

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 372 029**

51 Int. Cl.:  
**C07K 1/13** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **02021322 .9**  
96 Fecha de presentación: **20.09.2002**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1295894**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **26.03.2003**

54 Título: **MÉTODO PARA UNA BIOTINILACIÓN ESPECÍFICA DE SECUENCIA DE POLIPÉPTIDOS IN VITRO.**

30 Prioridad:  
**25.09.2001 EP 01122554**  
**13.12.2001 EP 01129681**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**13.01.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**13.01.2012**

73 Titular/es:  
**F. Hoffmann-La Roche AG**  
**4070 Basel, CH**

72 Inventor/es:  
**Ambrosius, Dorothee;**  
**Lanzendoerfer, Martin;**  
**Schraeml, Michael y**  
**Watzele, Manfred**

74 Agente: **Isern Jara, Jorge**

**ES 2 372 029 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**

Método para una biotilación específica de secuencia de polipéptidos *in vitro*.

5 La invención se refiere a un método mejorado para la biotilación específica de secuencia de polipéptidos.

El enzima biotina holoenzima sintetasa (BirA) de *E. coli* (una biotina ligasa) cataliza la adición covalente *in vivo* del grupo  $\epsilon$ -amino de una cadena lateral de lisina en su sustrato natural, la proteína portadora de carboxilo biotina (BCCP) (Cronan J.E. Jr. *et al.*, J. Biol. Chem. 265:10327-10333, 1990). En *E. coli* únicamente la BCCP se encuentra biotilada. Esta proteína es una subunidad de la acetil-CoA-carboxilasa. La reacción se encuentra catalizada por la biotina proteína ligasa BirA, el producto del gen *qrA* (Cronan J.E. Jr., Cell 58:427-429, 1989). La biotilación de proteínas con un enzima de biotilación también por medios recombinantes se describe en la patente WO n° 95/04069.

15 La biotilación enzimática específica de secuencia utilizando BirA también se describe para los polipéptidos recombinantes durante la expresión en *E. coli* (Tsao K.-L. *et al.*, Gene 169:59-64, 1996). Altman J.D. *et al.*, Science 274:94-96, 1996, describen la biotilación enzimática de polipéptidos aislados *in vitro* utilizando también BirA. Sin embargo, dicho método resulta muy laborioso, requiriendo un número considerablemente superior de etapas de purificación en comparación con la biotilación *in vivo*. En primer lugar, la proteína debe prepararse, aislarse y purificarse. A continuación, se lleva a cabo la biotilación, y después, se lleva a cabo otra purificación. Parrott M.B. y Barry M.A., Biochem. Biophys. Res. Communications 281:993-1000, 2001, describen la biotilación metabólica de proteínas secretadas y de superficie celular procedentes de células de mamífero utilizando el enzima endógeno biotina ligasa de la célula de mamífero. Saviranta P. *et al.*, Bioconjug. Chem. 9:725-735, 1998, describen la biotilación enzimática *in vitro* de fragmentos Fab recombinantes a través de una cola aceptora peptídica. Las proteínas se produjeron recombinantemente en *E. coli*, se purificaron y posteriormente se biotilaron *in vitro* con BirA. Tras la eliminación de los fragmentos Fab no biotilados, el rendimiento global de Fab biotilado era del 40%.

La biotilación tanto *in vitro* como *in vivo* de los polipéptidos heterólogos utilizando biotina ligasas tales como BirA adolece de varias desventajas. Mientras que la biotilación *in vitro* requiere mucho tiempo y es laboriosa, la biotilación *in vivo* resulta en productos que contienen cantidades considerables de BCCP. Resulta difícil separar la BCCP biotilada de la mayoría de los polipéptidos biotilados deseados, y no puede separarse de los mismos por completo.

Es el objetivo de la invención proporcionar un método mejorado y simple para la biotilación enzimática específica de polipéptidos que proporciona polipéptidos específicamente biotilados de alta pureza a rendimiento elevado y de elevada actividad.

**Descripción resumida de la invención**

40 La invención proporciona un método para la síntesis de un polipéptido biotilado caracterizado porque la síntesis se lleva a cabo en una mezcla de reacción de síntesis peptídica libre de células que contiene un lisado celular que contiene ribosomas procedente de células procarióticas o eucarióticas, mediante la traducción o transcripción/traducción de ácidos nucleicos codificantes del polipéptido y BirA, mientras que la mezcla de reacción contiene biotina. Inesperadamente se encontró que la actividad de los polipéptidos, biotilados según el método de la invención, era más alta que la actividad observada para dichos polipéptidos biotilados en un sistema celular de fermentación *in vivo*.

Por lo tanto, la invención proporciona un método para preparar un polipéptido biotilado en una mezcla de reacción de síntesis peptídica libre de células que contiene ribosomas, ARNt, ATP, GTP, nucleótidos, aminoácidos y BirA en forma de ácido nucleico, caracterizado porque: a) el ácido nucleico se expresa para formar dicho polipéptido que contiene una secuencia de sustrato de holocarboxilasa sintetasa (BirA) etiquetada en el extremo N-terminal o C-terminal, y BirA en forma de ácido nucleico se expresa en la mezcla de reacción, proporcionando el polipéptido BirA; b) dicho polipéptido se biotila en presencia de biotina y BirA, c) dicho polipéptido biotilado se aísla de dicha mezcla, o dicha mezcla se incuba con avidina o estreptavidina inmovilizada bajo condiciones en las que dicho polipéptido biotilado se une a dicha avidina o estreptavidina inmovilizada.

Preferentemente, los ribosomas se proporcionan en forma de lisado celular, preferentemente en forma de lisado de *E. coli*.

**Descripción detallada de la invención**

El método según la invención proporciona un método mejorado para la producción de un polipéptido (polipéptido de

interés) que se biotinila específicamente en una secuencia N-terminal o C-terminal de etiqueta mediante biotinilación enzimática específica de sitio. Preferentemente, el polipéptido presenta un peso molecular de entre aproximadamente 8kDa y aproximadamente 120 kDa, preferentemente de una longitud de entre aproximadamente 100 y 400 aminoácidos. Según la invención inesperadamente resulta posible producir dichos polipéptidos biotinilados sin contaminación sustancial de proteína portadora de carboxilo biotina (BCCP) y sin aislamiento intermedio del polipéptido no biotinilado en el caso de que se utilice una mezcla de reacción de síntesis peptídica libre de células para la síntesis polipeptídica.

Una "mezcla de reacción de síntesis peptídica libre de células" según la invención se encuentra descrita en el estado de la técnica y es un lisado libre de células procedente de células procarióticas o eucarióticas, que contiene ribosomas, ARNt, ATP, GTP, nucleótidos y aminoácidos. Un procariótica preferente es *E. coli*.

La síntesis polipeptídica libre de células es un método que se ha conocido en el estado de la técnica desde hace mucho tiempo. Spirin *et al.* desarrollaron en 1988 una traducción libre de células en flujo continuo (CFCF) y sistema acoplado de transcripción/traducción en el que se produce una cantidad relativamente alta de síntesis de proteínas (Spirin A.S. *et al.*, Science 242:1162-1164, 1988). Para dicha síntesis de proteínas libre de células, se utilizaron lisados celulares que contenían ribosomas para la traducción o transcripción/traducción. Dichos extractos libres de células de *E. coli* fueron desarrollados por, por ejemplo, Zubay G., Ann. Rev. Genetics 7:267-287, 1973, y utilizados por Pratt J.M. *et al.*, Nucleic Acids Research 9:4459-4479, 1981, y Pratt *et al.*, Transcription and Translation: A Practical Approach, Hames y Higgins (editores), páginas 179 a 209, IRL Press, 1984. Se describen desarrollos adicionales de la síntesis de proteínas libre de células en las patentes US nº 5.478.730, US nº 5.579.690, EP nº 0 932 664, WO nº 99/50436, WO nº 00/58493 y WO nº 00/55353.

Los sistemas de expresión libres de células eucarióticos se describen en, por ejemplo, Skup D. y Millward S., Nucleic Acids Research 4:3581-3587, 1977; Fresno M. *et al.*, Eur. J. Biochem. 68:355-364, 1976; Pelham H.R. y Jackson R.J., Eur. J. Biochem. 67:247-256, 1976, y en la patente WO nº 98/31827.

La holocarboxilasa sintetasa (EC6.3.4.15, biotina proteína ligasa (BPL), BirA) es un enzima responsable de la unión covalente de la biotina a proteína afín. La biotina ligasa es altamente específica y reacciona únicamente en proteínas que muestran un grado muy elevado de conservación de la estructura primaria del dominio de unión a biotina. Este dominio incluye preferentemente el tetrapéptido AMKM altamente conservado (Chapman-Smith A. y Cronan J.E. Jr., J. Nutr. 129, 2S supl.:477S-484S, 1999). El enzima BirA recombinante se describe en la patente WO nº 99/37785.

Se añade BirA a la mezcla de reacción en forma de ácido nucleico (en un vector de expresión, por ejemplo ARN o ADN) que se expresa (transcribe/traduce) en el sistema en forma de proteína de interés. La cantidad de ácido nucleico depende de la tasa de expresión del vector utilizado y de la cantidad necesaria de enzima BirA en la mezcla de reacción. Un ng de plásmido de ADN de BirA (por ejemplo basado en un vector de expresión *E. coli* disponible comercialmente, tal como los vectores pIVEX, <http://www.bio-chem.roche.com/RTS>), o incluso menos, resulta suficiente para una reacción cuantitativa de biotinilación de proteínas fusionadas con un péptido sustrato de biotinilación de BirA. El rendimiento máximo de proteína de fusión expresada y específicamente biotinilada se consigue mediante la adición del plásmido de ADN codificante de la proteína diana deseada en una cantidad de entre 10 y 15 µg, y la introducción del plásmido de ADN, que es responsable de la coexpresión de BirA, en una cantidad de entre 1 y 10 ng. Se encontró que la proporción entre proteína de fusión codificante de plásmido de ADN y plásmido de ADN codificante de BirA era óptima, siendo de aproximadamente 1.500:1. Se encontró que el nivel anteriormente indicado resultaba suficiente para la biotinilación cuantitativa de la proteína de fusión expresada. Se añadió D(+)-biotina a una concentración de entre 1 y 10 µM, preferentemente de aproximadamente 2 µM, a la mezcla de reacción.

El polipéptido de interés que debe biotinilarse específicamente debe contener, en el extremo N-terminal o C-terminal, una secuencia que resulta reconocida por la biotina proteína ligasa (una etiqueta de secuencia de sustrato de BirA). Tal como se ha mencionado anteriormente, dichas secuencias muestran una estructura común que preferentemente contiene el motivo de aminoácidos AMKM. Además, existen secuencias proteicas adicionales que no contienen dicha secuencia de consenso pero que también pueden biotinilarse con biotina proteína ligasas (Schatz P.J., Biotechnology 11:1138-1143, 1993). Dichas secuencias de biotinilación habitualmente presentan una longitud de aproximadamente menos de 50 aminoácidos, más preferentemente presentan una longitud de entre aproximadamente 10 y 20 aminoácidos. Se describen ejemplos en la patente US nº 6.265.552, preferentemente las secuencias 1 a 12 y 14 a 89 mencionadas en dicha patente. También se describen ejemplos de secuencias polipeptídicas que pueden biotinilarse enzimáticamente y de modo específico de sitio en Cronan J.E. Jr. *et al.*, J. Biol. Chem. 265:10327-10333, 1990, y en Samols D. *et al.*, J. Biol. Chem. 263:6461-6464, 1988, y se muestran ejemplos en SEC ID nº 1 a SEC ID nº 7. Se muestran ejemplos adicionales en las patentes US nº 5.723.584, nº 5.874.239 y nº 5.932.433.

Tras la expresión del polipéptido de fusión en el sistema libre de células, se produce la biotilación bajo condiciones de reacción estándares, preferentemente en 10 a 30 horas a una temperatura de entre 20°C y 36°C, más preferentemente a aproximadamente 30°C, y la mezcla de reacción, preferentemente tras la diálisis, para la concentración e intercambio de tampones, se centrifuga.

5 En una realización preferente de la invención, la solución se utiliza directamente, debido a su elevada pureza, para la inmovilización del polipéptido biotilado sobre las superficies que contienen avidina o estreptavidina inmovilizada (por ejemplo placas de microtitulación o biosensores) sin purificación adicional.

10 Según la invención resulta posible producir polipéptidos biotilados de alta pureza que pueden unirse a superficies en experimentos de unión a ligando, por ejemplo la espectroscopía de resonancia de plasmón superficial o los ensayos ELISA.

15 Sin embargo, en caso necesario los polipéptidos biotilados producidos según la presente invención pueden purificarse adicionalmente bajo condiciones nativas utilizando matrices que contienen avidina o estreptavidina (preferentemente monoméricas), o derivados de las mismas, inmovilizadas. Se ha descrito una diversidad de formas modificadas útiles físicamente (Kohanski R.A. y Lane M.D., *Methods Enzymol.* 194-200, 1990), químicamente (Morag E. *et al.*, *Anal. Biochem.* 243:257-263, 1996) y genéticamente (Sano T. y Cantor C.R., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:3180-3184, 1995) de avidina o estreptavidina que todavía se unen específicamente a biotina aunque con una afinidad menor, que facilitan un procedimiento de purificación en una etapa.

Los ejemplos, listado de secuencias y figuras siguientes se proporcionan para ayudar a comprender la presente invención, el alcance real de la cual se proporciona en las reivindicaciones adjuntas.

## 25 Descripción de las figuras

Figura 1 Comparación entre las proteínas de fusión biotiladas AviTag-PEX2 y PinPoint-PEX2. Se muestran dos transferencias western, en las que se detectó proteína biotilada con conjugado SA-POD en fracciones de elución de monómero-avidina-sefarosa. Panel izquierdo, AviTag-PEX2 en RTS 500: carril 1 - sobrenadante dializado y centrifugado de extracto del RTS 500 aplicado en la columna. Una segunda banda en la parte inferior de la banda diana indica degradación proteolítica. Carril 2 - lavado de columna. Carriles 3,4 y 5 - fracciones del pico de elución de biotina 5 mM. Panel derecho, PinPoint-PEX2 en *E. coli*: carril 1 - sobrenadante centrifugado de lisado celular de *E. coli* aplicado en la columna. Carril 2: lavado de columna. Carriles 3 a 8 - fracciones del pico de elución que contienen PinPoint-PEX2, en las que la co-concentración de un producto de degradación proteolítica de BCCP resulta evidente en los carriles 5 y 6 [3,16]. Carril 9 - fracciones de elución agrupadas tras la ultrafiltración.

Figura 2 Transferencia western con estreptavidina-POD que muestra la proteína de fusión AviTag-PEX2 biotilada. Se llevó a cabo la reacción de biotilación mediante coexpresión de BirA. A modo de control positivo se utilizó PEX2 químicamente biotilado. Los carriles 1 a 4 muestran lo siguiente:

- [1] 10 µg de pIVEX2.1MCS AviTag PEX2, biotina 2 µM, sin adición de pIVEX2-1MCSBirA
- [2] 330 ng de PEX2 químicamente biotilado, control positivo
- [3] 13ng de PEX2 químicamente biotilado, control positivo
- [4] 7 ng de PEX2 químicamente biotilado, control positivo no detectable
- [5] 10 µg de pIVEX2.1MCS AviTag PEX2, biotina 2 µM, 1 µg de pIVEX2.1MCSBirA
- [6] 10 µg de pIVEX2.1MCS AviTag PEX2, biotina 2 µM, 100 ng de pIVEX2.1MCSBirA
- [7] 10 µg de pIVEX2.1MCS AviTag PEX2, biotina 2 µM, 10ng de pIVEX2.1MCSBirA
- [8] 10 µg de pIVEX2.1MCS AviTag PEX2, biotina 2 µM, 1ng de pIVEX2.1MCSBirA

## Descripción de las secuencias

SEC ID nº 1	subunidad 1.3S de la transcarboxilasa de <i>Propionibacterium shermanii</i>
SEC ID nº 2	BCCP_ <i>E. coli</i>
55 SEC ID nº 3	Péptido de biotilación originado a partir de la subunidad 1.3S de transcarboxilasa
SEC ID nº 4	Péptido de biotilación AAW46671
SEC ID nº 5	Péptido de biotilación AAW46656
SEC ID nº 6	Péptido de biotilación AviTag
SEC ID nº 7	Péptido de biotilación PinPoint
60 SEC ID nº 8	Cebador
SEC ID nº 9	Cebador
SEC ID nº 10	Cebador

SEC ID nº 11    Cebador  
 SEC ID nº 12    Cebador  
 SEC ID nº 13    Cebador

## 5 Ejemplo 1

### Expresión *in vivo* de PinPoint-PEX2 en *E. coli* (comparación)

PEX2 es el dominio de tipo hemopoxina C-terminal no catalítico de MMP-2 (Brooks P.C. *et al.*, Cell 92:391-400, 1998).

10 El gen, codificante de PEX2, se amplificó mediante PCR utilizando el cebador de sentido 5'-ATA AGA ATA AGC TTC CTG AAA TCT GCA AAC AGG ATA TCG-3' (SEC ID nº 8) y el cebador antisentido 5'-ATA GTT TAG CGG CCG CTT ATC AGC CTA GCC AGT CG-3' (SEC ID nº 9). Se llevó a cabo una PCR en 30 ciclos con el perfil de temperaturas siguiente: 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 48°C y 1 minuto a 72°C. El producto de PCR se clonó en forma de fragmento NotI/HindIII en un vector de expresión *E. coli* inducible con IPTG. El plásmido se transformó en una cepa de *E. coli* que contenía el plásmido ayudante pUBS520 (Brinkmann U. *et al.*, Gene 85:109-114, 1989). Las células se cultivaron en medio LB que contenía biotina 2 µM, ampicilina 100 µg/ml y canamicina 50 µg/ml. Se utilizó un cultivo durante la noche para inocular 11 medios de la misma composición, que se incubaron bajo agitación vigorosa a 37°C. A DO<sub>595</sub>=0,5, se indujo la expresión con IPTG 1 mM durante 5 horas. Las células (2.500 g) se recolectaron mediante centrifugación. La pasta celular se resuspendió (5 ml/g de pasta celular) en TRIS 50 mM, pH 7,2, NaCl 20 mM, CaCl<sub>2</sub> 5 mM, lisozima 1 mg/ml, cóctel inhibidor de proteasa sin EDTA completo (Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Alemania) y posteriormente se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se llevó a cabo la lisis celular adicional mediante sonicación sobre hielo hasta que la suspensión dejó ser viscosa. El lisado crudo se centrifugó a 10.000 g durante 30 minutos a 4°C y se filtró el sobrenadante a través de un filtro de 25 0,22 µm.

## Ejemplo 2

### Expresión de AviTag-PEX2 en el sistema de expresión libre de células

30 El gen PEX2 se fusionó genéticamente con ADN codificante de AviTag mediante PCR "add-on" utilizando los cebadores 5'-GAAGGCATATGGGTCTGAACG-3' (SEC ID nº 10) (25 pmoles), 5'-CTCAGAAAATCGAATGGCAGCAAGCGACCCTGAAATCTGCAAACAGG-3' (SEC ID nº 11) (10 pmoles), 5'-GCCATTCGATTTTCTGAGCTTCGAAGATGTCTGTTCCAGACCCATATGCC-3' (SEC ID nº 12) (10 pmoles) y 5'-GCCGCTCGAGTCAGCAGCCTAGCCAGTCCG-3' (SEC ID nº 13) (25 pmoles).

Se llevó a cabo el programa de PCR tal como se ha indicado anteriormente. Se digirió el producto de PCR con NdeI y XhoI y se clonó en un plásmido de expresión *E. coli* (plásmido pIVEX 2.3MCS de Roche Diagnostics GmbH, <http://www.biochem.roche.com/RTS>) cortado previamente con los mismos enzimas de restricción. Se propagó el plásmido en *E. coli* y se aisló. Se añadieron 15 µg de ADN de plásmido (proporción 260 nm/280 nm > 1,8) y 12.500 unidades de holoenzima biotina-ligasa (~2,5 µg de biotina ligasa, EC 6.3.4.15; Avidity Inc., Denver, USA) a la mezcla de reacción (1 ml) de un sistema de expresión libre de células disponible comercialmente (RTS 500, Roche Diagnostics GmbH, DE (<http://www.biochem.roche.com/RTS>)). La actividad de biotina ligasa la define el fabricante como: 1 unidad es la cantidad de enzima que biotinila 1 pmol de sustrato péptido en 30 minutos a 30°C utilizando la mezcla de reacción que contiene sustrato péptido a una concentración de 38 µM. El sustrato utilizado en el ensayo enzimática era un variante 15-mera de la secuencia nº 85 identificada por Schatz P.J., Biotechnology 11:1138-1143, 1993. Se ajustó la concentración de biotina a 2 µM en la mezcla de reacción y solución de alimentación (12 ml). Se llevó a cabo la expresión de proteína en el incubador RTS 500 bajo agitación (130 rpm) durante 17 horas a 30°C. La solución de proteína seguidamente se dializó frente al tampón W2 (ver el Ejemplo 3) y se centrifugó a 10.000 g durante 30 minutos a 4°C.

Se preparó el lisado de *E. coli* según Zubay G., Ann. Rev. Genetics 7:267-287, 1973, y se dializó frente a un tampón que contenía HEPES-KOH 100 mM, pH 7,6/30°C, acetato de magnesio 14 mM, acetato potásico 60 mM y ditiotreitil 0,5 mM. El lisado liofilizado se solubilizó tal como se recomienda en el manual del sistema RTS500.

### Mezcla de reacción:

60 Acetato potásico 185 mM, acetato de magnesio 15 mM, glicerol al 4%, ATP 2,06 mM, CTP 1,02 mM, GTP 1,64 mM, UTP 1,02 mM, 257 µM de cada aminoácido (de la totalidad de los 20 aminoácidos naturales), ácido fólico 10,8 µg/ml, EDTA 1,03 mM, HEPES-KOH 100 mM, pH 7,6/30°C, rifampicina 1 µg/ml, azida sódica al 0,03%, fosfato de acetilo 40 mM, ARNt 480 µg/ml de *E. coli* MRE600, ditiotreitil 2 mM, ácido mercapto-etanosulfónico 10 mM, KOH 70 mM, 0,1 U/µl de inhibidor de ARNasa, plásmido 15 µg/ml, lisado de *E. coli* A19 220 µl/ml, ARN polimerasa de T7 2 U/µl.

**Solución de alimentación:**

Acetato potásico 185 mM, acetato de magnesio 15 mM, glicerol al 4%, ATP 2,06 mM, CTP 1,02 mM, GTP 1,64 mM, UTP 1,02 mM, 257  $\mu$ M de cada aminoácido (de la totalidad de los 20 aminoácidos naturales), ácido fólico 10,8  $\mu$ g/ml, EDTA 1,03 mM, HEPES-KOH 100 mM, pH 7,5/30°C, rifampicina 1  $\mu$ g/ml, azida sódica al 0,03%, fosfato de acetilo 40 mM, ditiotreitolo 2 mM, ácido mercapto-etanosulfónico 10 mM, KOH 70 mM.

**Ejemplo 3****10 Purificación y cuantificación****Purificación de proteínas de fusión biotiniladas:**

Se introdujo 1 ml de resina de avidina monomérica-sefarosa (SoftLink, Promega, Madison, USA) en una columna Pharmacia HR-5. Tras lavar la columna con 10 CV de tampón W1 (TRIS 50 mM, pH 7,2, NaCl 20 mM) y 10 CV de tampón W2 (W1 + CaCl<sub>2</sub> 5 mM), se aplicó el extracto celular según el Ejemplo 1 ó la solución de producto según el Ejemplo 2 a un caudal de 0,1 ml/minuto. Se realizó el lavado con tampón W2 hasta que ya no podía detectarse más proteína en el eluido de la columna. Para eluir la proteína biotinilada, se aplicó tampón W2 + biotina 5 mM. El pico de proteína eluida se separó en fracciones de 0,5 ml. Las fracciones, que contenían proteína diana biotinilada, se agruparon, y se eliminó la biotina libre mediante ultrafiltración con tampón W2.

**Detección y cuantificación de las proteínas de fusión:**

Las fracciones de proteína solubles e insolubles se resolvieron mediante SDS-PAGE (gel de Bis-TRIS-SDS-poliacrilamida al 10%) y se tiñeron con azul brillante de Coomassie o se transfirieron a una membrana de PVDF mediante la utilización de un aparato Multiphor II semiseco (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia) durante 70 minutos a 120 V y a temperatura ambiente. Tras completar la transferencia, la membrana se bloqueó en PBS más Tween-20 al 0,2% (PBS-Tween) y leche seca en polvo al 5% (p/v) con agitación suave a 4°C. Se detectó el PEX2 unido a la membrana de PVDF con un anticuerpo específico de PEX2. La solución madre de anticuerpo era de anticuerpo IgG policlonal de conejo anti-PEX2 1,47 mg/ml, dirigido contra la molécula completa. Se incubó la membrana durante 1 hora a temperatura ambiente en PBS-Tween, leche seca en polvo al 2,5% (p/v), que contenía antisuero de PEX2 (1:50.000 v/v) seguido de tres lavados de diez minutos. La membrana se incubó durante 1 hora en PBS-Tween + leche seca en polvo al 2,5% (p/v) con conjugado IgG anti-ratón/anti-conejo-POD 1:50.000 (Roche Diagnostics GmbH, DE) seguido de tres lavados de diez minutos en PBS-Tween. La transferencia western se reveló con el kit de transferencia western quimioluminiscente (ratón/conejo, Roche Diagnostics GmbH, DE).

Tras la detección densitométrica de la proteína PEX2, la membrana se regeneró durante 10 minutos en NaOH 0,1 M y posteriormente se lavó 3 x 10 minutos en PBS-Tween. La membrana se bloqueó y se lavó nuevamente tal como se ha indicado anteriormente. La detección de la proteína de fusión biotinilada se llevó a cabo mediante la incubación de la membrana regenerada en una dilución 1:4.000 (v/v) de conjugado de estreptavidina-POD (Roche Diagnostics GmbH, DE) en tampón PBS-Tween + leche seca en polvo al 2,5% (p/v) durante 1 hora. Tras el lavado de la membrana tres veces durante 10 minutos con PBS-Tween, se reveló nuevamente la transferencia western. Se determinaron los niveles de biotinilación de las proteínas de fusión de PEX2 mediante la comparación de los datos densitométricos de las dos etapas de detección.

La cuantificación densitométrica de las bandas de proteína detectadas se llevó a cabo mediante calibración utilizando cantidades verificadas de PEX2 recombinante químicamente biotinilada y el software ImageMaster 1D Prime ID Elite (Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg, DE).

**50 Espectroscopía de resonancia de plasmón:**

Se midió la actividad de las proteínas de fusión de PEX2 biotiniladas utilizando la espectroscopía de plasmón (tecnología BIACore 3000, BIACore AB, Uppsala, SE). El sistema operaba con tampón HBS-P. Las proteínas de fusión de PEX2 se inmovilizaron en chips BIACore-SA recubiertos con estreptavidina del modo recomendado por el fabricante. Se utilizaron varias etapas de dilución de una solución madre de TIMP2 200 nM (Yu A.E. *et al.*, Biochem. Cell Biol. 74:823-831, 1996) (0,33 mg/ml en tampón 1xPBS) en tampón HBS-P para medir los datos cinéticos siguiendo las instrucciones del fabricante. Se eluyó TIMP2 del chip con tampón de elución suave Ag/Ab ImmunoPure (PIERCE).

**60 Ejemplo 4****Análisis de la pureza**

**a) PinPoint-PEX2 biotinilado en *E. coli* (comparación)**

Se expresó PEX2, fusionado N-terminalmente con la etiqueta PinPoint, y se biotiniló específicamente *in vivo* en *E. coli* según el Ejemplo 1. La proteína de fusión presentaba una masa molecular calculada de 36 kDa. Se confirmó la identidad de la proteína mediante degradación Edman N-terminal. La recolección de 11 cultivos de fermentación resultó en 6 gramos de masa bacteriana húmeda. Se determinó un rendimiento total de 0,4 mg de proteína de fusión por cada gramo de pasta celular mediante la cuantificación densitométrica de transferencias western llevadas a cabo con anticuerpos específicos de PEX2. Se enriqueció hasta aproximadamente 10% de proteína diana en el sobrenadante del lisado celular clarificado. La cuantificación del rendimiento de biotinilación se llevó a cabo comparando los datos densitométricos tal como se describe en la sección de materiales y métodos. Mediante la utilización de conjugado de estreptavidina-POD (peroxidasa) en un ensayo colorimétrico, no pudo detectarse ninguna otra proteína biotinilada en el lisado celular crudo, mientras que la cromatografía de afinidad de avidina monomérica enriqueció una segunda proteína biotinilada en las fracciones eluidas. El análisis posterior del eluido utilizando conjugado de estreptavidina-POD reveló dos bandas de proteínas. La primera banda, con una masa aproximada de 40 kDa era la proteína de fusión biotinilada deseada PinPoint-PEX2. La segunda proteína, con un tamaño de aproximadamente 16 kDa era BCCP, la única proteína biotinilada presente en *E. coli*. La contaminación por esta segunda proteína biotinilada suponía hasta el 50% del rendimiento total. Se agruparon las fracciones de elución que contenían PinPoint-PEX2. Se eliminó el exceso de biotina libre mediante ultrafiltración. Se analizaron dos muestras de diferente grado de pureza mediante espectroscopía de resonancia de plasmón utilizando tecnología BIAcore. Se indica la actividad de un ligando inmovilizado a partir de la capacidad máxima de unión al analito. En primer lugar, se analizó la actividad del conjugado parcialmente purificado de proteína. Se inmovilizaron 380 RU de PinPoint-PEX2 (ligando) en un chip BIAcore SA. La saturación del ligando proteína en la superficie de los chips con TIMP2 (analito) alcanzó una  $R_{max}=61$  RU. Basándose en estos datos, se calculó una actividad de unión de ligando de 26%. En un segundo análisis, se inmovilizaron 664 RU de biotinil-proteína mediante la inyección del sobrenadante del lisado celular dializado y clarificado en la celda de flujo. La saturación del analito TIMP2 se alcanzó en 61 RU $_{max}$  y la actividad de unión de ligando calculada era de 15%. Para ambos casos se determinaron los datos cinéticos de la interacción TIMP2/PinPoint-PEX2. Se estimó una constante de equilibrio de  $K_D=1,5 \times 10^{-10}$  M utilizando un modelo de simulación de Langmuir de formación de un complejo binario.

**b) AviTag-PEX2 biotinilado (invención)**

Se expresó PEX2, fusionado N-terminalmente con la secuencia aceptora de AviTag-biotina, y se biotiniló *in vitro* en el RTS 500 según el Ejemplo 2. Se facilitó la biotinilación mediante la adición de 12.500 unidades de enzima BirA a la mezcla de reacción. La proteína de fusión expresada presentaba una masa molecular de 25 kDa y se detectó mediante transferencia western utilizando el anticuerpo específico de PEX2 y el conjugado de estreptavidina-POD. En comparación con un estándar de peso molecular, la proteína de fusión mostraba una masa aparente de 25 kDa en un Bis-Tris SDS-PAGE al 10%. La cuantificación densitométrica mostró un rendimiento total de 72  $\mu$ g de AviTag-PEX2 por mililitro de extracto del RTS 500. La proporción de proteína de fusión soluble era 50% del rendimiento total. Se analizó el grado de biotinilación tal como se describe en la sección de materiales y métodos, y se encontró que era cuantitativa. La detección de la proteína biotinilada con conjugado de estreptavidina-POD no mostró ninguna otra proteína biotinilada en el extracto. Tras el procedimiento de purificación por afinidad utilizando avidina monomérica, únicamente se detectó proteína de fusión biotinilada AviTag-PEX2 en las fracciones de elución. Se confirmó la identidad de la proteína de fusión mediante degradación N-terminal (Edman). Se analizó la proteína de fusión AviTag-PEX2 purificada, así como sobrenadante procedente de extracto del RTS 500 dializado y clarificado, mediante espectroscopía de resonancia de plasmón superficial. Se unieron 105 RU de proteína de fusión AviTag-PEX2 purificada a un chip BIAcore SA. Se alcanzó la saturación del ligando AviTag-PEX2 inmovilizado con el analito TIMP2 a un nivel de 64 RU $_{max}$ . De esta manera, pudo detectarse una capacidad de unión de analito del 70% (en comparación con 26% según el Ejemplo comparativo 4a). Tras la inyección de sobrenadante clarificado del extracto procedente del RTS 500, se inmovilizaron 732 RU de proteína biotinilada sobre la superficie de los chips SA. En  $R_{max}$ , se unieron 341 RU de TIMP2, lo que es un nivel similar a la capacidad de unión de analito del 53% (en comparación con 15% según el Ejemplo comparativo 4a). Se analizó la cinética, proporcionando una constante de equilibrio de la interacción de TIMP2 con PEX2 de  $K_D=1,5 \times 10^{-10}$  M. Se determinó la  $K_D$  utilizando el modelo numérico indicado anteriormente.

**Ejemplo 5****Biotinilación de AviTag-PEX2 mediante coexpresión de BirA en el RTS 500****Materiales y métodos:**

Se prepararon cinco reacciones en el RTS 500 siguiendo las instrucciones del fabricante. Se ajustó la D-biotina a 2  $\mu$ M en cada reacción. Se añadieron 10  $\mu$ g de pIVEX2.3MCS que contenía ADN codificante de AviTag-PEX2

(proporción 260 nm/280 nm >1,8) a cada mezcla de reacción. En lugar de una suplementación con BirA recombinante, tal como se describe en el Ejemplo 2, se añadió pIVEX2.3MCS que contenía ADN codificante de BirA en cantidades variables (1 µg, 100 ng, 10 ng, 1 ng, 0 ng, proporción 260 nm/280 nm >1,8) a las cámaras de reacción. Durante la expresión proteica, la proteína de fusión AviTag-PEX2 y BirA se expresaron simultáneamente. La coexpresión se llevó a cabo (Roche Diagnostics GmbH) bajo agitación (130 rpm) durante 17 horas a 30°C. Los lisados del RTS se centrifugaron a 10.000 g durante 10 minutos. Se analizó el sobrenadante de cada reacción para proteína de fusión AviTag-PEX2 biotinilada utilizando la transferencia western de estreptavidina-POD tal como se describe en el Ejemplo 3.

## 10 Resultados:

Sin suplementación de plásmido de ADN pIVEX2.3MCSBirA, no pudo detectarse proteína de fusión AviTag-PEX2 biotinilada en la transferencia western con estreptavidina-POD (fig. 2, carril [1]), mientras que la adición de pIVEX2.3MCSBirA mostró un producto AviTag-PEX2 biotinilado (carriles [5,6,7,8]). Un nanograma de plásmido de ADN pIVEX2.3MCSBirA insertado en el sistema es suficiente ADN de plásmido para coexpresar cantidades suficientes de BirA activo con el fin de biotinyilar cuantitativamente la proteína de fusión AviTag-PEX2.

## Lista de referencias

- 20 Altman, J.D., et al., *Science* 274 (1996) 94-96  
 Brinkmann, U., et al., *Gene* 85 (1989) 109-114  
 Brooks, P.C., et al., *Cell* 92 (1998) 391-400  
 Chapman-Smith, A., y Cronan, J.E., Jr., *J. Nutr.* 129, 2S Suppl., (1999) 477S-484S  
 Cronan, J.E., Jr., *Cell* 58 (1989) 427-429
- 25 Cronan, J.E., Jr., et al., *J. Biol. Chem.* 265 (1990) 10327-10333  
 Patente EP nº 0 932 664  
 Fresno, M., et al., *Eur. J. Biochem.* 68 (1976) 355-364  
 Kohanski, R.A. y Lane, M.D. (1990) *Methods Enzymol.* 194-200  
 Morag, E., et al., *Anal. Biochem.* 243 (1996) 257-263
- 30 Parrott, M.B., y Barry, M.A., *Biochem. Biophys. Res. Communications* 281 (2001) 993-1000  
 Pelham, H.R., y Jackson, R.J., *Eur. J. Biochem.* 67 (1976) 247-256  
 Pratt et al., *Transcription and Translation: A Practical Approach*, Hames y Higgins (editores), páginas 179 a 209, IRL Press, 1984  
 Pratt, J.M., et al., *Nucleic Acids Research* 9 (1981) 4459-4479
- 35 Samols, D., et al., *J. Biol. Chem.* 263 (1988) 6461-6464  
 Sano, T., y Cantor, C.R., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92 (1995) 3180-3184  
 Saviranta, P., et al., *Bioconjug. Chem.* 9 (1998) 725-735  
 Schatz, P.J., *Biotechnology* 11 (1993) 1138-1143  
 Skup, D., y Millward, S., *Nucleic Acids Research* 4 (1977) 3581-3587
- 40 Spirin, A.S., et al., *Science* 242 (1988) 1162-1164  
 Tsao, K.-L., et al., *Gene* 169 (1996) 59-64  
 Patente US nº 5,478,730  
 Patente US nº 5,571,690  
 Patente US nº 5,723,584
- 45 Patente US nº 5,874,239  
 Patente US nº 5,932,433  
 Patente US nº 6,265,552  
 Patente WO Nº 00/55353  
 Patente WO Nº 00/58493
- 50 Patente WO Nº 95/04069  
 Patente WO Nº 98/31827  
 Patente WO Nº 99/37785  
 Patente WO Nº 99/50436  
 Yu, A.E., et al., *Biochem. Cell Biol.* 74 (1996) 823-831
- 55 Zubay, G., *Ann. Rev. Genetics* 7 (1973) 267-287

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> F.HOFFMANN-LA ROCHE AG

5 <120> Método mejorado de biotinilación específica de secuencia

<130> 20984

<140>

10 <141>

<150> EP01122554.7

<151> 2001-09-25

15 <150> EP01129681.1

<151> 2001-12-13

<160> 13

20 <170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 123

<212> PRT

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: subunidad 1.3S de transcarboxilasa de *Propionibacterium shermanii*

<400> 1

```

Met Lys Leu Lys Val Thr Val Asn Gly Thr Ala Tyr Asp Val Asp Val
 1          5          10          15
Asp Val Asp Lys Ser His Glu Asn Pro Met Gly Thr Ile Leu Phe Gly
          20          25          30
Gly Gly Thr Gly Gly Ala Pro Ala Pro Arg Ala Ala Gly Gly Ala Gly
          35          40          45
Ala Gly Lys Ala Gly Glu Gly Glu Ile Pro Ala Pro Leu Ala Gly Thr
          50          55          60
Val Ser Lys Ile Leu Val Lys Glu Gly Asp Thr Val Lys Ala Gly Gln
          65          70          75          80
Thr Val Leu Val Leu Glu Ala Met Lys Met Glu Thr Glu Ile Asn Ala
          85          90          95
Pro Thr Asp Gly Lys Val Glu Lys Val Leu Val Lys Glu Arg Asp Ala
          100          105          110
Val Gln Gly Gly Gln Gly Leu Ile Lys Ile Gly
          115          120

```

30 <210> 2

<211> 156

<212> PRT

<213> *Escherichia coli*

35 <400> 2

ES 2 372 029 T3

Met Asp Ile Arg Lys Ile Lys Lys Leu Ile Glu Leu Val Glu Glu Ser  
 1 5 10 15  
 Gly Ile Ser Glu Leu Glu Ile Ser Glu Gly Glu Glu Ser Val Arg Ile  
 20 25 30  
 Ser Arg Ala Ala Pro Ala Ala Ser Phe Pro Val Met Gln Gln Ala Tyr  
 35 40 45  
 Ala Ala Pro Met Met Gln Gln Pro Ala Gln Ser Asn Ala Ala Ala Pro  
 50 55 60  
 Ala Thr Val Pro Ser Met Glu Ala Pro Ala Ala Ala Glu Ile Ser Gly  
 65 70 75 80  
 His Ile Val Arg Ser Pro Met Val Gly Thr Phe Tyr Arg Thr Pro Ser  
 85 90 95  
 Pro Asp Ala Lys Ala Phe Ile Glu Val Gly Gln Lys Val Asn Val Gly  
 100 105 110  
 Asp Thr Leu Cys Ile Val Glu Ala Met Lys Met Met Asn Gln Ile Glu  
 115 120 125  
 Ala Asp Lys Ser Gly Thr Val Lys Ala Ile Leu Val Glu Ser Gly Gln  
 130 135 140  
 Pro Val Glu Phe Asp Glu Pro Leu Val Val Ile Glu  
 145 150 155

<210> 3

<211> 22

<212> PRT

5 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido de biotilación originado a partir de la subunidad 1.3S de la transcarboxilasa de *Propionibacterium shermanii*

10

<400> 3

Gly Gln Thr Val Leu Val Leu Glu Ala Met Lys Met Glu Thr Glu Ile  
 1 5 10 15

Asn Ala Pro Thr Asp Gly  
 20

<210> 4

<211> 21

15 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido de biotilación AAW46671

20

<400> 4

Asp Glu Glu Leu Asn Gln Ile Phe Glu Ala Met Lys Met Tyr Pro Leu  
 1 5 10 15

Val His Val Thr Lys  
 20

<210> 5  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido de biotilación AAW46656

<400> 5  
 Leu Leu Arg Thr Phe Glu Ala Met Lys Met Asp Trp Arg Asn Gly  
 1 5 10 15

10

<210> 6  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

15

<220>  
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido de biotilación AviTag

<400> 6  
 Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Glu  
 1 5 10 15

20

<210> 7  
 <211> 133  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

25

<220>  
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido de biotilación PinPoint

<400> 7  
 Met Lys Leu Lys Val Thr Val Asn Gly Thr Ala Tyr Asp Val Asp Val  
 1 5 10 15  
 Asp Val Asp Lys Ser His Glu Asn Pro Met Gly Thr Ile Leu Phe Gly  
 20 25 30  
 Gly Gly Thr Gly Gly Ala Pro Ala Pro Ala Ala Gly Gly Ala Gly Ala  
 35 40 45  
 Gly Lys Ala Gly Glu Gly Glu Ile Pro Ala Pro Leu Ala Gly Thr Val  
 50 55 60  
 Ser Lys Ile Leu Val Lys Glu Gly Asp Thr Val Lys Ala Gly Gln Thr  
 65 70 75 80  
 Val Leu Val Leu Glu Ala Met Lys Met Glu Thr Glu Ile Asn Ala Pro  
 85 90 95  
 Thr Asp Gly Lys Val Glu Lys Val Leu Val Lys Glu Arg Asp Ala Val  
 100 105 110  
 Gln Gly Gly Gln Gly Leu Ile Lys Ile Gly Asp Leu Glu Leu Ile Glu  
 115 120 125  
 Gly Arg Glu Lys Leu  
 130

30

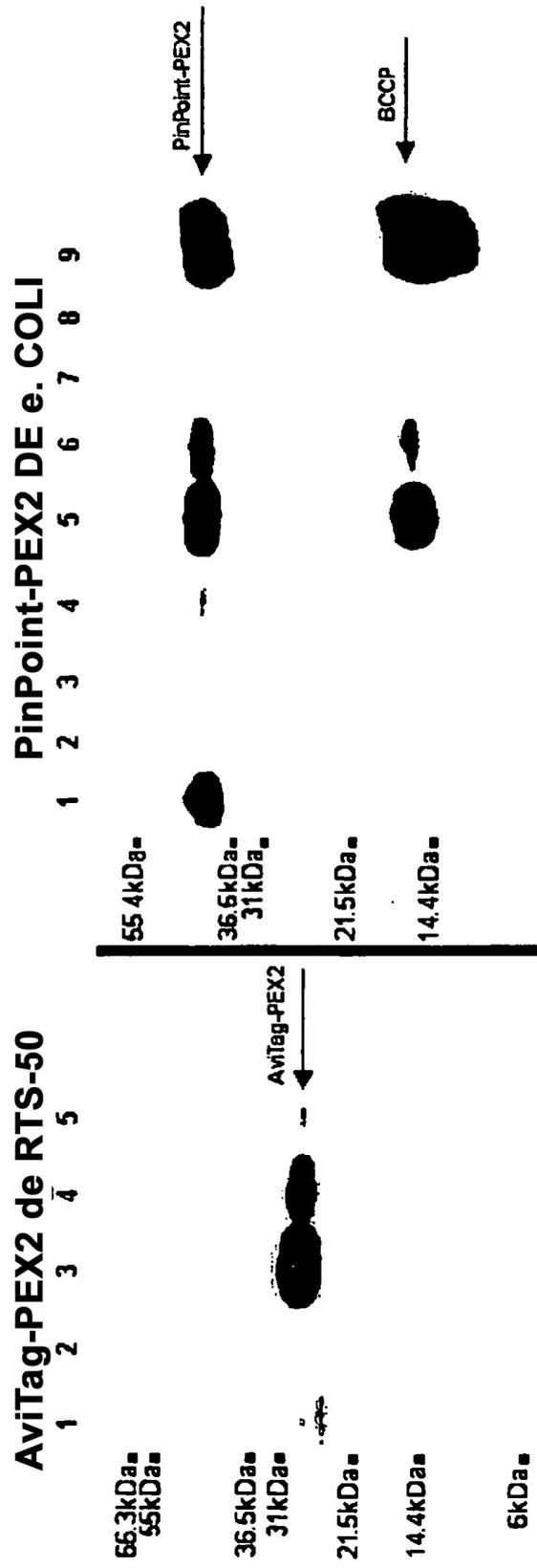
<210> 8  
 <211> 39

<212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 5 <223> Descripción de secuencia artificial: cebador  
  
 <400> 8  
 ataagaataa gcttctgaa atctgcaaac aggatatcg 39  
  
 10 <210> 9  
 <211> 35  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 15 <220>  
 <223> Descripción de secuencia artificial: cebador  
  
 <400> 9  
 atagtttagc ggccgcttat cagcctagcc agtcg 35  
 20  
 <210> 10  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 25  
 <220>  
 <223> Descripción de secuencia artificial: cebador  
  
 <400> 10  
 30 gaaggcatat ggtctgaac g 21  
  
 <210> 11  
 <211> 47  
 <212> ADN  
 35 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Descripción de secuencia artificial: cebador  
  
 <400> 11  
 40 ctcagaaaat cgaatggcac gaagcgaccc tgaatctgc aaacagg 47  
  
 <210> 12  
 <211> 48  
 45 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Descripción de secuencia artificial: cebador  
 50  
 <400> 12 gccattcgat tttctgagct tcgaagatgt cgttcagacc catatgcc 48  
  
 <210> 13  
 <211> 30  
 55 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Descripción de secuencia artificial: cebador  
 60  
 <400> 13  
 gccgctcgag tcagcagcct agccagtcgg 30

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Método para preparar un polipéptido biotinilado en una mezcla de reacción de síntesis peptídica libre de células que contiene ribosomas, ARNt, ATP, GTP, nucleótidos, aminoácidos y BirA en forma de ácido nucleico, **caracterizado porque:**
- 10 a) el ácido nucleico se expresa para formar dicho polipéptido que contiene una secuencia de sustrato de holocarboxilasa sintetasa (BirA) etiquetada en el extremo N-terminal o C-terminal, y BirA en forma de ácido nucleico se expresa en dicha mezcla de reacción, proporcionando el polipéptido BirA;
- b) dicho polipéptido se biotinila en presencia de biotina y BirA,
- c) dicho polipéptido biotinilado se aísla a partir de dicha mezcla, o dicha mezcla se incuba con avidina o estreptavidina inmovilizada bajo condiciones en las que dicho polipéptido biotinilado se une a dicha avidina o estreptavidina inmovilizada.
- 15 2. Método según la reivindicación 1, **caracterizado porque** la proporción de ADN codificante de polipéptido y ADN codificante de BirA es de 1.500:1,50.

**Fig. 1**



**Fig. 2**

