcaccagatg cagggtgctt tcttctgga tgttgaatc gc 52
 <210> 5
 <211> 55
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 15 <223> Cebador SPAR2
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (39)..(40)
 <223> n es a, c, g, o t
 20 <400> 5
 cgagctgtt acccgcccag atcagacgct gctgatcmnn cgggatgccc tcctt 55
 <210> 6
 <211> 54
 <212> ADN
 25 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador SPAR3
 <400> 6
 30 gggctccact tccagagtga tggcttggc ggtcagggtt ttcacaaaaa tctg 54
 <210> 7
 <211> 65
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 35 <223> Cebador F1
 <400> 7
ggagaccaca acggtttccc tctagaaata attttgttta actttaagaa ggagatatac 60
atatg 65
 <210> 8
 <211> 43
 40 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador R3MunEco
 <400> 8
 45 gaattcacta cctccgccgc cagcagacg cagcaccaga tgc 43
 <210> 9
 <211> 48
 <212> ADN
 50 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador F1A
 <400> 9
 catacgaat taatcagact cactataggg agaccacaac ggtttccc 48
 <210> 10
 <211> 315
 <212> ADN
 55 <213> Artificial
 <220>
 <223> Espaciador de presentación en ribosomas
 60 <400> 10

ggaggtagtc aattggctgg ctctggagct ggtgcaggct ctggtgctgg cgcaggttct 60
ggcgtggtg ctggttctgg cactggtgct tctccggcag ctggtccggc agcggttcca 120
gcagcgggtgc cggcagcagt tcctgctgcy gtgggcgaag gagaaggaga aggcgagggg 180
gagggcgaag gataccgta cgacgtaccg gactacgccg aagggtggtg tggctccgag 240
cagaagctca tctccgaaga agacctggag ggtggtggtg gctccacaga ctacaaggac 300
gacgacgaca aatcc 315

5 <210> 11
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador forw.MunRD
 <400> 11
 10 ggcggcggag gtagtgaatt cgctggctct ggagctggt39
 <210> 12
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 15 <223> Cebador RDRT
 <400> 12
 ggattgtcg tcgtcgtcct tgtagtctgt ggagccacca cc 42
 <210> 13
 <211> 61
 20 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador wubiFlagxholrv
 <400> 13

ccattccacc tcgagacctt tatcatcatc atctttgtaa tcgccgccac gcagacgcag 60
c 61

25 **1**

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para la generación de una proteína seleccionada entre el grupo compuesto por proteínas de la superfamilia de proteínas de "proteínas tipo ubiquitina", así como fragmentos o proteínas de fusión de las mismas, cada una de las cuales tienen el motivo de plegamiento tipo ubiquitina, donde la proteína debido a una o más modificaciones de aminoácidos en la región de hélice alfa muestra una afinidad de unión mejorada con respecto a un agente cuya afinidad de unión no existía o no existía a ese grado en la proteína no modificada, donde la región de hélice alfa consta de los restos correspondientes a los restos 16 a 55 de la ubiquitina humana/de mamífero, con las siguientes etapas:
- 10 a) seleccionar una proteína no modificada de la superfamilia de "proteínas tipo ubiquitina";
 b) proporcionar un agente para el que la proteína no modificada tiene baja o ninguna afinidad de unión;
 c) seleccionar aminoácidos en una región expuesta en superficie de la proteína incluyendo la región de hélice alfa;
- 15 d) modificar los aminoácidos seleccionados preferiblemente por sustitución, inserción, delección y/o modificación química, donde están modificados al menos cuatro aminoácidos expuestos en superficie en la región de hélice alfa;
 e) poner en contacto la proteína modificada con el agente proporcionado en la etapa b);
 f) detectar y aislar la proteína que tiene una afinidad de unión nueva o potenciada con respecto al agente proporcionado en la etapa b), y opcionalmente las siguientes etapas:
- 20 g) producir la proteína modificada en un sistema de expresión procarionta, eucariota o *in vitro* adecuado, o por síntesis química;
 h) aislar las proteínas después de la producción por un método de purificación adecuado; y de forma adicionalmente opcional
 i) realizar una maduración de la proteína modificada repitiendo las etapas d - h),
 donde la afinidad de unión, expresada en KD, de la proteína modificada por el agente es de 10^{-5} M a 10^{-12} M, de forma adicionalmente preferible de 10^{-6} a 10^{-12} M o de 10^{-9} a 10^{-12} M.
- 25 2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la etapa d) se realiza por síntesis química de la proteína modificada, o en el que la modificación de la etapa d) se realiza mediante ingeniería genética para alterar un ADN que pertenece a la proteína modificada correspondiente.
- 30 3. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que en la etapa d) se establece una genoteca, o en el que en la etapa d) por mutagénesis aleatoria se realiza una sustitución aleatoria de los aminoácidos seleccionados.
- 35 4. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que en la etapa e) el contacto con el agente se realiza mediante un método de selección adecuado, preferiblemente el método de presentación en fagos, presentación en ribosomas, presentación de ARNm, presentación CIS o presentación en superficie celular, presentación en superficie de levaduras, presentación en superficie de bacterias, de forma particularmente preferible mediante el método de presentación en fagos.
- 40 5. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que en la etapa f) la detección de las proteínas que tienen afinidad de unión por el agente se realiza por uno o más de los siguientes métodos: ELISA, espectroscopía por resonancia de plasmón superficial, espectroscopía de fluorescencia, FACS, calorimetría por valoración isotérmica o ultracentrifugación analítica.
- 45 6. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la proteína se madura por métodos conocidos per se con respecto a su afinidad de unión, su especificidad de unión, estabilidad, solubilidad, o rendimiento, comprendiendo dichos métodos mutagénesis aleatoria, re-aleatorización dirigida al sitio de posiciones dentro del casete de unión preseleccionado, por sustituciones dirigidas de un único aminoácido o por modificaciones químicas.
- 50 7. El método de acuerdo con una o más de las reivindicaciones precedentes, en el que la proteína se une covalentemente de un modo específico de sitio o aleatorio a al menos una proteína de la misma o diferente especificidad por lo cual se obtiene una proteína bivalente, multivalente o biespecífica.
- 55 8. El método de acuerdo con una o más de las reivindicaciones 1-7, en el que la proteína seleccionada por la modificación tiene al menos un 30% de identidad de secuencia de aminoácidos con la ubiquitina humana y un motivo de plegamiento tipo ubiquitina y/o pertenece a la familia de proteínas de "proteínas relacionadas con ubiquitina", y/o en el que la proteína seleccionada para la modificación tiene un motivo de plegamiento tipo ubiquitina y se selecciona preferiblemente entre el grupo compuesto por SUMO-1, FAU, NEDD-8, UBL-1, Rub1, APG8, ISG15, URM1, HUB1, GDX, elongina B, PLIC2 (dominio N-terminal), parking humana (dominio N-terminal), y/o en el que la proteína es ubiquitina humana u otra ubiquitina de mamífero.
- 60 9. El método de acuerdo con una o más de las reivindicaciones precedentes, en el que se modifican los aminoácidos de la hélice alfa y opcionalmente también se modifican aminoácidos en las posiciones cadena arriba de la hélice o posiciones cadena abajo de la hélice que descansan fuera de la hélice alfa.
- 65 10. El método de acuerdo con una o más de las reivindicaciones precedentes, en el que se modifican los aminoácidos de la ubiquitina de mamífero 22-32 de la hélice alfa y opcionalmente también se modifican aminoácidos en la región 16-21 (posiciones cadena arriba de la hélice) o 38-55 (posiciones cadena abajo de la hélice) que descansan fuera de la hélice alfa, y/o en el que la modificación es una sustitución, inserción, delección, modificación química o combinaciones de los mismos, preferiblemente una sustitución, al menos parcialmente en aminoácidos directamente adyacentes o no directamente adyacentes en la secuencia primaria donde preferiblemente los aminoácidos modificados no adyacentes
- 70

entre sí en la secuencia primaria forman en la estructura secundaria una región de unión preferiblemente contigua para el agente, y/o donde la cantidad de modificaciones, preferiblemente sustituciones, de aminoácidos directamente adyacentes entre sí en la secuencia primaria es de 2 a 8 aminoácidos directamente adyacentes, adicionalmente preferible de 3 a 7 o de 4 a 6 o de 2 a 4 aminoácidos directamente adyacentes.

5 11. El método de acuerdo con una o más de las reivindicaciones precedentes, en el que una parte de los aminoácidos modificados directamente adyacentes entre sí en la secuencia primaria está en la región inicial o final de la región de hélice alfa, donde esta parte tiene una longitud de dos o más aminoácidos, preferiblemente dos o tres aminoácidos, y/o
10 donde en la proteína se modifican, preferiblemente se sustituyen, 5 o más aminoácidos directamente adyacentes entre sí en la secuencia primaria, de los cuales uno, dos o más, preferiblemente dos o tres, de los aminoácidos directamente adyacentes forman el principio o el final de una región de cadena de hélice alfa.

12. El método de acuerdo con una o más de las reivindicaciones precedentes, en el que la proteína no modificada es
15 ubiquitina humana, y en el que se modifican, preferiblemente se sustituyen, al menos 8 aminoácidos expuestos en superficie de la ubiquitina, de modo que estos aminoácidos modificados comprendan la región con afinidad de unión por el agente, y/o en el que la proteína modificada es ubiquitina humana sustituida, deletionada, insertada y/o modificada químicamente, preferiblemente sustituida, al menos con 4 o más de las posiciones 16, 18, 20, 21, 22, 24, 25, 28, 29, 31,
32, 33, 38, 39, 52, 53, 54, y/o 55.

20 13. El método de acuerdo con una o más de las reivindicaciones precedentes, en el que el agente es un antígeno o un hapteno.

14. El método de acuerdo con una o más de las reivindicaciones precedentes, en el que la proteína se une
25 covalentemente de un modo específico de sitio o aleatorio a al menos una proteína de la misma o diferente especificidad y por tanto muestra propiedades de unión bivalentes o multivalentes o biespecíficas, respectivamente.

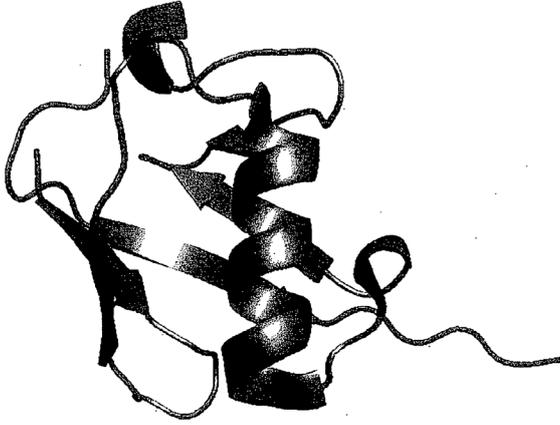


Fig.1

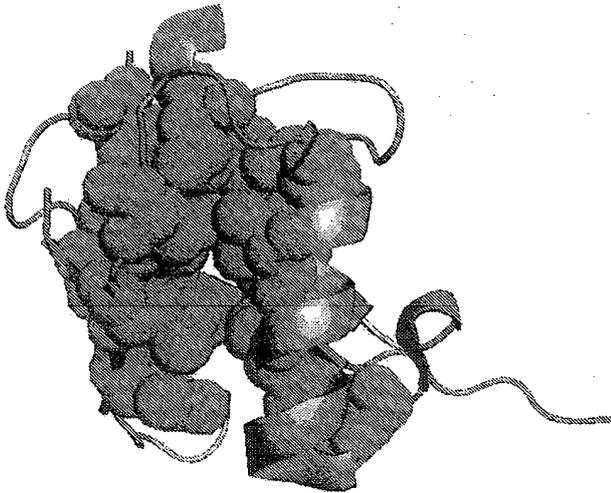


Fig.2

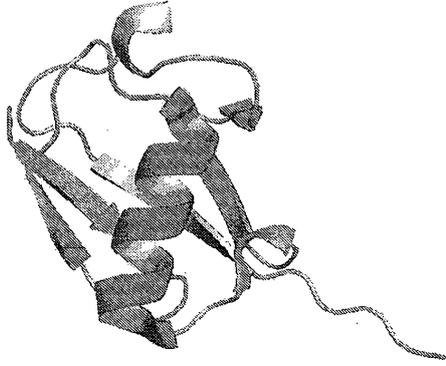


Fig.3

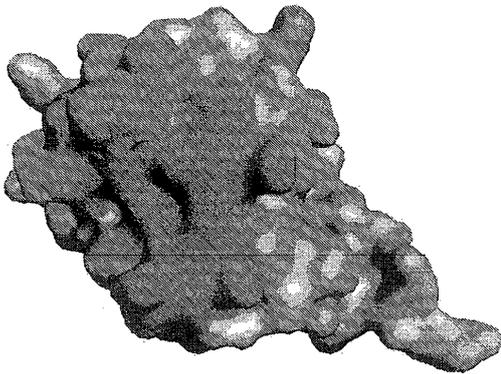


Fig.4

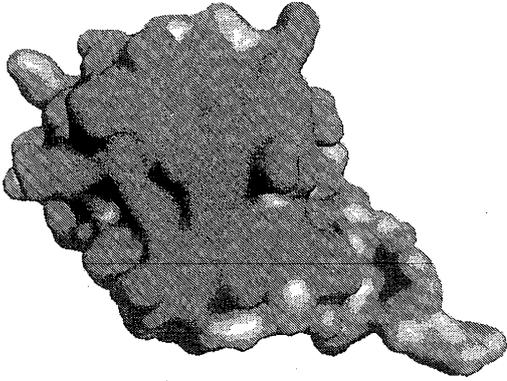


Fig.5

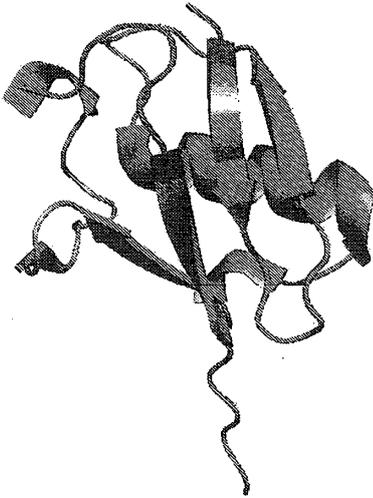


Fig.6

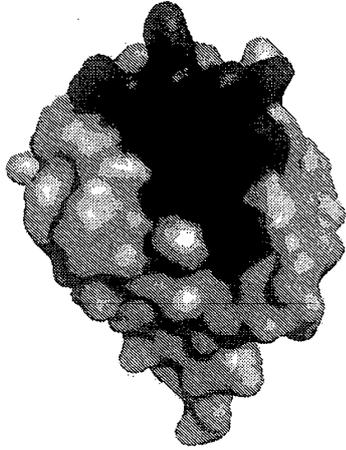


Fig. 7

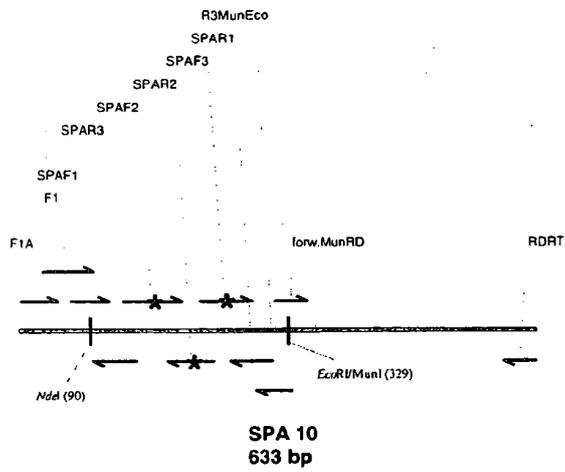


Fig. 8

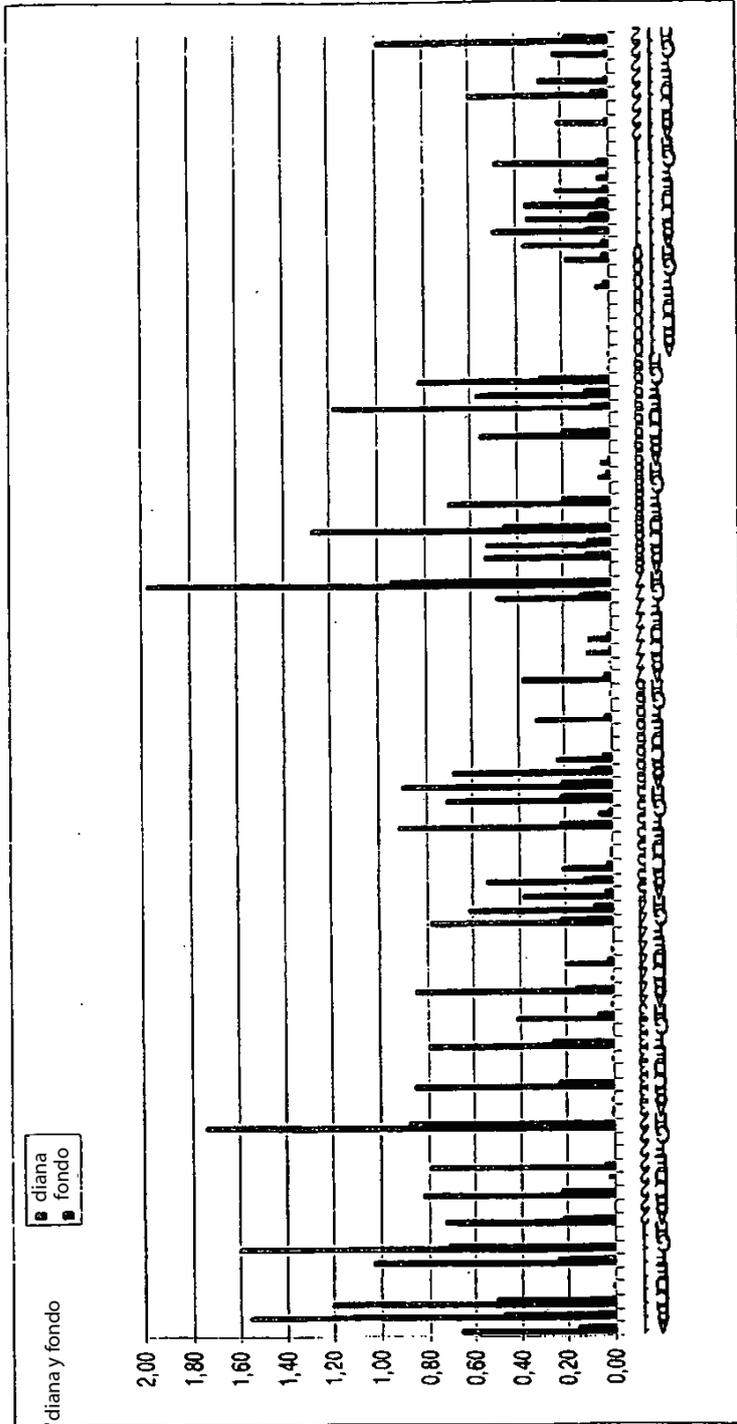


Fig. 9

MQIFVKTLTGKTITLEVEPNDLIAPVKWKID~~EG~~IPADQQLIWAGKQLEDWAGLSD
YNIQESTLHLVLRRLRGGDYKDDDDKLEHHHHHH

Fig.10.

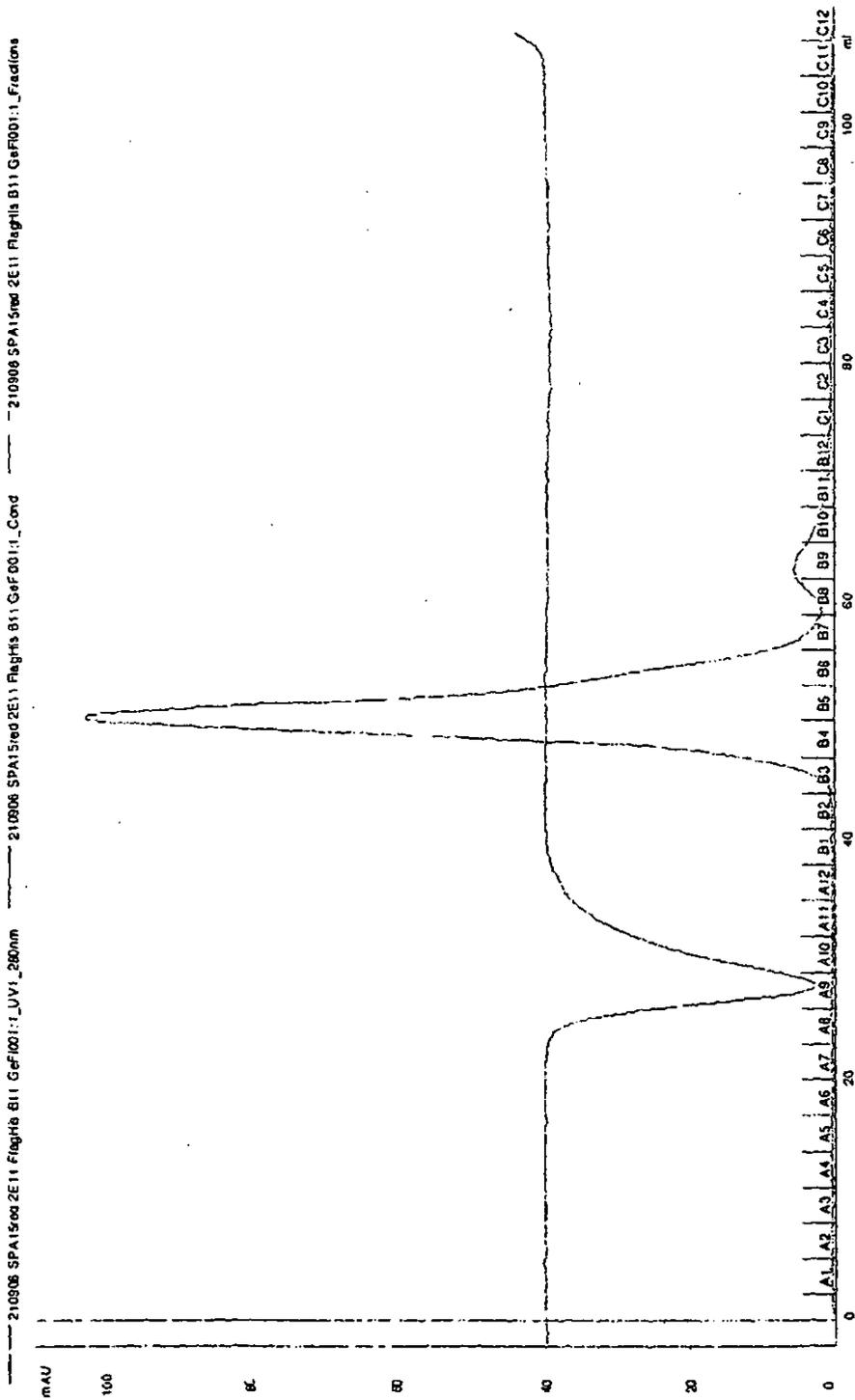


Fig. 11

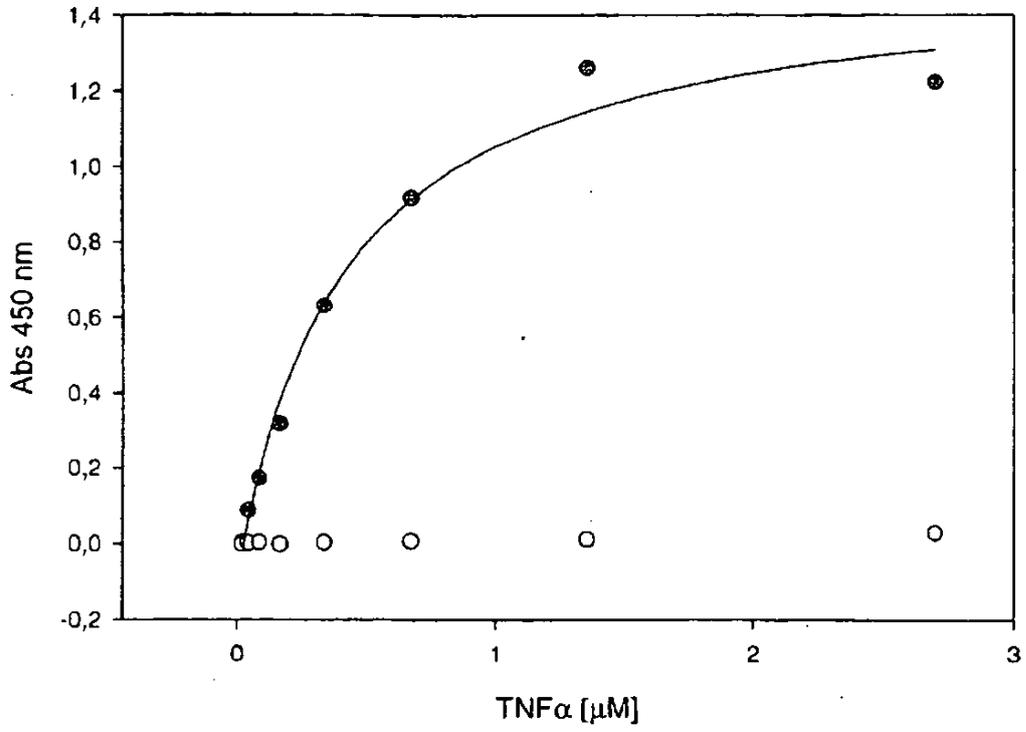


Fig.12: