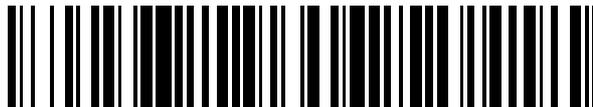


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 371 464**

51 Int. Cl.:
C12N 15/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **00929588 .2**
96 Fecha de presentación: **26.05.2000**
97 Número de publicación de la solicitud: **1181358**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **27.02.2002**

54 Título: **MÉTODOS Y MATERIALES PARA GENERAR DOMINIOS SH3 CON PROPIEDADES DE UNIÓN SELECCIONADAS.**

30 Prioridad:
26.05.1999 US 136085 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
03.01.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
03.01.2012

73 Titular/es:
**NEXT BIOMED TECHNOLOGIES NBT OY
TUKHOLMANKATU 8
00290 HELSINKI, FI**

72 Inventor/es:
**SAKSELA, Kalle y
HIIPAKKA, Marita**

74 Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

ES 2 371 464 T3

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

DESCRIPCIÓN

Métodos y materiales para generar dominios SH3 con propiedades de unión seleccionadas.

Campo de la invención

5 Una serie de procesos biológicos que son importantes para estados normales y patológicos se rigen por interacciones de proteínas celulares mediadas por los dominios de la región de homología Src 3 (SH3). Esta revelación corresponde a métodos y materiales para generar dominios SH3 con propiedades de unión diseñadas, y su utilización como herramientas en investigación, terapia, diagnóstico y descubrimiento de fármacos.

Antecedentes de la invención

10 Virtualmente todos los aspectos del comportamiento celular, tales como la adaptación de una célula en respuesta a estímulos extracelulares cambiando su patrón de expresión génica, están regulados y ejecutados por proximidad dinámica y ordenada de proteínas celulares. Durante su evolución, han surgido varios tipos diferentes de dominios de proteínas especializadas en mediar tales eventos de interacción proteína-proteína regulados y específicos. Los dominios de proteínas de un tipo forman habitualmente grandes familias de miembros homólogos pero suficientemente divergentes, de tal forma que cada uno de ellos tiene especificidades únicas, aunque a menudo de solapamiento, para la unión del ligando.

15 El dominio SH3 fue identificado por primera vez como una región de homología entre las tirosina quinasas de la familia Src codificado por medio de retrovirus oncogénicos y sus proto-oncogenes celulares equivalentes. A partir de aquí, los dominios SH3 han sido reconocidos en un gran número (>50) de proteínas que cumplen funciones importantes en la regulación del crecimiento celular, diferenciación celular, y otros procesos. Debido a estas funciones los dominios SH3 están muy implicados en la patogénesis de diversas enfermedades, en particular del cáncer. Además, varios patógenos microbianos, tales como el VIH, explotan los procesos mediados por el SH3 como parte de su ciclo de vida. La capacidad de influenciar la formación de un complejo proteico mediado por los dominios SH3 tendría, por lo tanto, un potencial terapéutico significativo.

20 Los dominios SH3 son dominios modulares de proteínas globulares que habitualmente consisten en 50 -70 aminoácidos que se encuentran en diferentes proteínas, particularmente en proteínas implicadas en la transducción de señal celular (Cohen et al. 1995. Cell, 80, 237- 248; Dalgarno et al. 1997. Biopolymers, 43, 383 -400). Los dominios SH3 actúan como mediadores en las interacciones intermoleculares e intramoleculares uniéndose a ligandos que contienen una región con una estructura secundaria conocida como la hélice de poliprolina II (PPII). Estos ligandos pueden unirse a los dominios SH3 en dos orientaciones opuestas, y habitualmente muestran las secuencias consenso del "motivo PxxP" RXØPXXP y PXØPXR (Ø es un aminoácido hidrofóbico, X es cualquier aminoácido) (Feng et al. 1994. Science, 266, 1241-7; Lim et al. 1994. Nature, 372, 375-9). El posicionamiento del residuo básico conservado (usualmente una arginina; R) en el motivo PxxP determina en qué orientación el ligando se une a su dominio SH3 afín. Además, existen ligandos SH3 con hélices PPII que no se ajustan a tales normas de consenso. Un ejemplo a destacar es la región PPII en la Src, que está implicada en la autoinhibición catalítica al unirse al dominio SH3 de la propia Src, pero contiene sólo una de las dos prolina que comúnmente definen un motivo PxxP (Xu et al. 1997. Nature, 385, 595-602).

25 La variación de la secuencia en la región de la hélice PPII, que implica la (secuencia) consenso además de las posiciones adyacentes no consenso, ha mostrado ejercer influencia en la especificidad en la formación del complejo ligando/SH3. Se han proporcionado ejemplos de preferencia por dianas con motivos consenso PxxP atípicos por medio de estudios que están dirigidos a la selección de ligandos de Abl SH3 (Feng et al. 1994. Science, 266, 1241-7; Weng et al. 1995. Moll Cell Biol, 15, 5627-34; Yu et al. 1994. Cell, 76, 933-945), y el complejo péptido CrkN-SH3/C3G (Knudsen et al. 1995. EMBO J, 14, 2191-8; Wu et al. 1995. Structure, 3, 215-226). El efecto de la variación de secuencia que implica los residuos no consenso en la región PPII de los ligandos de SH3 ha sido demostrada de forma óptima mediante experimentos en los que secuencias diana distintivas se han seleccionado para diferentes dominios SH3 de bibliotecas de péptidos aleatorios químicamente sintetizados o expresados en fagos (péptidos de expresión en fagos) (Sparks et al. 1994. J Biol Chem, 269, 23853-6; Viguera et al. Biochemistry, 33, 10925-33; Yu et al. 1994. Cell, 76, 933-45). Sin embargo, a pesar de la evidencia de la especificidad, anteriormente analizada, la afinidad máxima de la unión a SH3 de péptidos ligandos PPII cortos es baja, y las diferencias relativas en su unión a los diferentes dominios SH3 son modestas.

30 Por el contrario, existe una creciente evidencia de que los contactos moleculares en el exterior de la interfaz de la hélice PPII puede proporcionar una especificidad y fuerza significativa a la unión a SH3. La utilización de las bibliotecas de expresión en fagos de péptidos más largos que contienen un motivo PxxP insertado dentro de secuencias aleatorias, ha demostrado que los residuos que los flanquean pueden aumentar la selectividad de tales ligandos, lo que puede poner de manifiesto de 20 a 30 diferencias de plegamiento en su afinidad hacia diferentes dominios SH3 (Rickle et al. 1994. EMBO J, 13, 5598-604; Rickles et al. 1995. Proc Natl Acad Sci USA, 92, 10909-

13; Sparks et al. 1996. Proc Natl Acad Sci USA, 93, 1540-4). El análisis estructural de las interacciones del Src-SH3 con dos dodecapéptidos tales reveló que la relativa alta especificidad y afinidad (valores K_D 0.54 μ M y 1.2 μ M) de estas interacciones implicaban contactos entre los residuos que flanquean los péptidos y dos estructuras similares a un lazo en el dominio Src-Sh3, las cuales representan regiones de alta diversidad de secuencia entre los diferentes dominios SH3 y son conocidas como lazos n-src- y RT (Feng et al. 1995. Proc Natl Acad Sci USA, 92, 12408-15). De forma similar, la unión específica de un ligando de Abl SH3 rico en prolina de diseño racional (K_D 0.4 μ M para Abl vs. 273 μ M para Fyn-SH3) podría ser explicada por los correspondientes contactos moleculares con Abl SH3 (Pisabarro y Serrano. 1996. Biochemistry, 35, 10634-40; Pisabarro et al. 1998. J Mol Biol, 281, 513-521).

Otra interacción que ha resultado reveladora en elucidar la base de la especificidad de la unión a SH3, que también enfatiza el papel del lazo RT, es el complejo entre la Nef VIH-1 y el dominio SH3 de la tirosina quinasa Hck. La proteína Nef es una proteína miristoilada de 27-34 KDa de los lentivirus de primates (VIH-1, -2, y SIVs), e importante para el desarrollo de alta viremia e inmunodeficiencia en el huésped infectado (Harris. 1996. J Gen Virol, 77, 2379-92; Saksela. 1997. Front Biosci, 2, 606-618). De manera interesante, la proteína Nef posee características de unión a SH3 notablemente selectivas. Puede unirse estrechamente al Hck-SH3, mostrando valores de afinidad de aproximadamente K_D 0.2 μ M según se ha medido por resonancia de plasmón superficial (SPR, por sus siglas en inglés) (Lee et al. 1995. EMBO J, 14, 5006-15).

Por consiguiente, Lee *et al.* Muestran el importante papel que desempeña la región variable del lazo RT del dominio SH3 de la proteína Hck en relación a la proteína Nef VIH. Por otro lado, Arold et al. (Biochemistry, vol. 37, 1998, 14683- 14691) también analiza el papel que desempeña dicha región, pero indican que en vista de las propiedades de unión la flexibilidad aumentada del lazo RT de la Hck es aún más importante que la variación de aminoácidos en dicha región.

En contraste con la fuerte unión a la Hck, la proteína Nef posee una afinidad casi 100 veces menor hacia el dominio SH3, sumamente homólogo, de Fyn. Estudios bioquímicos y estructurales han revelado que la base de esta selectividad reside en la eficiente estrategia de la proteína Nef para el reconocimiento de los residuos SH3 no conservados característicos de Hck, en particular la cadena lateral de una isoleucina localizada en el lazo RT del Hck-SH3 (Lee et al. 1996. Cell, 85, 931-942). La región que aloja el lazo RT del Hck-SH3 está compuesta de múltiples partes no contiguas del polipéptido de la proteína Nef, y está localizado distalmente de la región PPII en la estructura tridimensional de la proteína Nef.

Los intentos previos para generar moléculas que podrían competir con las interacciones de SH3 que ocurren de forma natural, se han centrado en el diseño o la selección a partir de bibliotecas aleatorias de péptidos y de moléculas similares a los péptidos que podrían competir con los ligandos PPII para su unión a sus dominios SH3 afines. Se ha informado sobre el éxito en este tipo de aproximación por parte de una serie de grupos (ver referencias anteriores). Se han registrado varias solicitudes de patentes para las diferentes modificaciones de esta aproximación (tales como la patente WO 95/24419 y Wo 96/03649). Sin embargo, la relativa similitud de la interfaz SH3/PPII de diferentes parejas de SH3/ligando supone un problema para el desarrollo de moléculas inhibitoras sumamente específicas. Para superar este problema hemos elegido un enfoque diferente, que está basado en el claro papel del lazo RT del dominio SH3 en la selección de ligandos que ha sido señalado por una serie de estudios, en particular nuestro trabajo previo sobre el complejo entre la proteína Nef del VIH y el dominio SH3 de la tirosina quinasa Hck celular.

Las observaciones anteriores sugieren un modelo general donde las regiones en los ligandos de SH3 en el exterior de la región de la hélice PPII proporcionan especificidad y afinidad para la unión por contacto de las regiones que son divergentes entre los dominios SH3, en particular los residuos en el lazo RT. Impulsados por este concepto, en la presente invención hemos construido una gran biblioteca (>130 millones) de dominios SH3 artificiales derivados de Hck, en los que seis residuos no conservados, específicos de Hck en el lazo RT han sido reemplazados por hexapéptidos aleatorios (denominados con RRT-SH3 para lazos RT aleatorizados), y éstos han sido expresados en la superficie de los bacteriófagos M13 a fin de identificar nuevos dominios SH3 con características de unión diseñadas. Mostramos que la expresión en fagos (phage-display) resulta muy adecuada para la presentación y selección de dominios SH3 modificados, y proporcionamos un soporte experimental sólido para el papel del lazo RT del SH3 como una especificidad y afinidad versátil determinante.

Por consiguiente, como se explica en la presente patente a continuación, hemos descubierto que manipulando aleatoriamente la secuencia de aminoácidos que comprenden la región variable del lazo RT (en este caso, seis aminoácidos del dominio SH3 de Hck) es posible crear dominios SH3 artificiales que se unan con alta afinidad no natural y con especificidades de unión predeterminadas a diferentes proteínas ligandos.

Resumen de la invención

La interacción bien caracterizada entre Nef VIH-1 y el dominio SH3 de Hck es una de las interacciones mediadas por el SH3 más estrechamente conocida. Hemos mostrado previamente que una capacidad similar para unirse a Nef puede ser transferida a Fyn-SH3 diseñando sustituciones de aminoácidos similares a Hck en su lazo RT. La

presente invención se enmarca en la constatación de que, en lugar de imitar la estructura de un dominio SH3 afín conocido que ocurra de forma natural, se pueden generar dominios SH3 con propiedades de unión a ligandos deseadas mediante la utilización de la manipulación aleatoria de la secuencia del lazo RT combinada con una potente afinidad o selección funcional. De manera notable, el método descrito en la presente invención puede utilizarse para identificar dominios SH3 con alta afinidad no natural específica para proteínas que se cree que son ligandos de SH3, pero que carecen de una pareja celular identificada que contenga un dominio SH3.

Por consiguiente, la presente invención proporciona un método para generar dominios SH3 con propiedades de unión seleccionadas.

Breve descripción de las figuras

Figura 1. Muestra un dibujo simplificado que muestra la estrategia de la presente invención para crear dominios SH3 con propiedades de unión modificadas. Las interacciones de los dominios SH3, tales como Hck-SH3, con sus proteínas ligandos afines implican una serie de contactos moleculares entre el dominio SH3 y una región del motivo repetida de una prolina (PxxP) en la proteína ligando. Aunque necesarias para la unión, estas interacciones dirigidas por PxxP son débiles y relativamente similares en la mayoría de los complejos SH3/ligandos, y por lo tanto proporcionan poca selectividad y fuerza para estas interacciones.

Figura 2A y 2B. Muestra datos de dos experimentos representativos que miden la unión de cuatro dominios RRT-SH3 para Nef inmovilizada basados en su habilidad para competir con Hck-SH3 marcado (Fig. 2A) o RTT-A1 (Fig. 2B). Las condiciones del ensayo fueron esencialmente las mismas en ambos casos (ver Métodos en el ejemplo 1), excepto por el hecho de que Hck-SH3 (66 nM, 2A) se utilizó como sonda diez veces más que RTT.A1 (7 nM, 2B). El grado de inhibición de la unión de la sonda a Nef causado por los competidores añadidos se muestra en el eje-y, y el nivel 50% se encuentra indicado por la línea discontinua horizontal. La concentración del competidor en ración a la sonda (en un rango que va desde 1:128 a 4:1 para Hck-SH3, y 1:8 a 256:1 para RRT.A1) se muestra en el eje-x, y el punto donde la sonda y el competidor se encontraron presentes en cantidades equimolares está indicado por la línea discontinua vertical. Tal como se esperaba, en ambos casos en que el mismo dominio SH3 fue utilizado como sonda y como competidor, las curvas de inhibición pasaron muy próximas al punto donde las líneas discontinuas se cruzaban. Todos los dominios RRT-SH3 fueron analizados al menos tres veces, y el resumen de estos datos se muestra en la Tabla I.

Figura 3. Muestra la unión de los dominios seleccionados RRT-SH3 a una variante Nef portadora de una mutación F90R. La NefR90 se utilizó como ligando para el RRT.A1 (66 nM) biotinilado, en presencia de dominios SH3 no marcados en concentraciones relativas en un rango de 1:256 – 16:1. Un resumen de datos similares sobre todos los dominios RRT-SH3 analizados se presenta en la Tabla I.

Descripción detallada de la invención

En la versión prototipo de la invención que se presenta en la presente memoria, hemos utilizado mutagénesis dirigida por reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) para producir una gran colección de dominios SH3 (denominados RRT-SH3) que comparten su estructura global con Hck-SH3, pero que contienen una combinación aleatoria de aminoácidos en lugar de los seis residuos de los lazos RT que constituyen una región variable entre los dominios SH3 de otra manera homólogos. Se generaron \approx 130 millones de dominios RRT-SH3 expresados con fagómidos recombinantes individuales, lo cual excede la cantidad teórica de todas las combinaciones posibles realizadas de los residuos péptidos de los 20 diferentes aminoácidos ($20^6 = 64$ millones). Descubrimos que un método conocido como la expresión en fagos (phage-display) resulta muy adecuado para la expresión de los dominios SH3 funcionales sobre la superficie de las partículas de los bacteriófagos, y utilizamos este método como una herramienta de selección para la identificación de los dominios RRT-SH3 poco frecuentes con propiedades de unión deseadas de entre los millones de moléculas que no se unen. Aunque por el momento la expresión en fagos aparece como el método preferido para este tipo de selección funcional de los dominios RRT-SH3, la presente invención no se encuentra restringida a esta aproximación, y también podrían utilizarse para esta tarea una serie de métodos diferentes.

Como prueba de principio para la utilidad de esta aproximación, mostramos que es posible identificar los RRT-SH3 que se unieron a Nef VIH-1 con una afinidad hasta 40 veces más alta que el dominio Hck-SH3 que ya se encuentra fuertemente unido (K_D 250 nM) que sirvió como cadena principal de las moléculas de RRT-SH3 artificiales. Dicha afinidad superior proporcionó a estas moléculas una habilidad para competir de manera eficiente con la interacción Hck/Nef, incluso cuando se encuentra presente en bajas concentraciones, señalando por tanto las aplicaciones terapéuticas obvias. De manera notable, se ha mostrado que es posible identificar moléculas RRT-SH3 de esta biblioteca derivada de Hck que se unen con una muy alta afinidad a la proteína ligando SH3 que no posee una afinidad significativa por la Hck-SH3 natural no modificada. Como un ejemplo de una proteína tal se utilizó una versión mutante de la proteína Nef (NefR90) cuya habilidad para unirse a Hck-SH3 fue alterada por una mutación que específicamente evita el alojamiento del lazo RT de Hck-SH3 nativo. Estos estudios de prueba de principio se

encuentran descritos a continuación en el Ejemplo 1 junto con los detalles de la metodología de esta aplicación prototípica de la invención.

La presente invención proporciona un método en general útil para la selección de proteínas ligandos de SH3 con dominios SH3 artificiales. Aunque nuestros resultados indican que pueden generarse especificidades de unión muy diferentes por manipulación del lazo RT de SH3 de una única estructura central del dominio (Hck) SH3, otros dominios SH3 pueden ser modificados de manera similar por medio de la metodología descrita, si fuera necesario para crear moléculas de alta afinidad para todas las proteínas ligandos de SH3. Además, el diseño de las propiedades de unión por manipulación de la región del lazo RT podría combinarse con otras modificaciones específicas o aleatorias del dominio SH3 para optimizar más aún sus propiedades de unión u otras propiedades físico-químicas, tales como la resistencia a la proteasa o la solubilidad.

En lugar de seleccionar proteínas diana de SH3 individuales y conocidas *in vitro*, las bibliotecas RRT-SH3 pueden también ser utilizadas para seleccionar proteínas aún desconocidas que cumplen un papel importante en eventos celulares de interés, tales como la proliferación celular y la muerte celular programada. Bajo este enfoque, se introduce una biblioteca RRT-SH3 en células cultivadas utilizando vectores tales como retrovirus recombinantes, y una célula con un fenotipo de interés se selecciona de entre una gran población de células que expresan diferentes dominios RRT-SH3, tal y como se realiza de forma rutinaria en una estrategia tan bien conocida como la "clonación funcional", donde se han introducido en células genotecas de ADNc derivado de células en lugar de constructos del dominio RRT-SH3. El dominio RRT-SH3 responsable del fenotipo celular modificado puede entonces aislarse, y utilizarse para aplicaciones similares a las de los dominios RRT-SH3 descubiertos por selección de afinidad *in vitro*, además de emplearse para la identificación de su proteína diana específica, la cual podría ser una proteína diana de SH3 desconocida previamente, o bien una proteína ya reconocida de la que no se tenga conocimiento de haber estado implicada en funciones relacionadas con el fenotipo de interés modificado para el que fue seleccionada.

Se pueden prever varias aplicaciones valiosas para dominios SH3 realizados a medida descritos en la presente invención. Podrían ser introducidos en y expresados con células a fin de activar, inhibir o de otro modo regular o modificar las funciones de las proteínas ligandos SH3 y sus complejos con otras proteínas. Si los dominios RRT-SH3 estuvieran equipados con una proteína con una diana de señalización apropiada, de esta manera se podría también ejercer influencia en la localización subcelular de su proteína diana. Más aún, podría diseñarse un método de diagnóstico para la detección de organismos infecciosos, detectando la unión de los dominios RRT-SH3 a sus dianas, tales como proteínas virales, bien en células o en sistemas libres de células.

Mientras los usos más claros de tales aproximaciones se encuentran en investigaciones básicas sobre los procesos celulares mediados por SH3, resultan también obvias aplicaciones similares en terapia génica. El pequeño tamaño relativo de un dominio SH3 también hace posible que las proteínas de diseño RRT-SH3 pudieran ser suministradas a células diana mediante su fusión con péptidos que penetran la membrana u otros métodos similares. Además de ser utilizados como agentes terapéuticos en sí mismos, el análisis estructural de los complejos ligando/RRT-SH3 podrían también ayudar en el diseño de compuestos no péptidos dirigidos en contra de las interfaces de unión SH3 de proteínas celulares asociadas a varias enfermedades. Sería, por tanto, posible diseñar candidatos a fármacos que imiten estructuralmente los dominios RRT-SH3 y que compartan propiedades de unión similares. Finalmente, la habilidad de RRT-SH3 de interactuar estrechamente con la superficie de unión SH3 de las proteínas ligandos, y de ese modo competir con cualquier compuesto que se una a la misma región, podría también resultar útil en la identificación de moléculas derivadas de cribas de descubrimiento de fármacos no racional que están dirigidas en contra de estas regiones importantes funcionalmente. Sería, por tanto, posible guiar el desarrollo de un fármaco utilizando un RRT-SH3 para reconocer la región molecular en su proteína diana que debería ser a la que debería dirigirse un fármaco para evitar interacciones similares de esta proteína con dominios SH3 que ocurran de forma natural.

Los seis residuos de los aminoácidos de SH3 a ser reemplazados, de acuerdo a la invención, por una secuencia de aminoácidos artificial para generar dominios RRT-SH3, corresponden a los residuos 69 a 74 (EAIHHE) en la secuencia de proteínas p59 Hck humana (GenBank PID: 2144421), y forman la parte expuesta de una estructura SH3 conocida como el lazo RT. Aunque los dominios SH3 son divergentes en su secuencia de aminoácidos en esta región, residuos análogos se encuentran también presentes en los lazos RT de todos los otros dominios SH3. En otros dominios SH3 estos análogos aminoácidos pueden ser definidos como los residuos que ocupan las seis posiciones consecutivas en la cadena de polipéptidos que siguen de forma inmediata a una extensión conservada de aminoácidos conocidos como el motivo consenso ALYDY, ya que ésta o una secuencia relacionada puede ser identificada por alineación de aminoácidos en prácticamente todos los dominios SH3. Por ejemplo, en la mayoría de los terminales amino de los tres dominios SH3 de la proteína humana Nck (GenBank PID: 88235) estos residuos son VAQQEQ y ocupan las posiciones de aminoácidos 14 a 19, mientras que en el dominio SH3 del terminal carboxilo de la proteína Vav1 de roedores (GenBank PID: 6755955) estos residuos son CARDRS y ocupan las posiciones de aminoácidos 794 a 799.

Los dominios RRT-SH3 obtenidos pueden modificarse aún más en su estructura, por ejemplo acortando la secuencia de aminoácidos del mismo, sin que afecte a su función, para obtener dominios derivados de RRT-SH3. Tales derivados pueden poseer propiedades ventajosas para la expresión en células.

5 Como un ejemplo de la generación de dominios SH3 con propiedades de unión seleccionadas, describiremos a continuación en detalle la generación de dominios SH3 derivados de Hck-SH3, estando dirigidos a la proteína Nef del VIH-1.

Ejemplo 1: dominios SH3 dirigidos con alta afinidad a las formas silvestres y con unión deficiente de Nef VIH-1.

Métodos

10 Generación de vectores fagómidos que contienen Hck-SH3

Para producir un fagómido para la expresión de Hck-SH3 nativo, un fragmento de ADN que codifica un fragmento de polipéptido Hck de 56 aa (NH₂-VV... VDSL-COOH) fue amplificado por PCR utilizando polimerasa Pfu (Stratagene) y cebadores que contienen sitios PstI y NotI, y fue insertado en los correspondientes sitios en pCANT AB-6EP, una versión modificada de pCANTAB-5E (Pharmacia) con un nuevo sitio de clonación PstI. Para crear la biblioteca de dominios RRT-SH3, fue utilizado un cebador de PCR codificante mayor 5' – AAT CTG CAG GAA TTC GTG GTT GCC CTG TAT GAT TAT NNN NNK NNS NNK NNK NNS GAC CTC AGC TTC CAG AAG GGG GAC-3' que se extiende por el lazo RT que codifica la región de Hck (N= C/G/T/A, S= G/C y K= G/T), y el fragmento resultante fue clonado en pCANTAB-5EP como se ha descrito anteriormente. Un total de 137x10⁶ colonias individuales recombinantes fueron obtenidas por electroporación en células TG1 de *E. coli*, que fueron combinados e infectados con el fago auxiliar M13KO7 como se explica a continuación.

Producción de fagos recombinantes infecciosos

Se cultivaron cultivos durante la noche de células TG1 portadoras del(os) fagómido(s) de interés a 30°C en 2xYT conteniendo 100 µg/ml de ampicilina y 2% de glucosa (2xYT/AG). Los cultivos fueron diluidos 1/10 en 2xYT/AG, e incubados con 5 x 10⁸ pfu/ml del fago auxiliar M13KO7 (Pharmacia) durante 2 horas a 37°C. Las bacterias fueron peletizadas, y el medio se cambió a 2xYT conteniendo 100 µg/ml de ampicilina y 50 µg/ml de kanamicina (2xYT/AK). Después del crecimiento durante la noche de la bacteria doblemente resistente en este medio a 37°C, se recogió el sobrenadante que contiene los fagos recombinantes, se pasaron a través de un filtro de 0.45 µm, y se almacenaron en alícuotas a 4°C hasta que fuera necesario.

Selección de fagos

30 Placas de seis pocillos fueron recubiertas con 10 µg/ml de GST-Nef (VIH-1 NL4-3 Nef que contiene un cambio para imitar la Nef de los aislados VIH-1 típicos primarios; Saksela et al., 1995. EMBO J, 14, 484-91), GST-NefR90 (ver texto; Manninen et al. 1998. Virology, 250, 273-82), GST-Nef-PA1 (P72A+P75A mutante de Nef; Saksela et al. 1995. EMBO J, 14, 484-91) o GST simple en 50 mM de carbonato sódico de pH 9.6 a 4°C durante la noche. Se bloquearon sitios de unión no específicos con 5% de leche en PBS/0.05% de Tween 20, y los pocillos se lavaron brevemente con PBS antes de que fueran añadidos 10⁷- 10¹¹ de pfu de fagos recombinantes por pocillo (títulos mayores utilizados en las primeras rondas de la selección), seguido de incubación durante 2 horas en RT. En algunos experimentos que implican pocillos recubiertos de NefR90, la solución de fagos fue complementada con 10 µg/ml de Nef silvestre soluble. Tras la incubación con los fagos, los pocillos se lavaron seis veces (5 min) con PBS + 0.05 % de Tween 20 y tres veces con PBS.

40 En la mayoría de los experimentos los fagos unidos fueron eluidos con un pequeño volumen de PBS conteniendo un exceso de (150 µg/ml) la misma proteína Nef inmovilizada en el pocillo. De manera alternativa, las células TG1 a ser infectadas se añadieron directamente a los pocillos lavados. En ambos casos, las bacterias fueron cultivadas en primer lugar en 2xTY para registrar la fase de un cultivo durante la noche, infectadas con los fagos de afinidad seleccionada durante 2 horas a 37°C, después de lo cual una muestra de 1% fue extraída para la determinación del título infeccioso de los fagos seleccionados, preparando los cultivos en placas sobre placas de ampicilina. Estas placas además sirvieron como indicadores para el enriquecimiento de clones específicos en comparación a placas infectadas con fagos de pocillos recubiertos con GST procesados en paralelo. El 99% restante de las bacterias infectadas fueron complementadas con 100 µg/ml de ampicilina y 2% de glucosa, y fueron sometidas a una posterior infección con 5 x 10⁸ pfu/ml de fagos auxiliares M13KO7 durante 2 horas a 37°C, tras lo cual fueron peletizadas y resuspendidas en un volumen igual de 2xYT/AK. Después de una incubación durante la noche, los sobrenadantes de fagos recombinantes amplificados se recogieron como se ha descrito anteriormente, y se utilizaron para la posterior ronda de selección/infección. Habitualmente, después de 8 ciclos de selección 10⁷ colonias fueron escogidas para la preparación del ADN fagómido mediante miniprep, y su inserto RRT-SH3 fue secuenciado utilizando Abi Prism 310 (Perkin Elmer Applied Biosystems).

Expresión de proteínas recombinantes

La generación del vector pGEX para la expresión bacteriana de la fusión de proteínas GST para Nef y Hck-SH3 ha sido descrita previamente (Saksela et al. 1995. EMBO J, 14, 484-491; Manninen et al. 1998. Virology, 250, 273-282). Los vectores GST-RRT-SH3 se construyeron por amplificación PCR de los fragmentos SH3 de los correspondientes fagómidos, y la inserción entre los sitios ECO RI y Sal I en pGEX-4T-1 (Pharmacia), y fueron verificados por secuenciación. La expresión y purificación de la fusión de proteínas GST en *E. coli* BL21 se llevaron a cabo mediante métodos estándar tal como se recomienda por el proveedor de los vectores pGEX y la resina de glutatión (Pharmacia). Después de la elución de la fusión de proteínas de la resina, fueron concentradas y su tampón cambió a PBS mediante ultrafiltración en columnas de UF2 Centrex (Schleicher & Schuell), seguido de mediciones de concentraciones utilizando el método BioRad (Lowry) que utiliza BSA como un estándar. La concentración e integridad de las proteínas fue adicionalmente confirmada en tinción de geles SDS PAGE con azul Coomassie. La biotinylación fue realizada utilizando el reactivo EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin, tal como sugiere el fabricante (Pierce), tras lo cual estas proteínas se sometieron a 3 rondas de ultrafiltración para extraer cualquier biotina libre, seguido de medición de concentración como se ha descrito con anterioridad.

15 Ensayo competitivo de unión de Nef/SH3

Tiras de Nunc Maxisorp F8 fueron recubiertas con las diferentes proteínas GST-Nef (200 ng en 100 μ l por pocillo) durante la noche a 4°C, seguido por una incubación de 30 min en RT con 1.5% de BSA en tampón de lavado (WB; PBS + 0.05% DE Tween-20) para saturar la unión no específica de proteínas, y se lavó dos veces con WB (tampón de lavado). Las proteínas SH3 no marcadas utilizadas como competidores fueron diluídas en WB que contenía 1.5% de BSA y un gran exceso molar de GST simple (4 μ M) para minimizar cualquier dimerización de la fusión de proteínas dirigida por GST. Se mezclaron 50 μ l de esta solución con un volumen igual de la sonda (SH3 biotinilado en WB) y se añadió a los pocillos dando como resultado una concentración final de la sonda de 66 nM (ensayos de Hck/SH3/Nef y RRT.A1/NefR90) o 7 nM (ensayo de RRT.A1/Nef). Después de 1 hora de incubación en RT los pocillos fueron lavados tres veces con WB, y se añadieron 100 μ l de dilución 1:2000 (en WB) del complejo estreptavidina -biotina con peroxidasa de rábano picante (Amersham Life Sciences) por pocillo. Las placas se incubaron 45 min en RT y se lavaron nuevamente tres veces, después de lo cual su actividad de peroxidasa se midió utilizando diclorhidrato de 1,2-fenilendiamina (OPD; 0.6 mg/ml; Fluka AB) como sustrato. Las reacciones enzimáticas se pararon después de 10 minutos mediante la adición de 50 μ l de 2 M de ácido sulfúrico, seguido de medición de densidad óptica a 492 nm utilizando un contador multitécnica Victor 1420 (Wallac).

30 Resultados

Se ha demostrado que la unión ávida de Nef VIH-1 al dominio Src de homología-3 (SH3) de Hck (K_D 250 nM) implica una interacción entre el lazo RT de Hck-SH3 y los residuos en Nef en el exterior de su región del ligando SH3 que contiene la hélice de la poliprolina prototípica tipo II (PPII). Se cree que tales interacciones distintivas proporcionan especificidad y afinidad también por otros complejos de proteínas ligando/SH3. En esta invención se construyó y se mostró de manera exitosa en la superficie de las partículas del bacteriófago M13 una biblioteca de complejos de dominios SH3, que están derivados de Hck pero portan una sustitución de hexapéptidos aleatoria en sus lazos RT (denominados RRT-SH3). Mediante esta estrategia identificamos dominios RRT-SH3 individuales que pueden unirse a Nef con afinidades mayores que K_D 10 nM. Algunas de estos dominios RRT-SH3 de alta afinidad se parecen a Hck-SH3 en que se unieron de forma mucho peor a la variante de Nef que contiene una mutación F90R diseñada que interfiere con el acoplamiento del lazo RT de Hck nativo. Además, pudimos también seleccionar dominios RRT-SH3, con una especificidad opuesta, que eran dependientes del residuo Arg⁹⁰ para una unión fuerte, y tuvimos una afinidad 100 veces menor para el Nef no modificado. Estos resultados enfatizan la importancia del lazo RT en la selección de ligandos de SH3, y sugieren una estrategia general para crear dominios SH3 con propiedades de unión deseadas.

45 Generación de una biblioteca RRT-SH3 con expresión en fagos

Para analizar si sería posible presentar dominios SH3 funcionales sobre la superficie de bacteriófagos, construimos un fagómido que contiene Hck-SH3, y, mediante la utilización de un virus auxiliar M13KO7, produjimos fagos recombinantes expresándolo fusionado a la proteína de la cápsida pIII. Cuando estos fagos se incubaron en placas de seis pocillos con GST-Nef purificado, GST-Nef-PA1 (un P75A con unión deficiente a SH3; P75A mutante de Nef), o proteína GST simple, se descubrió que los títulos de partículas de fagos infecciosas que resisten lavados eran 2 o 3 órdenes de magnitud mayor en los pocillos recubiertos con GST-Nef en comparación con los pocillos recubiertos con GST simple o con la proteína de fusión GST-Nef-PA1 (datos no mostrados). Por tanto, estos resultados indicaron que los dominios SH3 funcionales pueden mostrarse sobre la superficie de partículas de fagos M13, y que tales fagos pueden ser seleccionados con seguridad utilizando un ligando de SH3 afín como un reactivo de afinidad.

55 Para crear dominios SH3 con propiedades de unión a ligandos nuevas, utilizamos mutagénesis dirigida por PCR para producir una gran colección de dominios SH3 (denominados RRT-SH3) que compartían su estructura global con Hck-SH3, pero que conetnían una combinación aleatoria de aminoácidos en el lugar de los seis residuos de

lazos RT (EAIHHE) que constituyen una región variable entre los dominios SH3 de otra manera homólogos. Generamos ≈130 millones de clones de fagómidos recombinantes individuales que expresan diferentes dominios RRT-SH3, lo que excede la cantidad teórica de todas las posibles combinaciones de los péptidos de seis residuos realizadas a partir de 20 aminoácidos diferentes ($20^6 = 64$ millones). Se generó una producción de fagos infecciosos mostrando esta heterogénea población de proteínas RRT-SH3, tal como se ha explicado con anterioridad para el fagómido que expresa Hck-SH3, y se utilizó para posteriores experimentos de selección de afinidad.

Selección de proteínas RRT-SH3 de unión a Nef

Para analizar si la biblioteca de RRT-SH3 contenía nuevas proteínas SH3 de unión a Nef, llevamos a cabo una extensa selección de fagos que mostraban afinidad por Nef VIH-1 silvestre. El esquema de selección consistió en múltiples experimentos independientes (11 en total) que consistían en 7 u 8 rondas de reamplificación dirigida por selección de afinidad y por virus auxiliares de los fagos recombinantes. Una colección representativa de clones de RRT-SH3 derivados de diferentes rondas de selección de fagos fueron secuenciados siguiendo a la pérdida de heterogeneidad en la población y la aparición de clones de RRT-SH3 de unión a Nef putativos. Un total de 278 clones de RRT-SH3 seleccionados utilizando Nef fueron secuenciados (Tabla I y datos no mostrados). Después de seis rondas de selección, las poblaciones de fagos fueron dominadas de manera habitual por 1-3 diferentes clones de RRT-SH3. En la mayoría de los casos los clones dominantes eran idénticos o similares a los clones derivados de otros experimentos independientes, llevándonos a creer que habíamos muestreado de forma bastante exhaustiva la biblioteca para los dominios SH3 con capacidad de unión de alta afinidad a Nef VIH-1.

Las secuencias de lazos RT de los clones de RRT-SH3 que resultaron ser somnantes tras ≥7 rondas de selección se encuentran enumeradas en la Tabla I. Éstas recayeron en cuatro familias de secuencias caracterizadas por tres o más residuos idénticos dentro de cada clase. Además, estas familias también compartían similitudes obvias, sobre todo un residuo de serina en la segunda de las seis (2/6) posiciones aleatorizadas presentes en todas ellas. Un clon prevalente (RRT.C1) contenía los motivos consenso de dos familias de secuencias de lazos RT diferentes (B y C). Además de la frecuente aparición de serina, estos lazos RT eran extraordinariamente ricos en residuos aromáticos y de prolina. Aunque el lazo RT del ligando de Nef natural, Hck-SH3, también contiene dos residuos aromáticos (histidinas), la secuencia de lazo RT seleccionada no conserva ninguna semejanza obvia a esta región en Hck-SH3, o cualquier otro dominio SH3 que ocurra de forma natural en la base de datos del Banco de Genes (GenBank).

Tabla I. Secuencias de lazos RT y unión de los correspondientes dominios SH3 a Nef y a NefR90

Dominio SH3	Lazo RT	Hck-SH3 como la sonda Ratio del competidor por sonda dando una inhibición del 50% con Nef como ligando	RRT.A1 como la sonda Inhibición en una sonda equimolar: Ratio del competidor	
			Nef como el ligando:	NefR90 como el ligando:
Hck-SH3	E A I H H E	1:1	<5%	<5%
RRT.A1	V S W S P D	1:35	55%	52%
RRT.A2	F S W S D P	1:19	20%	53%
RRT.A3	D S W S D P			
RRT.A4	Y S W S D M	1:10	34%	44%

Tabla I (continuación)

Dominio SH3	Lazo RT	Hck-SH3 como la sonda Ratio del competidor por sonda dando una inhibición del 50% con Nef como ligando	RRT.A1 como la sonda Inhibición en una sonda equimolar: Ratio del competidor	
			Nef como el ligando:	NefR90 como el ligando:
RRT.B1	W S P F P S	1:26	41%	9%
RRT.B2	D S P F S F	1:22	22%	26%
RRT.B3	F S P F S F			
RRT.B4	F S P F D W	1:21	41%	37%
RRT.B5	S S P F D W			
RRT.B6	Y S P F S W	1:37	51%	14%
RRT.C1	T S P F P W	1:31	39%	<5%
RRT.C2	Y S F F P W	1:16	20%	13%
RRT.C3	Y S D F P W	1:26	42%	20%
RRT.C4	D S W F P W	1:14	10%	19%
RRT.D1	S S F Y S S	1:22	45%	17%
RRT.m1	Q G F L D Q	1:0.8	<5%	73%
RRT.m2	N A F L P S	1:2	<5%	73%
RRT.m3	E A W S P L	1:17	22%	62%
RRT.m4	E S Y S E W	1:0.8	<5%	46%

5 Cuando los sobrenadantes de fagos de RRT-SH3 de las últimas rondas de selección, que fueron dominados por los clones mostrados en la Tabla I, se sometieron a una ronda adicional de selección de afinidad utilizando Nef silvestre y el mutante Nef-PA1 de unión negativa a SH3 en paralelo, se observó una captura eficiente de fagos recombinantes tan solo en el primer caso, mientras que la recuperación de fagos de los pocillos recubiertos con Nef-PA1 no difirieron de los pocillos de control sin Nef (datos no mostrados). Por tanto, mientras que las secuencias de lazos RT de los fagos de RRT-SH3 enriquecidos les dotaron con una afinidad superior para Nef en comparación con el resto de los clones en la biblioteca, estas interacciones resultaron dependientes, de una manera crucial, de un motivo PxxP intacto en Nef, como se espera para una unión mediada por SH3 *auténtica*.
10 Los dominios RRT-SH3 pueden unirse a Nef con alta afinidad

15 Para estudiar las propiedades de unión de los dominios RRT-SH3 seleccionados en mayor detalle, hemos transferido varios miembros de cada una de las familias de clones en un vector de expresión bacteriana para ser producido para estudios bioquímicos. Para realizar una estimación de sus afinidades para Nef desarrollamos un competitivo ensayo de unión con placas de 96 pocillos. En este ensayo se pusieron a prueba las diluciones en serie de las proteínas RRT-SH3 para su habilidad de competir con una cantidad constante de Hck-SH3 biotinilado para unirse a Nef inmovilizada, seguido de cuantificación colorimétrica de Hck-SH3 unido. Las afinidades de unión de diferentes proteínas RRT-SH3 utilizadas como competidores podrían entonces ser fácilmente calculadas en base al valor bien caracterizado K_D (250 nM) de la interacción Hck-SH3/Nef. Este diseño de ensayo fue elegido porque
20 debería ser relativamente insensible a la mayoría de fuentes potenciales de error que podrían influir fácilmente en un

ensayo no competitivo, tales como los efectos causados por la parte de GST de las proteínas de fusión SH3 o los relacionados con las condiciones de incubación y lavado. La validez de este ensayo fue firmemente respaldada por la excelente correlación de los valores teóricos y experimentales para una competición homotípica de Hck-SH3 no marcado con Hck-SH3 biotinilado, mostrando una inhibición de cerca del 50% en un ratio 1:1, y valores esperados sobre un amplio rango de ratios de concentración (Fig. 2A).

Como resulta evidente por la Figura 2A y de la Tabla I, todas las proteínas RRT-SH3 de las últimas rondas de selección se unieron a Nef sustancialmente mejor que Hck-SH3. Muchas de estas RRT-SH3 fueron capaces de competir con más del 50% de las uniones de Hck-SH3 a Nef, incluso cuando se encontraron presentes en una concentración 20 veces menor, indicando un valor K_D por debajo de 12 nM. Aunque dichos dominios RRT-SH3 de una unión tan ávida se encontraron en todas las familias de secuencias de lazos RT, el motivo tripéptido Ser-Pro-Phe estuvo presente con frecuencia en clones que habían mostrado la unión más fuerte a Nef. Las proteínas RRT.A1, RRT.B6, y RRT.C1 podrían inhibir de manera consistente un 50% o más de las uniones de Hck-SH3 incluso en ratios de concentraciones menores a 1:35, correspondiente a valores K_D tan bajos como 7 nM.

Estas afinidades extraordinariamente altas fueron también respaldadas por experimentos en los que al ensayo de placas de 96 pocillos se formateó en la configuración inversa, utilizando dominios RRT-SH3 de una alta afinidad (RRT.A1) como la sonda, y Hck-SH3 o una de las otras proteínas RRT-SH3 como el competidor (fig. 2B). La habilidad de las diferentes proteínas RRT-SH3 para competir con RRT.A1 estuvo en buena correlación con su relativa capacidad en inhibir la unión de Hck-SH3. De manera notable, Hck-SH3 resultó ser un competidor pobre de la interacción RRT.A1/Nef, y fue capaz de causar una inhibición del 50% sólo cuando se añadió en un exceso de más de 100 veces de RRT.A1 utilizado como una sonda (7 nM vs. >0.85 μ M). Al igual que cuando se utiliza Hck-SH3 como la sonda, la competencia homotípica con una cantidad equimolar de RRT.A1 no marcado resultó en una esperada inhibición de la unión del 50%. Por tanto, este ensayo de configuración inversa confirmó nuestras conclusiones con respecto a las afinidades de unión superiores de las proteínas RRT-SH3 seleccionadas, y sugirieron que su afinidad podría ser incluso más alta que la estimada utilizando Hck-SH3 como la sonda.

Los dominios RRT-SH3 reconocen Nef mediante estrategias divergentes

Tal como se ha analizado anteriormente, un residuo de isoleucina en el lazo RT de Hck-SH3 ha mostrado ser importante para su unión a Nef. La cadena lateral alifática de este residuo le encaja en un bolsillo hidrofóbico formado en parte por el residuo Phe⁹⁰ de Nef. La mutación de esta fenilalanina en arginina (creando un mutante al que nos referiremos como NefR90 en adelante) disminuye enormemente la afinidad de la unión Hck-SH3 (K_D 1.99 μ M). Mientras esta interacción proporciona una explicación estructural para la afinidad de Hck-SH3, otros modos de reconocimiento molecular de la superficie del ligando-SH3 de Nef podrían también preverse. Por lo tanto, nos interesamos en examinar si los dominios RRT-SH3 de Nef seleccionados también dependían de una interacción hidrofóbica similar, y estarían por lo tanto influenciados por la mutación F90R en Nef.

Debido a la baja afinidad de la interacción Hck-SH3/NefR90 no fue posible desarrollar un ensayo de placas de 96 pocillos cuantitativo basado en la unión de Hck-SH3 a NefR90 inmovilizada. Por el contrario, se observó una fuerte unión y una relación señal/ruido adecuada cuando la proteína biotinilada RRT.A1 se puso a prueba como una sonda. Este hecho indicó que el dominio RRT-SH3 RRT.A1 no dependía de forma crítica del residuo Phe⁹⁰ en su unión a Nef, nos permitió analizar la afinidad relativa del resto de las proteínas NefR90 en base a su habilidad para competir con RRT.A1 (Fig.3).

Como se esperaba, Hck-SH3 fue un competidor muy poco eficiente de la interacción RRT.A1/NefR90 (Fig. 3 y Tabla I), y no logró causar una inhibición de la unión del 50% incluso cuando fue utilizado en un exceso molar de 16 veces (66 nM vs. 1.1 μ M), lo cual fue el mayor ratio práctico competidor:sonda en el ensayo de NefR90. En base al valor K_D 1.99 μ M previamente medido para el complejo Hck-SH3/NefR90 (Manninen et al. 1998. *Virology*, 250, 273-82), se estimó que la absoluta afinidad de RRT.A1 para NefR90 es en consecuencia 100 nM o mejor. Cuando las otras proteínas RRT-SH3 de Nef seleccionadas se pusieron a prueba como competidores para la unión a RRT.A1, se observó una afinidad ampliamente variada para NefR90 (Fig. 3 y Tabla I). Algunos RRT-SH3 (tales como RRT.A2 y RRT.B4) compitieron de manera eficiente con la unión RRT.A1, indicando que al igual que RRT.A1 también eran relativamente insensibles al cambio F90R. En contraste, otros RRT-SH3 (tales como RRT.B y RRT.C1) fueron prácticamente incapaces de interferir con la formación del complejo RRT.A1/NefR90, incluso cuando se puso a prueba en altas concentraciones. Por tanto, algunas de las proteínas RRT-SH3 de alta afinidad compartían con Hck-SH3 un modo de unión a Nef en el que Nef Phe⁹⁰ juega un papel dominante, mientras que otros parecían reconocer a Nef mediante mecanismos dispares, y además unirse bien a NefR90.

RRT-SH3 específico para el mutante NefR90

El descubrimiento anterior sugirió que, dependiendo de sus lazos RT, los dominios SH3 podían reconocer ligandos mediante estrategias moleculares divergentes. Impulsados por esta observación, quisimos extender este concepto aún más mediante el diseño de dominios SH3 con especificidades de unión totalmente redirigidas. Para este fin, decidimos desarrollar dominios RRT-SH3 que no se unieran a Nef silvestre, sino que en lugar de ello mostraran una

fuerte afinidad para el mutante NefR90. Por tanto, la unión de tales dominios RRT-SH3 sería estrictamente dependiente de interacciones mediadas por determinantes estructurales implicando el residuo del mutante Arg⁹⁰, y portaría poca semejanza con el reconocimiento natural de Nef por Hck-SH3. Para este propósito Nef-F90R se utilizó como un reactivo de selección de afinidad, como se describió anteriormente para el Nef silvestre, excepto porque en algunos experimentos un exceso de Nef silvestre soluble se incluyó también para aumentar las proteínas RRT-SH3 de selección que reconocerían principalmente los determinantes dependientes de Arg⁹⁰.

Las secuencias de lazos RT que se observan con mayor frecuencia de los dominios RRT-SH3 seleccionados de NefR90 se muestran en el panel inferior de la Tabla I. Aunque estos experimentos de selección se llevaron a cabo prácticamente de forma tan extensa (6 experimentos independientes) como en el caso de Nef silvestre, las secuencias de lazos RT consenso igualmente obvias no resultaron claras. Tal como se ve en la Tabla I, sin embargo, ciertos aminoácidos resultaron favorecidos en algunas posiciones, tales como los dipéptidos Phe-Leu en las posiciones 3/6 y 4/6, Glu en 1/6, Ala en 2/6, y Ser en 4/6. De manera notable, estos lazos RT seleccionados de NefR90 no contenían ninguno de los motivos de la secuencia que caracterizaba los dominios RRT-SH3 seleccionados de Nef. Además, con una excepción (RRT.m4), el Ser 2/6 que resultó invariable en los clones seleccionados de Nef estuvo ausente en los dominios RRT-SH3 seleccionados de NefR90.

Como se muestra en la Fig. 3 y Tabla I, todas las proteínas seleccionadas para la unión a NefR90 (RRT.m1 a través de RRT.m4) pudieron competir de manera eficiente con la unión del clon RRT.A1 a NefR90, y se estimó que tienen una afinidad de 8 a 4 veces más alta que el clon “doble-específico” RRT.A1. De forma extraordinaria, la unión de algunos de estos dominios RRT-SH3 seleccionados de NefR90 fue dependiente de forma crítica del residuo Arg⁹⁰ del mutante, mientras otros parecían ser “doble-específicos”. Un ejemplo del último fue RRT.m3, que además de ser un potente inhibidor de la interacción RRT.A1/NefR90, también compitió bien con RRT.A1 en su unión a Nef. En contraste, los clones RRT.m1 y RRT.m4 fueron virtualmente incapaces de competir con RRT.A1 para unirse a Nef (Fig. 3 y Tabla I). Por tanto, sólo una pequeña fracción de la fuerte afinidad de RRT.m1 y RRT.m4 hacia NefR90 fue aportada por determinantes estructurales que no implicaban el residuo Arg⁹⁰ del mutante. Debido a esta afinidad residual (independiente de Arg⁹⁰), sin embargo, podían aún competir con la interacción Hck-SH3/Nef. Sin embargo, el hecho de que estos clones se unieron a NefR90 al menos 100 veces mejor que Hck-SH3 o algunos de los clones seleccionados de Nef (tales como RRT.C1) claramente indicó que habían sido dotados de una especificidad de unión sorprendentemente nueva, lo que los dirigió para una interacción de alta afinidad que dependía de un epitopo creado artificialmente en su ligando.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Saksela, Kalle

<120> Métodos y materiales para generar dominios SH3 con propiedades de unión seleccionadas

<130> 30975

<140>

5 <141>

<150> 60/136,085

<151> 1999-05-26

<160> 24

<170> PatentIn Ver. 2.2

10 <210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

15 <223> el motivo consenso ALYDY de los dominios SH3

<400> 1

Ala Leu Tyr Asp Tyr
1 5

<210> 2

<211> 6

20 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

<223> aminoácidos 14-19 de la proteína humana Nck

<400> 2

Val Ala Gln Gln Glu Gln
1 5

25

<210> 3

<211> 6

<212> PRT

ES 2 371 464 T3

<213> Mus sp.

<220>

<223> aminoácidos 794-799 del dominio SH3 C-terminal de la proteína Vav1 de roedores <400> 3

Cys Ala Arg Asp Arg Ser
1 5

5 <210> 4

<211> 78

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador PCR

<220>

<223> n = c/g/t/a s = g/c k = g/t

<400> 4

15

attctgcagg aattcgtggt tgcctgtat gattatnnnn nknsnnknn knnsgacctc 60
agcttccaga agggggac 78

<210> 5

<211> 6

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

20 <220>

<223> Residuos de aminoácidos 69-74 de la proteína humana p59 Hck

<400> 5

Glu Ala Ile His His Glu
1 5

<210> 6

25 <211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220> <223> Descripción de la secuencia Artificial: secuencia de lazo RT modificada

ES 2 371 464 T3

<400> 6

Val Ser Trp Ser Pro Asp
1 5

<210> 7

<211> 6

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: secuencia de lazo RT modificada

<400> 7

Phe Ser Trp Ser Asp Thr
1 5

10

<210> 8

<211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

15 <220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: secuencia de lazo RT modificada

<400> 8

Asp Ser Trp Ser Thr Ser
1 5

<210> 9

20 <211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia Artificial: secuencia de lazo RT modificada

25 <400> 9

Tyr Ser Trp Ser Asp Met
1 5

<210> 10

ES 2 371 464 T3

<211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

5 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: secuencia de lazo RT modificada

<400> 10

Trp Ser Pro Phe Pro Ser
1 5

<210> 11

<211> 6

10 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: secuencia de lazo RT modificada

<400> 11

Asp Ser Pro Phe Ser Phe
1 5

15

<210> 12

<211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

20 <220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: secuencia de lazo RT modificada

<400> 12

Phe Ser Pro Phe Ser Phe
1 5

<210> 13

25 <211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: secuencia de lazo RT modificada

<400> 13

Phe Ser Pro Phe Asp Trp
1 5

<210> 14

5 <211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: secuencia de lazo RT modificada

10 <400> 14

Ser Ser Pro Phe Asp Trp
1 5

<210> 15

<211> 6

<212> PRT

15 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: secuencia de lazo RT modificada

<400> 15

Tyr Ser Pro Phe Ser Trp
1 5

20 <210> 16

<211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

25 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: secuencia de lazo RT modificada

<400> 16

Thr Ser Pro Phe Pro Trp
1 5

<210> 17

<211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

5 <220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: secuencia de lazo RT modificada

<400> 17

Tyr Ser Phe Phe Pro Trp
1 5

<210> 18

10 <211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: secuencia de lazo RT modificada

15 <400> 18

Tyr Ser Asp Phe Pro Trp
1 5

<210> 19

<211> 6

<212> PRT

20 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: secuencia de lazo RT modificada

<400> 19

Asp Ser Trp Phe Pro Trp
1 5

25 <210> 20

<211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

ES 2 371 464 T3

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: secuencia de lazo RT modificada

<400> 20

Ser Ser Phe Tyr Ser Ser
1 5

5 <210> 21

<211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: secuencia de lazo RT modificada

<400> 21

Gln Gly Phe Leu Asp Gln
1 5

<210> 22

<211> 6

15 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: secuencia de lazo RT modificada

<400> 22

Asn Ala Phe Leu Pro Ser
1 5

20

<210> 23

<211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

25 <220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: secuencia de lazo RT modificada

<400> 23

ES 2 371 464 T3

Glu Ala Trp Ser Pro Leu
1 5

<210> 24

<211> 6

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: secuencia de lazo RT modificada

<400> 24

Glu Ser Tyr Ser Glu Trp
1 5

10

REIVINDICACIONES

1. Método para generar dominios SH3 con propiedades de unión seleccionadas, que consta de
 - a) Producir una colección de dominios SH3 que contengan mutaciones aleatorizadas en una región variable del lazo RT (dominios RRT-SH3) que corresponda a los residuos de aminoácidos 69 a 74 en la secuencia de la proteína Hck humana,
5
 - b) Generar bibliotecas recombinantes que expresen dichos dominios RRT-SH3, y
 - c) Someter tales bibliotecas a etapas de afinidad o de selección funcional para identificar dominios SH3 nuevos.
- 10 2. El método según la reivindicación 1, en donde el paso a) es efectuado reemplazando los residuos de aminoácidos en la región variable del lazo RT por otros residuos cualquiera de aminoácidos.
3. El método según la reivindicación 2, en donde dichos residuos de aminoácidos en la región variable del lazo RT comprenden seis residuos de aminoácidos que siguen de forma inmediata a una extensión de aminoácidos denominada motivo consenso ALYDY.
- 15 4. El método según la reivindicación 1, en donde las bibliotecas recombinantes están seleccionadas de bibliotecas de plásmidos, fagómidos y víricas.

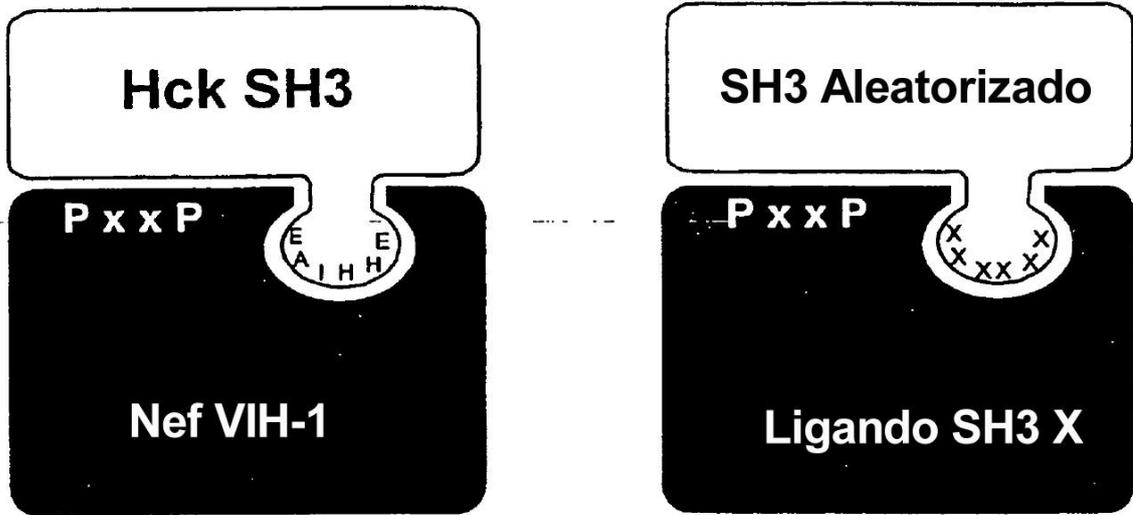


Figura 1

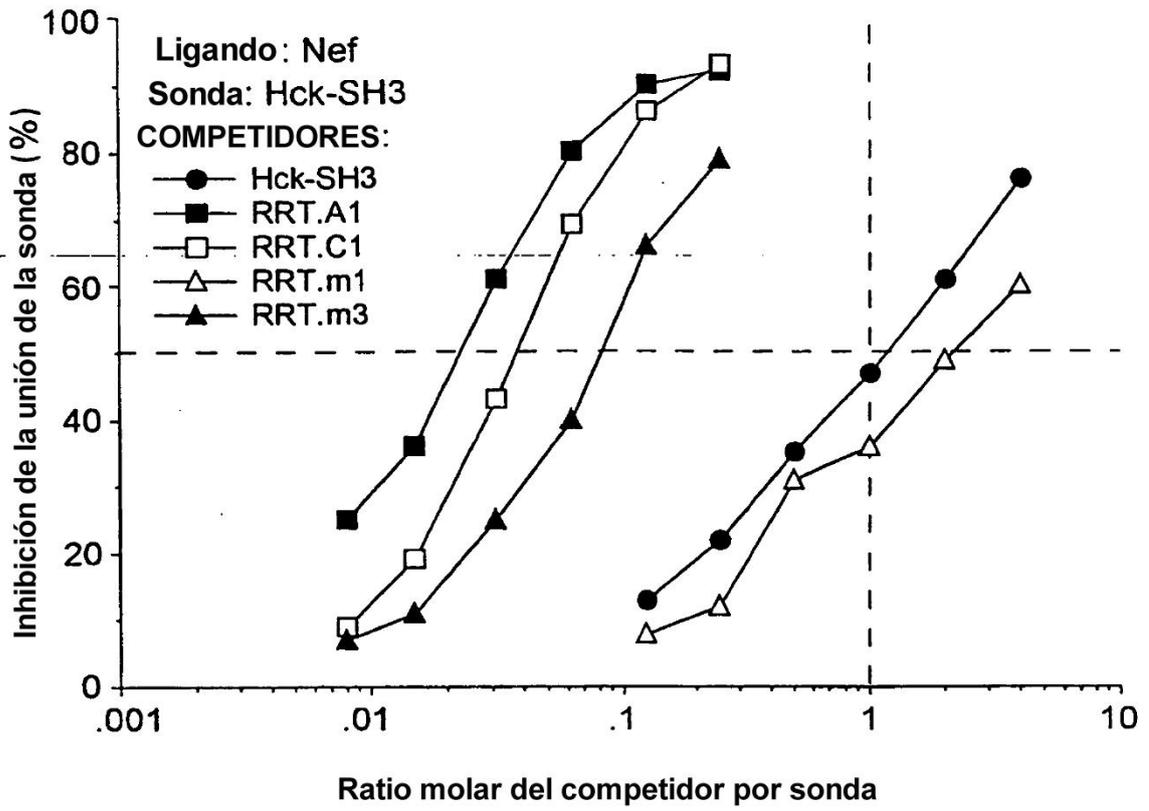


Figura 2A

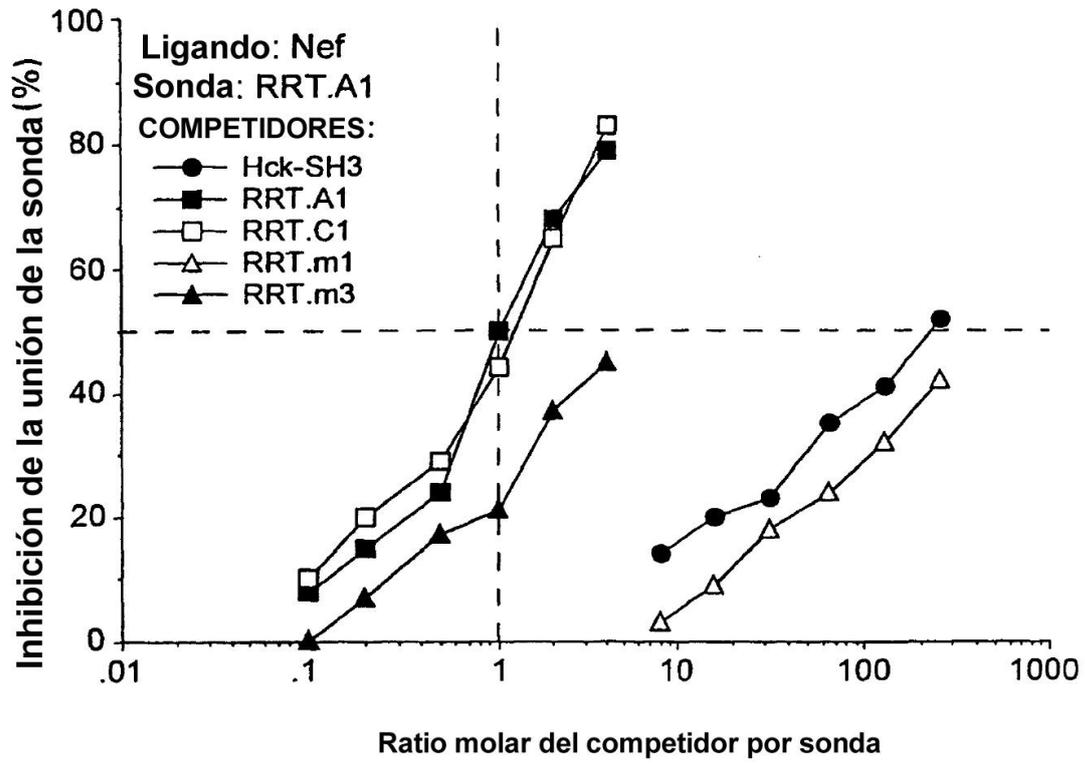


Figura 2B

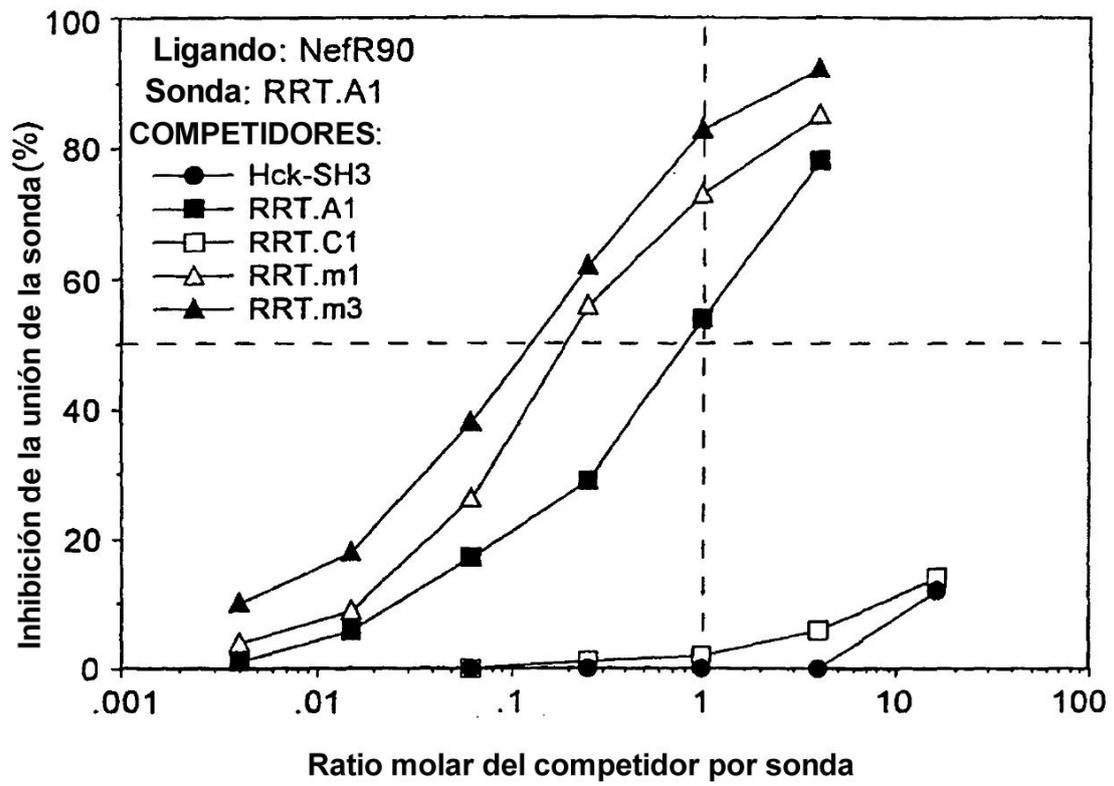


Figura 3