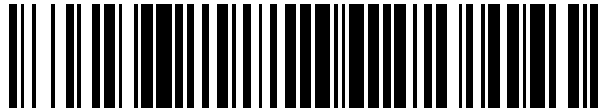


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 414 605**

51 Int. Cl.:

C07K 14/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.10.2005 E 05793770 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.03.2013 EP 1675623**

54 Título: **Conjugados de ubiquitina o de gamma cristalinas para la utilización en la terapia, el diagnóstico y la cromatografía**

30 Prioridad:

11.10.2004 DE 102004049479

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

22.07.2013

73 Titular/es:

**SCIL PROTEINS GMBH (100.0%)
HEINRICH-DAMEROW-STRASSE 1
06120 HALLE/SAALE, DE**

72 Inventor/es:

**FIEDLER, ERIK;
EBERSBACH, HILMAR;
HEY, THOMAS y
FIEDLER, ULRIKE**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 414 605 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

Conjugados de ubiquitina o de gamma cristalinas para la utilización en la terapia, el diagnóstico y la cromatografía

5 El presente invento se refiere a un procedimiento para la preparación de un conjugado que comprende una o varias moléculas polipeptídicas basadas en la ubiquitina humana y una o varias partes componentes funcionales.

10 El documento de solicitud de patente internacional WO 01/04144 A divulga unos conjugados de una proteína con una estructura de lámina plegada beta (mutante gamma cristalina), que se fija a estradiol. En particular, se describe la fusión terminal de mutantes gamma cristalinas con diversas moléculas, a saber con una marca E, con la proteína de recubrimiento minoritaria 3 así como con una marca His.

15 El documento WO 01/04144 A describe además el proceso de modificar unas proteínas estables de lámina plegada beta mediante una mutagénesis específica para un sitio en la lámina plegada beta junto a la superficie, de tal manera que a partir de la proteína no fijadora resulte una proteína con unas específicas propiedades de fijación.

20 La ubiquitina humana encuentra utilización como una proteína de entramado (en inglés scaffold) para la generación de unas moléculas fijadoras alternativas. La ubiquitina es una proteína pequeña, monomérica y citosólica, que se presenta - grandemente conservada en su secuencia - en todas las células eucarióticas conocidas, desde las de los protozoos hasta de los vertebrados. Ella desempeña en el organismo un cometido fundamental en el caso de la regulación de la degradación controlada de las proteínas propias de la célula.

25 La cadena polipeptídica de la ubiquitina se compone de 76 aminoácidos, que están plegados en una estructura alfa/beta extremadamente compacta (Vijay-Kumar, 1987): Casi un 87 % de la cadena polipeptídica participa por medio de puentes de hidrógeno en la formación de los elementos estructurales secundarios. Como estructuras secundarias prominentes pueden ser válidos tres arrollamientos y medio en forma de hélice alfa así como una lámina plegada beta antiparalela, que se compone de cinco cadenas. La disposición característica de estos elementos - una lámina plegada beta antiparalela, expuesta hacia la superficie de la proteína, que es cubierta por su lado posterior por una hélice alfa que se sitúa verticalmente por encima de ésta - es válida por lo general como un denominado motivo de plegamiento del tipo del de la ubiquitina. Otra característica de la estructura es una pronunciada región hidrófoba en el interior de la proteína entre la hélice alfa y la lámina plegada beta.

35 La producción artificial de la ubiquitina es posible, debido a su pequeño tamaño, tanto mediante una síntesis química así como también mediante procedimientos biotecnológicos. A causa de las favorables propiedades de plegamiento, la ubiquitina puede ser producida en el caso de la obtención por tecnología genética con ayuda de unos microorganismos tales como p.ej. E. coli en unas cantidades relativamente grandes facultativamente en el citosol o en el recinto periplasmático.

40 La sencilla y eficaz producción bacteriana hace posible la utilización de la ubiquitina como un partícipe en una fusión para otras proteínas ajenas que deben de ser producidas, cuya producción es problemática. Mediante la fusión con la ubiquitina se puede conseguir una solubilidad mejorada y por consiguiente un rendimiento mejorado (Butt y colaboradores, 1989).

45 Partiendo de los datos existentes presentes de estructuras cristalinas (registro en el banco de datos PDB: 1UBI), mediante un análisis apoyado por ordenadores se pudieron localizar las posiciones de tales aminoácidos en el entramado proteínico de la ubiquitina, cuyas cadenas laterales están expuestas sobre la superficie, es decir que están orientadas hacia el disolvente o un potencial partícipe en la fijación. Las posiciones escogidas se encuentran en una proximidad espacial entre ellas junto al comienzo de la primera cadena terminal de la lámina plegada beta (las posiciones 2, 4, 6) así como en el bucle (en inglés loop) (las posiciones 62, 63) o respectivamente junto al comienzo de la cadena terminal de carboxi de la lámina plegada beta (las posiciones 64, 65, 66) y forman con sus cadenas laterales de aminoácidos una región coherente sobre la superficie de la ubiquitina. Mediante unas sustituciones aleatorias de aminoácidos en la región analizada, se generó así una región hipervariable, expuesta sobre la superficie, en la estructura proteínica de la ubiquitina que sigue estando intacta (véase el documento de patente PCT europea PCT/EP2004/005730, no publicado).

55 La generación de una superficie artificial de fijación sobre una proteína de lámina plegada beta constituye una nueva e interesante alternativa a los anticuerpos habituales. Se pudo aportar la demostración de que un nuevo sitio de fijación generado artificialmente sobre la superficie de unas proteínas gamma cristalinas o similares a la ubiquitina conduce a unas moléculas fijadoras capaces de funcionar (véase el documento de solicitud de patente alemana DE 19932688 A1) (véase el documento PCT/EP2004/005730, no publicado).

60 Sin embargo hasta ahora faltaba cualquier incitación o mención acerca de la posibilidad de acoplar estas moléculas polipeptídicas a un componente adicional para la formación de un conjugado, con el fin de hacerlas útiles para usos diagnósticos, terapéuticos y analíticos, sin sufrir en este caso una pérdida de función de uno de los dos componentes o de ambos.

65

El presente invento se basa por consiguiente en la misión de poner a disposición un procedimiento para la producción de un conjugado a base de un polipéptido basado en la ubiquitina y de un componente funcional, teniendo la respectiva molécula polipeptídica una propiedad de fijación modificada en comparación con el polipéptido de tipo silvestre para la fijación específica a un ligando, realizándose que ambos componentes del conjugado, después de su acoplamiento uno a otro, conservan su funcionalidad o ésta es incluso aumentada por el acoplamiento.

El problema planteado por esta misión se resuelve mediante el objeto de las reivindicaciones independientes. Unas formas preferidas de realización se establecen a partir de las reivindicaciones dependientes de ellas.

El presente invento se refiere al acoplamiento no dirigido, específico para un sitio y selectivo, de unas nuevas proteínas fijadoras, que se basan en la ubiquitina, a las más diversas moléculas, tales como p.ej. unas proteínas (proteínas de cromóforos y enzimas), unas matrices (p.ej. de dextrano, un polimetacrilato, una agarosa, un Sepharose, derivados de un poliestireno y una celulosa) y unas moléculas pequeñas (por ejemplo, marcadores de fluorescencia, biotina, digoxigenina, radioisótopos, antibióticos, entre otros). Estas moléculas, denominadas AffilinTM tienen en común el diseño "de novo" de una región de fijación en las estructuras de lámina plegada beta de las proteínas. Por consiguiente, ellas se diferencian de la clase más prominente de proteínas de fijación en la naturaleza, la de los anticuerpos, en los que la región de fijación está localizada en unas regiones flexibles de bucle (las CDR's, acrónimo de Complementary Determining Regions = regiones determinantes de complementariedad) de la proteína. Otra diferencia entre las AffilinTM y los anticuerpos es el tamaño de las moléculas. Los polipéptidos empleados como base para el primer componente del conjugado conforme al invento poseen un peso molecular de 10 kDa (la ubiquitina), y los anticuerpos poseen un peso molecular de 150 kDa (la IgG).

El presente invento abarca un procedimiento para la preparación de unos conjugados a base de estos polipéptidos y de los correspondientes participantes en el acoplamiento. Además, se ha descrito su empleo en diversos usos y se ha puesto de manifiesto sorprendentemente que estos métodos de acoplamiento no conducen ni a la pérdida de la actividad biológica del participante en el acoplamiento ni a la pérdida de las propiedades de fijación de los polipéptidos a sus ligandos.

A modo de ejemplo para el invento, se describen el acoplamiento de los componentes polipeptídicos a una matriz de dextrano en el sistema BIACORE, el acoplamiento al colorante fluorescente Oyster®556, a la proteína de cromóforo ficoeritrina (PE) y a la enzima peroxidasa de rábano rústico, así como la inmovilización de un polipéptido a un material de soporte para la utilización en la cromatografía por afinidad. Conforme al invento, los acoplamientos se realizaron en este caso o bien directamente a la molécula polipeptídica, p.ej. a unas cadenas laterales nucleófilas de las proteínas, o de un modo dirigido a un objetivo, a unos engarzadores peptídicos en el extremo terminal de C. Sorprendentemente, los métodos de acoplamiento eran transferibles a ambos entramados, y no condujeron a ningún perjuicio de las propiedades de fijación de estas moléculas. Precisamente no se podía esperar el acoplamiento de las relativamente pequeñas moléculas polipeptídicas (de 10 kDa) con unas proteínas grandes tales como p.ej. una ficoeritrina (de 240 kDa), con una simultánea conservación de la actividad de fijación.

Los conjugados obtenidos de esta manera, sorprendentemente no restringen la capacidad de fijación de las moléculas AffilinTM, sino que más bien, en el caso de determinados conjugados se pudo observar un aumento de la constante macroscópica de disociación (efecto de avidéz), lo que ofrece otras posibilidades para el empleo de las moléculas polipeptídicas, p.ej., en la terapia. Además de ello, se puso de manifiesto que estas moléculas polipeptídicas muestran una actividad de fijación también después de un acoplamiento a unas matrices insolubles en agua, y que son regenerables después de un tratamiento con agentes desnaturalizantes tales como urea, guanidinio, etanol, lejía de sosa o ácido clorhídrico, es decir que sus propiedades de fijación pueden ser restablecidas. Mediante un análisis detallado de los datos de estructuras de unas moléculas basadas en la ubiquitina, se ofreció la posibilidad de estructurar de manera selectiva el acoplamiento inespecífico, mediante el recurso de que se seleccionan deliberadamente unos restos de lisina. El análisis estructural mostró que las lisinas se encuentran, en el caso de la gamma cristalina, en el dominio del extremo terminal de C de la proteína y que por ello deberían ser adecuadas para un acoplamiento (véase la Figura 1). También en el caso de la ubiquitina se consiguió la identificación de tales restos de lisina. No obstante, para tales estrategias de acoplamiento se debe de asegurar que en la región de fijación no se encuentre ninguna otra lisina.

Para el presente invento, a partir de la biblioteca de ubiquitina humana (UB10) se seleccionó un polipéptido fijador de NGF y a continuación se purificó. Mediante la introducción de un engarzador peptídico especial en el extremo terminal de C con una longitud definida, inclusive una cisteína, se consiguió modificar las moléculas polipeptídicas de tal manera que se obtuviese un acoplamiento selectivo sin ningún perjuicio de la actividad de fijación. Para un acoplamiento eficaz es necesario eliminar todas las cisteínas accesibles restantes. En el caso del método de acoplamiento inespecífico de las moléculas polipeptídicas se consiguió sorprendentemente tanto conservar la actividad de fijación de los polipéptidos como, además de esto, conseguir un aumento de la afinidad mediante avidéz, y por consiguiente preparar un conjugado muy atractivo de moléculas basado en polipéptidos para el diagnóstico y la terapia.

Tales moléculas alternativas de fijación se pueden emplear universalmente en la terapia, el diagnóstico y la cromatografía. Mediante el acoplamiento de unos polipéptidos a los más diversos partícipes, se abre un sector de empleo todavía más amplio para estas nuevas moléculas de fijación.

5 El presente invento abarca los/las siguientes aspectos y formas de realización:

De acuerdo con un primer aspecto, el presente invento se refiere a un procedimiento para la preparación de un conjugado que abarca los siguientes componentes: una o varias moléculas polipeptídicas (I) basadas en la ubiquitina humana, y, unida(s) con ellas por enlaces covalentes, uno o varios componentes funcionales (II) que se escogen entre el conjunto formado por polipéptidos y proteínas, polímeros orgánicos, azúcares, sustancias de bajo peso molecular, péptidos, así como derivados de estas sustancias, realizándose que, después del acoplamiento de (I) a (II) permanece conservada la funcionalidad de todos los componentes, y realizándose que el procedimiento comprende las siguientes etapas: a) puesta a disposición de la ubiquitina humana; b) puesta a disposición de un ligando, que se escoge entre el conjunto formado por unos/as (poli)péptidos/proteínas; c) selección de los aminoácidos 2, 4, 6, 62, 63, 64, 65 y 66 de la ubiquitina humana; d) modificación de los aminoácidos seleccionados mediante una sustitución mediando conservación del motivo de plegamiento del tipo del de la ubiquitina; e) puesta en contacto de la proteína modificada con el ligando puesto a disposición en la etapa b); f) determinación de aquéllas proteínas, que son adecuadas para la fijación específica a los ligandos con una constante de disociación de $K_D = 10^{-5}$ M o menor, efectuándose la detección de la actividad de fijación a través de la técnica de ELISA o de una resonancia de plasmones superficiales; g) acoplamiento de los componentes (I) y (II) en una región situada fuera de la región expuesta superficialmente de la lámina plegada β de la molécula polipeptídica (I), que está prevista para la fijación específica al ligando, a través de una fusión peptídica terminal a (I), o a través de unas cadenas laterales de cisteína o lisina en (I); h) aislamiento del conjugado; e i) detección de la funcionalidad de ambos componentes del conjugado.

25 Con otras palabras, el conjugado utilizado conforme al invento no abarca a la ubiquitina en su forma de tipo silvestre, sino sólo en una forma adaptada a los ligandos especiales. Esta forma adaptada especialmente prevé unas propiedades de fijación a los respectivos ligandos, modificadas (mejoradas) o generadas de nuevas en comparación con la forma de tipo silvestre. Como principio común de las moléculas polipeptídicas basadas en la ubiquitina se ha de mencionar que la generación de una superficie artificial de fijación se efectúa sobre una estructura de lámina plegada beta, con el fin de hacer posible una fijación específica a un ligando que interesa. La presencia de por lo menos una estructura de lámina plegada beta para la puesta a disposición de una superficie artificial de fijación es por lo tanto una característica esencial del invento.

35 Un conjugado preparado conforme al invento designa en este contexto a la unión por enlaces covalentes, posterior a la traducción, de una molécula polipeptídica con otro componente y se diferencia por lo tanto p.ej. de una fusión de polipéptidos en el plano genético. Los polipéptidos fusionados son el resultado de una denominada fusión por traducción.

40 La molécula polipeptídica basada en la ubiquitina se escoge conforme al invento de manera preferida entre el conjunto que se compone de unas proteínas de la superfamilia de proteínas de las "ubiquitin-like proteins" (proteínas similares a la ubiquitina), unas proteínas que tienen un motivo de plegamiento similar al de la ubiquitina, así como unos fragmentos o unas proteínas de fusión de éstas, que poseen en cada caso el motivo de plegamiento similar al de la ubiquitina, realizándose que la proteína, mediando conservación del motivo de plegamiento similar al de la ubiquitina, debido a una o varias modificaciones de aminoácidos en por lo menos una región expuesta sobre la superficie, que incluye por lo menos una cadena de lámina plegada beta de la región de la lámina plegada beta y facultativamente unas regiones que no son de lámina plegada beta, tiene una afinidad de fijación, que no estaba presente anteriormente, frente a un preestablecido partícipe en la fijación o respectivamente ligando.

50 Por consiguiente, se describe también una proteína modificada mediante una sustitución, que se escoge entre el conjunto formado por las proteínas de la superfamilia de proteínas de las "ubiquitin-like proteins" (proteínas similares a la ubiquitina), que tienen un motivo de plegamiento similar al de la ubiquitina, así como unos fragmentos o unas proteínas de fusión de éstas, que tienen todas ellas en cada caso un motivo de plegamiento similar al de la ubiquitina, poseyendo la proteína, a causa de esta modificación, una afinidad de fijación, que no estaba presente anteriormente, frente a un preestablecido partícipe en la fijación.

La molécula polipeptídica (I) basada en la ubiquitina, que se emplea en el conjugado conforme al invento, se prepara en consecuencia mediante una modificación de la ubiquitina humana. Las modificaciones abarcan en particular el intercambio de aminoácidos. Estas modificaciones se llevan a cabo en por lo menos una región expuesta sobre la superficie de la proteína que debe de ser modificada. La modificación de por lo menos un aminoácido abarca por lo menos una cadena de lámina plegada beta de la región de la lámina plegada beta, debiendo estar localizada la cadena de lámina plegada beta junto a la superficie de la proteína, de tal manera que ella sea accesible para el partícipe en la fijación o respectivamente el ligando, que se puede fijar con una afinidad determinable a la proteína modificada. En otra forma de realización del invento, adicionalmente a las modificaciones en la cadena de lámina plegada beta de la región de lámina plegada beta, se modifican también unas regiones que no son de lámina plegada beta, que de manera preferida están expuestas sobre la superficie, con el fin de influir sobre la afinidad de

fijación frente al partícipe en la fijación preestablecido, en particular con el fin de aumentarla y por consiguiente incrementar la especificidad.

5 Para un experto en la especialidad están a disposición las más diversas técnicas, que son en sí conocidas, para la modificación de uno o varios aminoácido(s). Estas se describen más detalladamente en lo sucesivo. De manera complementaria se hace mención también a las publicaciones de Ausubel y colaboradores, 1994, así como de Sambrook y colaboradores, 1989.

10 Ciertas modificaciones de aminoácidos de la región de núcleo de la ubiquitina, que no está expuesta sobre la superficie, ya son conocidas (véanse las citas de Finucane y colaboradores, 1999; y de Lazar y colaboradores, 1997). Las modificaciones que se han llevado a cabo allí conciernen a unas posiciones, que, debido a su localización en el núcleo hidrófobo, no participan en las fijaciones, puesto que no son accesibles para el disolvente o los posibles partícipes en la fijación.

15 En lo sucesivo se ha de ilustrar lo que se entiende en este invento por el concepto de "una propiedad de fijación, que no estaba presente anteriormente" o respectivamente "un sitio de fijación artificial, generado de novo", o respectivamente "una propiedad de fijación modificada en comparación con el polipéptido de tipo silvestre para la fijación específica a un ligando". Por este concepto se entiende que la proteína modificada no tenía anteriormente
20 junto a la región modificada ninguna propiedad de fijación para un partícipe en la fijación preestablecido o para un partícipe en la fijación natural de la ubiquitina.

Los partícipes en la fijación, que pueden ser definidos también como ligandos, tienen una afinidad medible para la proteína modificada conforme al invento. Como un valor mínimo para la presencia de una propiedad de fijación
25 cuantificable, es decir la afinidad, con la que el partícipe es fijado, se puede considerar conforme al invento una constante de disociación para el complejo formado de $K_D = 10^{-5}$ M o más pequeña. A partir de un valor de 10^{-15} M se puede partir de una afinidad de fijación cuantificable. Según sea la utilización, se prefiere un valor de desde 10^{-6} M hasta 10^{-12} M, de manera aún más preferida de desde 10^{-6} hasta 10^{-11} M para p.ej. unos usos cromatográficos, o de desde 10^{-9} hasta 10^{-12} M para p.ej. unos usos diagnósticos o terapéuticos. Otras afinidades de fijación preferidas se sitúan en la región de desde 10^{-7} hasta 10^{-10} M, de manera preferida hasta 10^{-11} M. Los procedimientos para la
30 determinación de las afinidades de fijación son en sí conocidos y se describen en las siguientes páginas.

Por el concepto de "modificación" se entiende conforme al invento unos reemplazos de aminoácidos.

35 La superfamilia de las proteínas similares a la ubiquitina abarca conforme al invento los subgrupos enumerados en la cita de Murzin y colaboradores (1995). Entre éstas se cuentan, por ejemplo, las familias de proteínas "ubiquitin-related proteins" (proteínas relacionadas con la ubiquitina), "UBX domain" (de dominio UBX), "GABARAP-like" (similares a GABARAP), "RAS-binding domain" (de dominio de fijación de RAS) etc. También son abarcadas las proteínas, que tienen un motivo de plegamiento similar al de la ubiquitina. Ejemplos de ellas son las SUMO-1, FAU, NEDD-8, UBL-1 y GDX, así como Rub1, APG8, ISG15, URM1, HUB1, Elongin B, PLIC2 (el dominio del extremo
40 terminal de N) y Parkin humana (el dominio del extremo terminal de N).

Las proteínas de la superfamilia de las proteínas similares a la ubiquitina se han definido de una manera muy exacta. Tan sólo a modo de ejemplo se remite a la página de internet: <http://bip.weizmann.ac.il/scop/index.html>. Según ésta, la familia de las proteínas similares a la ubiquitina se define como una superfamilia, a la que pertenece
45 la familia de las proteínas relacionadas con la ubiquitina. Todos los miembros de esta superfamilia se distinguen predominantemente por unas láminas plegadas β dispuestas antiparalelamente, que están subdivididas en unos segmentos α y β . El plegamiento se define como beta-Grasp y por consiguiente como similar a la ubiquitina. La región del núcleo se define de la siguiente manera: beta(2)-alfa-beta(2), designando las cifras el número de las cadenas, realizándose que la suma de las cadenas forma la lámina plegada β . La disposición de la lámina plegada
50 beta mixta es 2143, con lo que se designa a la situación de las cadenas en el caso de la inspección de izquierda a derecha sobre la lámina plegada beta (el extremo terminal de amino se encuentra abajo, y el extremo terminal de carboxi se encuentra arriba). Para los miembros de las proteínas similares a la ubiquitina es característica por consiguiente una lámina plegada β antiparalela expuesta hacia la superficie de la proteína, que es cubierta por su lado posterior por una hélice α que está situada verticalmente por encima de ésta. Este motivo de plegamiento
55 similar al de la ubiquitina es característico para las proteínas y distingue inequívocamente a los miembros de la familia con respecto de otras proteínas. Mediando toma en cuenta de esta definición, son abarcados también el dominio del extremo terminal de N de PLIC-2 similar al de la ubiquitina y el dominio de Parkin similar al de la ubiquitina.

60 Un experto en la especialidad, o bien con ayuda de unas comparaciones de secuencias, las denominadas alineaciones, o de unas superposiciones estructurales, puede sacar unas primeras conclusiones acerca de si en el caso de las proteínas se trata de un miembro de la superfamilia de las proteínas similares a la ubiquitina. La seguridad definitiva la ofrece siempre naturalmente un análisis estructural, por ejemplo, un análisis estructural por cristalografía de rayos X o una espectroscopía de resonancia nuclear multidimensional. Entretanto se pueden
65 conseguir unas buenas predicciones también mediante unos análisis estructurales con ayuda de algoritmos genéticos.

Otras informaciones acerca de la superfamilia de la ubiquitina se encuentran, por ejemplo, en la publicación de Larsen y colaboradores, 2002. De manera complementaria se ha de hacer mención también a la publicación de Buchberger y colaboradores 2001. Buchberger describe el típico plegamiento β -Grasp como una característica de las proteínas similares a la ubiquitina con una estructura secundaria con la organización beta-beta-alfa-beta-beta-alfa-beta, es decir una disposición de cinco cadenas beta en forma de una lámina mixta (en inglés "mixed-sheet") en la disposición 21534. En este contexto es digno de mención el hecho de que la UBX no tiene ninguna homología significativa en la secuencia primaria con p.ej. la ubiquitina (Buchberger y colaboradores, 2001), pero a pesar de todo - debido a su estructura tridimensional, que es idéntica a la de p.ej. la ubiquitina - es clasificada dentro de las proteínas similares a la ubiquitina. En esta conexión se ha de mencionar que, en la ubiquitina, los aminoácidos situados en las posiciones 48 y 49 son considerados en parte asimismo como una cadena beta autónoma (Vijay-Kumar, 1987). Esta quinta cadena, que estaría localizada en la estructura de la ubiquitina detrás de la hélice, y que proporcionaría a la lámina mixta la disposición 21534, tiene no obstante solamente dos aminoácidos, y es bastante dudoso designar a esta cadena que se compone de dos aminoácidos como una cadena de lámina plegada beta. No obstante, según Buchberger y colaboradores (2001), tal como se ha expuesto más arriba, también unas proteínas con la disposición 21534 se podrían subordinar sin compromiso dentro de la superfamilia de las proteínas similares a la ubiquitina. Para el presente invento, en lo que se refiere a la disposición de las cadenas beta en la ubiquitina se escogió la definición de 21543 descrita detalladamente más arriba.

Las proteínas de la familia y la superfamilia mencionadas están por regla general altamente conservadas. Por ejemplo, según los conocimientos actuales, la ubiquitina tiene en todos los mamíferos la idéntica secuencia de aminoácidos. La ubiquitina de levadura tiene solamente una desviación en tres aminoácidos desde aquella. La ubiquitina humana o respectivamente la ubiquitina de mamíferos se compone de 76 aminoácidos y tiene la estructura descrita al principio.

La proteína modificada que se emplea conforme al invento debería tener una coincidencia en la secuencia de aminoácidos de por lo menos un 30 %, de manera preferida de por lo menos un 40 % o un 50 %, de manera aún más preferida de por lo menos un 60 %, de por lo menos un 70 %, de por lo menos un 80 %, de por lo menos un 90 %, o de por lo menos un 95 %, con respecto a la proteína de partida, que es modificada, es decir con respecto a la ubiquitina humana, teniendo la proteína en cada caso un motivo de plegamiento del tipo del de la ubiquitina, tal como se ha definido detalladamente más arriba.

De acuerdo con el presente invento, la proteína, que se escoge para la producción de la proteína modificada, es la ubiquitina humana. Si el sector de empleo de las proteínas producidas conforme al invento es conocido, es decir que si por ejemplo la proteína modificada debe de ser empleada como un medicamento para el tratamiento de enfermedades en seres humanos, se puede emplear de manera preferida una proteína humana como la proteína de partida que debe de ser modificada; esto es válido análogamente para los correspondientes sectores de empleo.

La ubiquitina humana o respectivamente de mamíferos tiene 76 aminoácidos. Los aminoácidos de las cuatro cadenas beta, que contribuyen a la formación de la lámina plegada beta antiparalela, son, conforme al invento, correspondientemente a la estructura 1UBQ que se encuentra en el banco de datos PDB (véase la página de internet <http://www.rcsb.org/pdb/index.html>), las siguientes posiciones de aminoácidos:

La primera cadena (en el extremo terminal de amino): 2 hasta 7; la segunda cadena de lámina plegada beta: 12 hasta 16; la tercera cadena: 41 hasta 45; la cuarta cadena (en el extremo terminal de carboxi): 66 hasta 71. La situación de las cadenas en el caso de la inspección de izquierda a derecha sobre la lámina plegada (el extremo terminal de amino se encuentra abajo, el extremo terminal de carboxi se encuentra arriba) es: 2^a, 1^a, 4^a, 3^a, cadena, formando la cadena polipeptídica entre la 1^a y la 4^a cadena una hélice alfa.

Selección y modificación de los aminoácidos que deben de ser modificados:

Partiendo de unos correspondientes datos de estructuras, tales como los que están libremente disponibles p.ej. en el Protein Data BankTM (Berman y colaboradores, 2000; <http://www.rcsb.org/pdb>), mediante un análisis apoyado por ordenador se pueden localizar las posiciones de aquellos aminoácidos en la proteína de partida, p.ej. en el entramado proteínico de la ubiquitina, cuyas cadenas laterales está expuestas sobre la superficie, es decir que están orientadas hacia el disolvente o un potencial partícipe en la fijación. Además, mediante un análisis apoyado por ordenador se pueden identificar aquellos aminoácidos en la proteína de partida, es decir en la ubiquitina, cuya sustitución aleatoria presuntamente no podría tener ningún efecto o sólo podría tener un pequeño efecto negativo sobre la estabilidad del entramado proteínico.

Estas informaciones pueden representar un primer punto de partida para la idoneidad de cada aminoácido individual como un elemento de un sitio de fijación, lo que requiere entonces una comprobación en la práctica. Conforme al invento, debido a su exposición sobre la superficie y la tolerancia de la estructura total frente a su intercambio aleatorio, se escogieron los aminoácidos situados en las posiciones 2, 4, 6, 62, 63, 64, 65 y 66 en la ubiquitina humana.

Las mencionadas posiciones se encuentran en una proximidad espacial entre sí al comienzo de la primera cadena de lámina plegada beta en el extremo terminal de amino (posiciones 2, 4, 6) así como en el bucle (posiciones 62, 63) o respectivamente al comienzo de la cadena de lámina plegada beta en el extremo terminal de carboxi (posiciones 64, 65, 66) y forman con sus cadenas laterales de aminoácidos una región coherente sobre la superficie de la ubiquitina (véase la Fig. 1). Mediante unas sustituciones aleatorias de aminoácidos ("randomización") en la región analizada - análogamente al sitio de fijación de antígenos de los anticuerpos - en la estructura proteínica se puede generar una región hipervariable expuesta sobre la superficie, que sigue estando intacta, de la ubiquitina.

Con ayuda del software ProSAIL ("Protein Structure Analysis" (Análisis de la estructura de proteínas); de Proceryon Biosciences, Salzburgo) se pudo determinar, por ejemplo, la estabilidad proteínica de 10^4 variantes en comparación con la ubiquitina (WT = de tipo silvestre) y de una muestra aleatoria igual de grande de unas variantes, en las que fueron sustituidos los restos de un "epitopo testigo" (posiciones aleatorizadas 24, 28, 31, 32, 35, 37, 38, 39). En este caso, aproximadamente un 19 % de las variantes generadas in silico (por ordenador) que habían sido reemplazadas aleatoriamente en la región del sitio de fijación, tienen una estabilidad por lo menos igual de alta que la de la ubiquitina (WT), mientras que aproximadamente un 90 % de ellas eran más estables que el portador del "epitopo testigo" (véase la Fig. 2). Este resultado apoyado por ordenador puede servir entonces como un indicio para la elección de unos aminoácidos adecuados.

De manera preferida - partiendo de los datos disponibles de estructuras de la ubiquitina humana - se escogieron primeramente ocho posiciones de aminoácidos en la región del sitio de fijación que debe de ser generado. Mediante unas modificaciones aleatorias de la secuencia primaria en esta región (mediante mutagénesis aleatoria) y una subsiguiente elección específica (selección) se obtuvieron aquéllas variantes, que tienen la deseada actividad de fijación para un hapteno o antígeno preestablecido o respectivamente que tienen por lo general un partícipe en la fijación preestablecido. A pesar de que a las proteínas modificadas obtenidas se les confiere de esta manera una propiedad de fijación de novo, en lo que respecta a la estructura y a las propiedades químicas de las proteínas, ellas siguen siendo amplísimamente idénticas a la proteína de partida. De esta manera, ellas tienen unas ventajas tales como p.ej. un pequeño tamaño, una alta estabilidad, una producción barata, así como una modificabilidad sencilla, emparejada con una afinidad y una especificidad altas para un ligando previamente definido. La idoneidad de la ubiquitina como estructura de entramado para la generación de unas proteínas fijadoras artificiales no era previsible en este caso, puesto que 1.) no se podía esperar la tolerancia del entramado frente a unos extensos intercambios de aminoácidos debido al pequeño tamaño de la ubiquitina y 2.) no parece presentarse de antemano la funcionalidad del sitio de fijación artificial mediando inclusión de la lámina plegada beta, que es considerada como rígida e inflexible.

En lo sucesivo se describen también unas moléculas polipeptídicas basadas en la gamma cristalina (que no son conformes al invento).

Las gamma cristalinas, una clase de las cristalinas en los vertebrados, son unas proteínas monoméricas con una masa molecular de aproximadamente 22 kDa. El motivo estructural principal de las gamma cristalinas es la lámina plegada beta antiparalela (Hazes y Hol, 1992, Richardson y colaboradores, 1992, Hemmingsen y colaboradores, 1994). Las gamma cristalinas se componen de dos dominios globulares muy parecidos, un dominio situado en el extremo terminal de N y un dominio situado en el extremo terminal de C, que están unidos entre ellos por medio de un péptido engarzador en forma de "V". El modelo de plegamiento característico para las gamma cristalinas ("Greek Key-Motiv" (motivo de clave griega), Slingsby, 1985, Wistow y Piatigorsky, 1988) es muy posiblemente la causa de la considerable estabilidad térmica así como de la estabilidad frente a agentes desnaturizantes (Mandal y colaboradores, 1987).

La gamma II cristalina no tiene en el estado plegado normalmente ningún tipo de propiedades fijadoras. La modificación (por mutagénesis) de una región escogida, expuesta al disolvente, de esta proteína, que se compone del motivo estructural de la lámina plegada beta, condujo sorprendentemente a la modificación de la estructura superficial y del modelo de cargas eléctricas de la proteína y por consiguiente a la producción de unas nuevas propiedades de fijación. En este caso, sólo se escogieron unas regiones o unas posiciones de aminoácidos, que no participan decisivamente en la conservación de la estructura de la proteína. La mutagénesis de una pequeña proteína de lámina plegada beta (Riddle y colaboradores, 1997) ha mostrado que ciertas proteínas, a pesar de tener unas considerables modificaciones de las secuencias, pueden formar correctamente, en un alto porcentaje, la estructura natural de la lámina plegada beta.

En el caso del procedimiento aquí descrito, en una proteína sin ningún tipo de propiedades de fijación se lleva a cabo una mutagénesis deliberada en la región rígida de la lámina plegada beta. De esta manera se produjo de un modo inesperado una proteína con una considerable estabilidad y con unas específicas propiedades de fijación, que son comparables a las de las moléculas de anticuerpos.

Como un sistema adecuado para el aislamiento de unas proteínas de lámina plegada beta mutagenizadas con unas propiedades de fijación resultantes de nuevas, sirve el sistema de presentación por fagos (en inglés "Phage Display-System"). Este sistema hace posible un escrutinio muy eficaz de un gran repertorio de variantes de proteínas en cuanto a unas específicas propiedades de fijación (Smith, 1985). En este caso, se representa en cada caso una

variante de proteína sobre la superficie de un fago filamentosos y ésta puede entrar en interacción con las moléculas dianas, que están inmovilizadas junto a una fase sólida. Las proteínas que se fijan a la molécula diana se pueden obtener mediante elución de los fagos. Después de un aislamiento del ADN de los fagos, se puede determinar la secuencia de ADN de las variantes de proteínas que se fijan específicamente. Junto al sistema de presentación por fagos, pueden encontrar uso también otros sistemas de selección, tales como p.ej. la presentación por bacterias (Stahl y Uhlen, 1997) o la presentación por ribosomas (Hanes y colaboradores, 1997).

Con el modo de proceder descrito se consigue sorprendentemente, por ejemplo modificar a la proteína de lámina plegada beta, la gamma II cristalina, que es muy estable, mediante una deliberada mutagénesis específica para un sitio en la lámina plegada beta, junto a la superficie, de tal manera que a partir de la proteína no fijadora resulte una proteína con unas específicas propiedades de fijación. Mediante una aleatorización de ocho posiciones de aminoácidos se efectúa por consiguiente, por primera vez, una mutagénesis en una molécula de entramado dentro de una región relativamente rígida de la proteína. Por consiguiente, a partir de la proteína de lámina plegada beta gamma II cristalina, se produce una especie proteínica "similar a un anticuerpo" en lo que respecta a sus específicas propiedades de fijación. La gamma II cristalina u otras pequeñas proteínas de lámina plegada beta estables, se pueden utilizar de un modo general con el procedimiento descrito como unas nuevas moléculas de entramado para el diseño de nuevas propiedades de fijación. Las proteínas de lámina plegada beta modeladas pueden reemplazar, por ejemplo, a los anticuerpos recombinantes en diversas aplicaciones.

Unas informaciones adicionales y más detalladas acerca de esto se encuentran en el documento de solicitud de patente internacional WO 01/04144, al que se hace referencia por la presente en su pleno contenido.

El concepto de "ligando", tal como se define en el presente caso, significa una sustancia, que es fijada específicamente por una molécula polipeptídica basada en la ubiquitina.

Como tales participantes en la fijación, los denominados ligandos, se emplean conforme al invento unos/as (poli)péptidos y proteínas (p.ej. inmunoglobulinas y derivados de inmunoglobulinas, unas proteínas, que pueden ser obtenidas a partir del plasma sanguíneo, factores e inhibidores de la coagulación de la sangre, factores de crecimiento, interleucinas, citocinas, proteínas de receptores, proteínas víricas y marcadores de la superficie celular, tales como CD14, CD25, CD34), péptidos (p.ej. apéndices de afinidad, tales como la marca S, la marca T7, la marca His, la marca Strep, la marca Myc, la marca FLAG y ciertos péptidos de origen vírico). Acerca de esto véanse también las formas preferidas de realización, que se exponen más abajo.

El concepto de "componente funcional", tal como se utiliza en este contexto, define al segundo componente del conjugado, que se fija por enlaces covalentes a la molécula polipeptídica basada en la ubiquitina. Con la expresión "funcional" se debe de expresar que se trata de un componente adecuado y posiblemente ya conocido para el empleo en el diagnóstico, la terapia, la cromatografía y la analítica. Expresado de un modo general, por el concepto de un "componente funcional" se define cualquier componente con unas propiedades medibles, p.ej. una actividad enzimática, una propiedad medible por espectroscopía, o una propiedad tóxica. Aparte de esto, la estructura y la función del componente funcional en el presente conjugado no están restringidas. La única exigencia consiste en que, después de la unión por enlaces covalentes entre la molécula polipeptídica y el componente funcional, permanezca conservada la funcionalidad de todos los componentes. En el caso de la molécula polipeptídica, esta funcionalidad es la capacidad de fijación al ligando especial, y en el caso del componente funcional, por ejemplo, su efecto como colorante.

Conforme al invento pueden estar fijados uno o también varios, p.ej. dos, componentes funcionales a una molécula polipeptídica (tal como se ha definido anteriormente). Con el fin de conseguir la fijación específica de los componentes a la molécula polipeptídica, por ejemplo uno de los componentes puede estar estructurado para la fijación específica a un resto de lisina, y el otro a un resto de cisteína en la molécula polipeptídica. Ejemplos de dos componentes de este tipo son unos colorantes fluorescentes, en cuyos casos uno de ellos sirve como un donante de fluorescencia y el otro como un aceptor de fluorescencia.

Unos detalles acerca del modo de la fijación de los componentes unos a otros así como de los componentes de la fijación que entran en cuestión, se explican en lo sucesivo.

La detección de la actividad de fijación de la molécula polipeptídica al ligando y la actividad del participante en el acoplamiento (el componente funcional) representa - tal como se ha mencionado más arriba - un importante punto de vista. La detección de la actividad de fijación al ligando se puede efectuar en este caso mediante diversos métodos. En la técnica de ELISA (acrónimo de "enzyme-linked immunosorbent assay" = ensayo de inmunosorbente enlazado con enzimas), se detecta la fijación mediante unos conjugados de anticuerpos y peroxidasa, y por el contrario, el sistema Biacore aprovecha el fenómeno de la resonancia de plasmones superficiales para la detección. Otras técnicas, tales como la titulación por fluorescencia, la polarización por fluorescencia o la espectroscopía de correlación de fluorescencia (FCS), se basan en las propiedades fluoróforas de la AffilinTM. En el caso de la detección de la actividad del participante en el acoplamiento, es decir el denominado otro componente funcional, son decisivas las propiedades conocidas de éste. De esta manera, unas moléculas cromóforas o fluoróforas, tales como unos colorantes fluorescentes o una ficoeritrina, se analizan a través de sus propiedades espectrales. Unas

enzimas, tales como una peroxidasa o una fosfatasa alcalina, son ensayadas a través de su conversión catalítica de unos substratos modelo. Otras moléculas, tales como unas toxinas, pueden ser ensayadas directamente en experimentos con cultivos de células en cuanto a su actividad biológica. En el caso de los radioisótopos se puede medir la radiactividad con ayuda de unos correspondientes contadores. Para una serie de otras moléculas, tales como azúcares y ácidos nucleicos, hay unos reactivos de detección obtenibles comercialmente. De acuerdo con una forma de realización, - tal como se ha reseñado más arriba - la propiedad de fijación generada de nuevas o modificada en comparación con el polipéptido de tipo silvestre se basa en uno o varios intercambios de aminoácidos en una región expuesta sobre la superficie de una lámina plegada β de la molécula polipeptídica de ubiquitina (I). En este caso, se intercambia un número de 6-10, de manera preferida 8 aminoácidos por cada molécula polipeptídica (I).

Es especialmente importante mencionar que el acoplamiento de (I) a (II) se efectúa de manera preferida en una región situada fuera de la región expuesta sobre la superficie de la lámina plegada β de la molécula polipeptídica (I), que está prevista para la fijación específica a un ligando. Se ha puesto de manifiesto que de esta manera se hace posible un requisito importante planteado al conjugado conforme al invento, a saber la conservación de la funcionalidad de todos los componentes.

Como ejemplo se mencionará aquí un acoplamiento a las Lys 29, 33 de la ubiquitina, que se encuentran fuera de la superficie de fijación para el ligando, más exactamente incluso fuera de la lámina plegada beta (las Lys 29, 33 se encuentran en la hélice alfa) que es responsable de la fijación al ligando. Un acoplamiento a través de esta cadena lateral de aminoácido lejos del sitio de fijación al ligando no conduce a ningún perjuicio de la funcionalidad de los componentes del conjugado.

En este sentido, se prefiere especialmente que el acoplamiento de (I) a (II) se efectúe en una región situada fuera de la lámina plegada β de la molécula polipeptídica (I), que tiene la propiedad de fijación generada de nuevas o modificada para la fijación específica a un ligando. Esta región es, en el caso antes mencionado, p.ej. la hélice alfa de la molécula de ubiquitina. Esto se hace especialmente manifiesto a partir de la Fig. 1, en la que el dominio situado en el extremo terminal de N (la lámina plegada beta) de la cristalina tiene una superficie de fijación generada de nuevas para el ligando, siendo adecuados los restos de lisina (resaltados) que se encuentran en la porción del extremo terminal de C, para el acoplamiento al componente funcional (II).

De acuerdo con una forma de realización, el acoplamiento o respectivamente la unión de (I) a/con (II) tiene lugar a través de unos restos de aminoácidos de (I). Con otras palabras, en este caso el acoplamiento se efectúa a través de unos restos de aminoácidos, que ya estaban presentes por sí mismos en la molécula polipeptídica (I).

El acoplamiento se efectúa en este contexto de un modo específico para un sitio o no dirigido selectivamente a través de unas cadenas laterales de cisteína o lisina en (I). El concepto de "específico para un sitio" significa, en este contexto, que una cisteína o lisina está presente en un sitio definido en la molécula (I) o es introducido en ella, con el fin de definir a un sitio de fijación predeterminado exactamente. El concepto de "no dirigido selectivamente" significa que están presentes varios de tales restos, efectuándose la fijación a estos restos ciertamente de una manera selectiva, pero estando ésta sujeta, sin embargo, también a un cierto factor aleatorio debido a su número.

Para el acoplamiento de los dos componentes del conjugado conforme al invento, es decir para su unión por enlaces covalentes, se expone lo siguiente:

Las proteínas contienen un gran número de grupos funcionales, a través de los cuales se puede conseguir un acoplamiento a otras moléculas. Unos ejemplos concretos de ellos se encuentran más abajo. Mediante la unión por enlaces covalentes de los partícipes, p.ej. a través de un adecuado reactivo de reticulación, es posible de esta manera reunir diversas actividades en una molécula. A modo de ejemplo se mencionarán en este contexto unos anticuerpos, que son acoplados frecuentemente con unas moléculas de colorantes y que de esta manera proporcionan unos reactivos de detección fácilmente detectables, que a continuación son empleados en el diagnóstico.

Análogamente, ciertos anticuerpos son conjugados también con otras proteínas, de manera preferida con unas denominadas enzimas reporteras tales como una fosfatasa alcalina o una peroxidasa. Estas enzimas reporteras convierten químicamente a un substrato, con lo cual se obtiene una señal detectable mediante absorción, fluorescencia o luminiscencia.

Mediante una elección de unos adecuados reactivos de reticulación, ciertas proteínas, es decir también las moléculas polipeptídicas conformes al invento, se pueden acoplar también a otros componentes funcionales de muchas otras clases de sustancias: Así, para esto entra en cuestión un gran número de polímeros orgánicos y también inorgánicos, proteínas, péptidos, ácidos nucleicos, lípidos, azúcares y también de sustancias de bajo peso molecular. Unos partícipes preferidos en el acoplamiento de la clase de los polímeros son p.ej. dextrano, un polimetacrilato, un Sepharose, una agarosa, un poliestireno, un polímero vinílico, un gel de sílice, una celulosa o un poli(etilenglicol) (PEG). La modificación citada en último lugar se emplea, por ejemplo, para la modulación de las propiedades farmacocinéticas de agentes bioterapéuticos. Una gran selección de derivados de PEG, que ya

- 5 contienen unos grupos funcionales previamente activados, adecuados para el acoplamiento, son obtenibles comercialmente (de Nektar Therapeutics). Los otros materiales poliméricos mencionados sirven como sustancias de vehículo en los casos de muchos procedimientos bioquímicos, biotecnológicos y diagnósticos. En este contexto se han de resaltar p.ej. unos usos cromatográficos, en particular la cromatografía por afinidad, en donde estas sustancias poliméricas encuentran utilización como matriz de gel. Para esto, la superficie de unas bolitas poliméricas es funcionalizada y activada con unos grupos químicos adecuados, de tal manera que resulta posible el acoplamiento, p.ej. de una proteína, con una actividad deseada. De esta manera se pueden inmovilizar también unas proteínas fijadoras con una especificidad para un determinado ligando y la matriz de gel resultante se puede emplear entonces para el enriquecimiento eficaz y rápido del ligando a base de una compleja mezcla de sustancias.
- 10 Este enriquecimiento se puede efectuar en este caso o bien mediante una cromatografía en columna o también sobre la superficie de unos filtros. Además, para el enriquecimiento por afinidad se pueden utilizar también ventajosamente aquéllas bolitas poliméricas que poseen propiedades magnéticas (magnetic BEADS = perlas magnéticas) y de esta manera se pueden separar eficazmente a partir de una mezcla.
- 15 Un importante sector de uso es la purificación a gran escala técnica de anticuerpos para finalidades terapéuticas a partir del material sobrenadante de cultivos de células eucarióticas, que se efectúa mediante una cromatografía por afinidad con la proteína A acoplada a la matriz, que es una proteína bacteriana con una afinidad intrínseca para las moléculas de anticuerpos.
- 20 En el caso del acoplamiento de dos componentes proteínicos, aparte de las fusiones de anticuerpos y enzimas reporteras que arriba se han mencionado, existen números ejemplos de uso. Así, en el caso más sencillo, mediante acoplamiento de dos o más moléculas proteínicas idénticas se pueden producir unos homo-dímeros o -multímeros.
- 25 En el caso de ciertas proteínas fijadoras, mediante una multimerización se pueden producir también unos efectos de avidéz, es decir la afinidad del multímero para la sustancia diana es aumentada significativamente en comparación con la afinidad de la proteína fijadora monomérica. Mediante el acoplamiento de dos proteínas fijadoras con una especificidad para diversas sustancias dianas se pueden obtener, por el contrario, unas denominadas moléculas fijadoras biespecíficas, que se pueden usar p.ej. como un adaptador, con el fin de llevar a proximidad espacial a las respectivas sustancias diana.
- 30 También unas proteínas, que poseen unas propiedades tóxicas para las células vivientes, las denominadas toxinas (p.ej. ricina, coleratoxina, la exotoxina de *Pseudomonas*, entre otras) constituyen unos interesantes partícipes en el acoplamiento para anticuerpos u otras moléculas fijadoras. Después del acoplamiento, este conjugado bifuncional puede acoplarse selectivamente a través de la proteína fijadora a una sustancia diana específica p.ej. situada sobre la superficie de una célula tumoral, y a continuación la célula afectada es destruída por medio de la actividad citotóxica.
- 35 Otros relevantes partícipes en el acoplamiento con una naturaleza proteínica son las proteínas de cromóforos tales como p.ej. la GFP (proteína de fluorescencia verde) y sus derivados, o unas proteínas que contienen pigmentos, tales como las ficoeritrinas. Los productos de acoplamiento resultantes, cromóforos o fluorescentes, son por su parte, como sustancias fácilmente detectables, unas valiosas herramientas para la investigación o el diagnóstico.
- 40 Sin embargo, los cromóforos o los conjugados de proteínas fluorescentes, tal como ya se ha mencionado más arriba, son accesibles mediante el acoplamiento de unas moléculas colorantes de bajo peso molecular. Un gran número de moléculas colorantes adecuadas con unos grupos activos en reticulación, es obtenible comercialmente p.ej. de la entidad Invitrogen. Otros partícipes en el acoplamiento de bajo peso molecular, que proporcionan unos conjugados de proteínas para el empleo en el diagnóstico y la terapia, son p.ej. biotina, digoxigenina, derivados de metales pesados, agentes formadores de quelatos, radioisótopos, sustancias citotóxicas y antibióticos.
- 45 En los casos de los grupos funcionales contenidos en proteínas y también en las moléculas polipeptídicas conformes al invento así como en componentes funcionales, que son adecuados para un acoplamiento, se trata sobre todo de grupos amino, carboxi, hidroxilo y sulfhidrilo, pero también la función fenólica de la tirosina y los sistemas de anillos aromáticos pueden servir como puntos de ataque para los reactivos de acoplamiento. Los restos de aminoácidos adecuados para un acoplamiento se distinguen por unas propiedades especiales: Por una parte, ellos tienen que poseer una cadena lateral reactiva, que tiene que ser accesible para el reactivo de acoplamiento. Idealmente, este grupo funcional se encuentra junto a la superficie de la proteína y está expuesto al disolvente. Además, la modificación de este resto no debería interferir en la función de la proteína. De manera preferida, los restos que deben de ser modificados están situados a una distancia significativa del centro activo de una enzima, o de la superficie de fijación de la molécula polipeptídica; además de ello, en estas regiones tampoco deberían presentarse ningunos restos de aminoácidos del mismo tipo, que después de la modificación podrían conducir a una pérdida de la función de la proteína. Por lo tanto, unos restos de aminoácidos, que se presentan raramente en la correspondiente proteína, son también ventajosos.
- 60 Tal como ya se ha reseñado más arriba, para la molécula polipeptídica (I) basada en la ubiquitina entra en consideración de manera preferida el acoplamiento a través los restos de lisina 29 y 33 de la molécula de ubiquitina.
- 65

Algo menos preferido, pero a pesar de todo posible, es un acoplamiento a través de los restos de lisina 11 y 48, que están situados en cada caso a menor distancia de la superficie de fijación al ligando que los restos 29 y 33.

En el caso de una molécula polipeptídica (I) basada en la gamma cristalina (que no es conforme al invento), el dominio de péptido con la propiedad de fijación generada de nuevas o modificada en comparación con el polipéptido de tipo silvestre, para la fijación específica a un ligando, es el dominio situado en el extremo terminal de N, y el acoplamiento de (I) a (II) se efectúa a través del dominio situado en el extremo terminal de C. Esto es válido igualmente para la posibilidad de una fusión de péptidos en el extremo terminal de C, que contiene de manera preferida cisteína, así como también para las cadenas laterales de aminoácidos, tales como lisina, que están presentes en el dominio situado en el extremo terminal de C, y que están a disposición para un acoplamiento con el componente funcional. En este caso se emplean de manera preferida los restos 91 y 163 de la gamma cristalina (véase la Fig. 1).

En este caso, entre los aminoácidos proteinógenos se deben de resaltar sobre todo la lisina, que en su cadena lateral posee un grupo épsilon-amino, así como la cisteína con su función sulfhidrilo. Estos grupos funcionales tienen una reactividad especial y son, por lo tanto, bien adecuados como partícipes para un acoplamiento específico de una molécula polipeptídica conforme al invento con un componente funcional. Así en la bibliografía se describen numerosos reactivos, que reaccionan específicamente sólo con grupos sulfhidrilo y que, por lo tanto, se pueden emplear conforme al invento, p.ej. maleinimida, un yodoacetato, un hidroximercuribenzoato y el reactivo de Ellman, entre otros. Otros ejemplos se encuentran en los manuales pertinentes tales como los de Voet & Voet (1995) o Lottspeich & Zorbas (1998).

Allí también se describen numerosos reaccionantes con cadenas laterales, que son específicos para la lisina, tales como p.ej. anhídridos de ácidos, (anhídrido acético, N-hidroxi-succinimida, entre otros, que asimismo encuentran uso en el presente invento). Las lisinas tienen, junto a su reactividad, todavía otras propiedades ventajosas para un acoplamiento: Debido a la cadena lateral cargada eléctricamente, ésta se encuentra en la mayoría de los casos junto a la superficie de la proteína, es decir que ella es accesible al disolvente, que en los sistemas biológicos en la mayoría de los casos es agua. Esta accesibilidad también es necesaria para el reactivo de acoplamiento y por lo tanto debería existir.

Las cisteínas libres expuestas sobre la superficie, se presentan en las proteínas de manera relativamente infrecuente, en el caso de las proteínas extracelulares, estas cisteínas están integradas en la mayor parte de los casos en puentes de disulfuro, que frecuentemente estabilizan también a las interacciones entre dímeros. Sin embargo, los puentes de disulfuro se pueden disociar también por reducción, de tal modo que las cisteínas contenidas son accesibles entonces a una modificación. Si en una molécula polipeptídica conforme al invento no está contenido ningún resto de cisteína accesible para un reactivo de acoplamiento, entonces es posible introducir tales restos en un sitio adecuado mediante una mutagénesis. En este caso, el conocimiento de la estructura espacial de la proteína es ventajoso, puesto que de esta manera se facilita la predicción de unas posiciones de aminoácidos favorables para el acoplamiento, que están expuestas sobre la superficie. Sin embargo, si están presentes varios restos de cisteína en una proteína, que hacen imposible un acoplamiento específico para un sitio (a un resto definido de cisteína, véase más arriba), entonces éstos pueden ser eliminados mediante una mutagénesis dirigida a un sitio. De manera preferida, se efectúa en este caso el intercambio por un resto de serina, que posee unas propiedades similares a las del resto de cisteína.

No obstante, frecuentemente no es posible obtener unos restos de aminoácidos adecuados para el acoplamiento, mediante una mutagénesis en la secuencia de proteína que interesa. Sin embargo, si la proteína tolera unas inserciones de restos de aminoácidos o unas fusiones en el extremo terminal de N o C, entonces se pueden introducir allí en el plano genético deliberadamente unas secuencias peptídicas, que contienen los restos de aminoácidos adecuados para el acoplamiento.

Por cuanto a esto, de acuerdo con otra forma de realización, el acoplamiento de (I) a (II) se efectúa a través de unos restos de aminoácidos en una adicional fusión terminal de péptidos a (I).

Una comprobación de la accesibilidad de estas fusiones terminales de péptidos se puede efectuar p.ej. mediante la utilización de un reactivo de acoplamiento específico para una cadena lateral con unas propiedades cromóforas, p.ej. el reactivo de Ellmann en el caso de la cisteína (compárense también los Ejemplos). La accesibilidad de estas fusiones terminales de péptidos se puede controlar, entre otras, a través de su longitud. Un aumento de la accesibilidad de la cadena lateral, que debe de ser acoplada, de un aminoácido, es posible p.ej. mediante la inserción de unos denominados espaciadores, es decir de unos elementos distanciadores entre la cadena lateral de un aminoácido que se debe de acoplar y la proteína, en este contexto en el caso de las fusiones de péptidos se trata de unos restos de aminoácidos inertes adicionales. Para esto se adecuan especialmente los restos de glicina y serina, puesto que ellos tienen solamente un pequeño tamaño y pueden adoptar de esta manera una estructura muy flexible.

En dependencia del número de los grupos funcionales accesibles para el reactivo de acoplamiento en la proteína y de su especificidad se puede diferenciar entre diferentes tipos de acoplamiento. Por ejemplo, en el caso de la

utilización de un reactivo de acoplamiento específico para la cisteína sólo reaccionan selectivamente restos de cisteína; pero si están presentes p.ej. varios restos de cisteína, no se puede predecir el sitio exacto del acoplamiento, y entonces se habla de un acoplamiento selectivo, pero no dirigido. Si, por el contrario, existe solamente una cisteína accesible para el reactivo de acoplamiento, el acoplamiento se efectúa de un modo específico para un sitio.

Comercialmente es obtenible un gran número de adecuados reactivos de acoplamiento (p.ej. de la entidad Pierce). Una forma especial de reactivos de acoplamiento, que se pueden emplear conforme al invento, se designa también como reticuladores (en inglés "cross linker") o sencillamente como engarzadores (Herrmann & Morse, 1973; Takamiya y colaboradores, 1975, Reichlin, 1980).

Un engarzador es definido como una sustancia, que une a dos (o más) moléculas por medio de un enlace covalente. Los engarzadores contienen dos (o más) grupos funcionales reactivos (activados), cuya distancia espacial se puede regular a través de otros grupos químicos que los unen. Los engarzadores, que tienen unos grupos funcionales idénticos, son designados como homobifuncionales, deslindándose de los engarzadores hetero-bifuncionales, que poseen diferentes grupos funcionales. Mediante la elección adecuada de las sustancias engarzadoras es posible, por lo tanto, unir entre sí también a unas clases de sustancias completamente diferentes.

Como ejemplo de un engarzador empleable conforme al invento se ha de remitir a la porción situada en el extremo terminal de C de SPC-1-A7-Cys, véase la Tabla 2 más abajo.

Un caso especial del acoplamiento de proteínas se contenta también, no obstante, sin unos engarzadores activados: La formación de puentes de disulfuro p.ej. en el caso de la dimerización de proteínas. En condiciones oxidantes, los radicales sulfhidrilo poseen una reactividad lo suficientemente alta como para formar un disulfuro, es decir un enlace covalente entre los dos átomos de azufre.

Una reacción de acoplamiento puede transcurrir conforme al invento o bien como una reacción de una sola etapa o sino en varias etapas. En el caso de una sencilla dimerización de dos moléculas idénticas, que llevan en cada caso sólo un resto reactivo, es suficiente incubar los componentes del acoplamiento con un engarzador homo-bifuncional, con el fin de obtener un conjugado definido. En el caso de unos diferentes participantes en el acoplamiento, que llevan también unos grupos reactivos diferentes, la reacción de una sola etapa solamente es posible con un correspondiente engarzador hetero-bifuncional.

Alternativamente, el acoplamiento entre diferentes participantes en el acoplamiento (reaccionantes) con unos grupos reactivos idénticos se puede efectuar, no obstante, en un proceso de múltiples etapas. Para esto, primeramente sólo se incuba un participante en la reacción, en la mayoría de los casos con un exceso del engarzador y se aísla el conjugado resultante monovalente a base de un reaccionante y un engarzador, antes de que éste sea unido con el segundo compuesto reaccionante a través del grupo funcional, que está todavía libre, del engarzador. Un gran número de sustancias químicas, que encuentran utilización en la bioquímica y la biotecnología, son obtenibles comercialmente (de las entidades Pierce e Invitrogen) en una denominada forma activada, es decir que ya están unidos con engarzador que es todavía reactivo.

El grado de acoplamiento, es decir la relación relativa de los componentes individuales en el conjugado, en el caso de que estén presentes varios grupos reactivos, es regulable en una cierta medida por medio de la estequiometría de los compuestos reaccionantes empleados. Un acoplamiento múltiple definido con diferentes participantes en el acoplamiento es posible mediante un acoplamiento secuencial o mediante la utilización de un diferente proceso químico de acoplamiento, p.ej. mediante acoplamiento del primer componente funcional a unas cisteínas, mientras que el componente funcional 2 se engancha a las lisinas del correspondiente polipéptido. Un ejemplo típico de esto es el enganche de unas parejas de donantes y aceptores de fluorescencia para unas mediciones por FRET (acrónimo de "Fluorescence Resonance Energy Transfer" = transferencia de energía por resonancia de fluorescencia). Unas combinaciones, adecuadas para esto, de moléculas colorantes son obtenibles de la entidad Invitrogen.

Independientemente del mecanismo escogido de acoplamiento, que conduce al conjugado conforme al invento, se ha de hacer mención otra vez al hecho de que la capacidad de funcionar de los presentes conjugados no se podía de este modo y que era sorprendente. Por cuanto a esto, se remite también a las precedentes explicaciones.

Además de esto, se ha de mencionar que para un experto en la especialidad no era de esperar que se puedan producir unos conjugados tales como los que se divulgan en el presente invento, permaneciendo conservada o incluso siendo aumentada la plena funcionalidad de los componentes individuales.

Las relaciones de tamaños entre las moléculas polipeptídicas conformes al invento, por una parte, y los componentes funcionales, por otra parte, son muy diversas. Parcialmente, las moléculas que deben de ser fijadas, por ejemplo una ficoeritrina, son 10 - 12 veces más grandes que las moléculas polipeptídicas, pero parcialmente, tal como el colorante fluorescente Oyster, también son más pequeñas. Sorprendentemente, de manera especial en el

caso de las moléculas fijadas que son mucho más grandes, permanecen conservadas tanto la estructura de la molécula polipeptídica como también la afinidad de fijación al ligando. Este hecho no era de esperar de este modo.

5 Tal como ya se ha reseñado más arriba, las cadenas laterales para el acoplamiento al componente funcional están situadas fuera de la superficie de fijación de (I) con el ligando, con el fin de no perturbar a la funcionalidad de la fijación al ligando.

10 De acuerdo con otra forma preferida de realización - tal como se ha mencionado más arriba - la fusión terminal de péptidos a (I) contiene uno o varios restos de cisteína o uno o varios restos de lisina, no participando de manera preferida estos restos de aminoácidos en la interacción de (I) con el ligando.

15 El componente funcional (II) se escoge entre el conjunto formado por polipéptidos y proteínas, polímeros orgánicos, azúcares, sustancias de bajo peso molecular, péptidos así como derivados de estas sustancias. Acerca de los principios de fijación y los reactivos de acoplamiento, véanse las explicaciones antes mencionadas.

De acuerdo con una forma preferida de realización, el componente funcional (II) es un péptido, un polipéptido o una proteína, de manera preferida una proteína de cromóforo, una enzima, una inmunoglobulina, un derivado de inmunoglobulina, una toxina o un polipéptido de acuerdo con I.

20 En el caso de que el componente funcional (II) sea un polímero, éste se escoge de manera preferida entre dextrano, un polimetacrilato, un Sepharose, una agarosa, un polímero vinílico, un poliestireno, un gel de sílice, una celulosa o un poli(etilenglicol), o un derivado de un polímero.

25 En el caso de que el componente funcional (II) sea una sustancia de bajo peso molecular, ésta es de manera preferida un colorante, biotina, digoxigenina, un metal pesado, un compuesto formador de quelatos, un radioisótopo, un antibiótico o una sustancia citotóxica.

El ligando que se fija específicamente al componente (I), se escoge entre el conjunto formado por polipéptidos, péptidos y proteínas.

30 En el caso de que en este contexto se trate de un polipéptido o una proteína, se emplean de manera preferida unas inmunoglobulinas y unos derivados de inmunoglobulinas, unas proteínas obtenidas a partir de un plasma sanguíneo, unos factores y agentes inhibidores de la coagulación sanguínea, unos factores de crecimiento, interleucinas, citocinas, proteínas receptoras, proteínas de virus y unos marcadores de la superficie celular, de manera preferida CD14, CD25 y CD34.

En el caso de que el ligando sea un péptido, éste será de manera preferida un apéndice de afinidad, de manera preferida la marca S, la marca T7, la marca His, la marca Strep, la marca Myc o la marca FLAG, o un péptido de origen vírico.

40 De acuerdo con una forma preferida de realización, el componente (II) del conjugado conforme al invento consiste en uno o varios polipéptidos basados en la ubiquitina, que son idénticos a (I), y que están unidos por enlaces covalentes con éste, con lo cual se consigue un aumento de la afinidad al ligando de (I) a través de unos efectos de avidéz. Para una explicación detallada de esto se remite a las explicaciones antes proporcionadas.

45 Además, el componente (II) es de manera preferida un polipéptido, una proteína o un polímero, que se ha unido múltiples veces por enlaces covalentes al componente (I), con lo cual se consigue un aumento de la afinidad para el ligando de (I) a través de unos efectos de avidéz. Alternativamente, el componente (I) es un polipéptido o un polímero, que después de una unión por enlaces covalentes con el componente (I) pasa a formar parte de una unión por enlaces covalentes o no covalentes con otros conjugados de este tipo, con lo cual se consigue un aumento de la afinidad para el ligando de (I) a través de unos efectos de avidéz.

De acuerdo con una forma preferida de realización, el componente (I) es una de las moléculas SPU11-3-A1 (las SEQ ID NO: 12 y 13).

55 El invento describe no solamente las exactas secuencias de ácidos nucleicos, sino también unas variantes de éstas. Unas "variantes" son conforme al invento en particular aquéllos ácidos nucleicos, en los que se presentan una o varias sustituciones, inserciones y/o supresiones en comparación con los ácidos nucleicos definidos en las SEQ ID NO. En los casos de éstos faltan de manera preferida por lo menos 1, pero también 2, 3, 4 o más nucleótidos junto a uno o ambos extremos de los ácidos nucleicos, o también en el interior de los ácidos nucleicos, o ellos son reemplazados por otros nucleótidos.

60 Los ácidos nucleicos del presente invento abarcan, por lo tanto, también unos ácidos nucleicos, que tienen unas secuencias, que son esencialmente equivalentes a los ácidos nucleicos de las respectivas SEQ ID NO. Unos ácidos nucleicos conformes al invento pueden tener p.ej. por lo menos aproximadamente 80 %, típicamente por lo menos aproximadamente 90 % o 95 % de identidad de las secuencias con los ácidos nucleicos de las SEQ ID NO.

El concepto de "secuencia de ácidos nucleicos" se refiere a un heteropolímero de nucleótidos o a la secuencia de estos nucleótidos. El concepto de "ácido nucleico", tal como se utiliza en este contexto, abarca tanto un ARN, un ADN, inclusive un ADNc, un ADN genómico y sintético (o respectivamente sintetizado por medios químicos) así como también unas bases unidas a otros polímeros, tal como una ANP.

El invento se refiere también a unas variantes, que se hibridan con los ácidos nucleicos conformes al invento en unas condiciones moderadamente rigurosas.

Por el concepto de "unas condiciones rigurosas de hibridación y lavado" se entienden por lo general las condiciones de reacción, bajo las cuales se forman solamente unas moléculas dúplex entre los oligonucleótidos y las moléculas dianas deseadas (unos híbridos perfectos) o respectivamente ya sólo se detecta el organismo diana deseado. Por el concepto de "unas condiciones rigurosas de hibridación" se entienden en este caso en particular las de 0,2 x SSC (NaCl 0,03 M, citrato de sodio 0,003 M, de pH 7) a 65 °C. En el caso de unos fragmentos más cortos, por ejemplo unos oligonucleótidos a base de hasta 20 nucleótidos, la temperatura de hibridación se sitúa por debajo de 65 °C, por ejemplo, por encima de 55 °C, de manera preferida por encima de 60 °C, pero en cualquier caso por debajo de 65 °C. Las temperaturas rigurosas de hibridación son dependientes del tamaño o respectivamente de la longitud del ácido nucleico y de sus composiciones de nucleótidos, y deben de ser determinadas por un experto en la especialidad mediante ensayos manuales. Unas condiciones moderadamente rigurosas se alcanzan por ejemplo a 42 °C y con un lavado en 0,2 x SSC/SDS al 0,1 % a 42 °C.

Las respectivas condiciones de temperatura pueden ser diversas en dependencia de las condiciones de ensayo escogidas y en dependencia de la muestra de ácido nucleico, que debe de ser investigada, y tienen que ser adaptadas entonces de una manera correspondiente. La detección del producto de hibridación se puede efectuar, por ejemplo, mediante una autorradiografía en el caso de unas moléculas marcadas radiactivamente, o mediante fluorimetría en el caso de la utilización de unas moléculas marcadas por fluorescencia.

Un experto en la especialidad puede adaptar las condiciones de un modo en sí conocido al procedimiento escogido de investigación, con el fin de conseguir realmente unas condiciones moderadamente rigurosas y hacer posible un procedimiento específico de detección. Unas condiciones rigurosas adecuadas se pueden determinar, por ejemplo, con ayuda de unas hibridaciones de referencia. Se tiene que emplear una concentración adecuada de ácidos nucleicos o respectivamente de oligonucleótidos. La hibridación debe de tener lugar a una temperatura adecuada (cuanto más alta sea la temperatura, tanto más débil será la unión de los híbridos).

De acuerdo con una forma de realización, el presente invento se refiere a un procedimiento para la preparación de un conjugado tal como se ha definido más arriba, partiendo del componente (I) con un secuencia conocida, que abarca las siguientes etapas:

- Identificación para el acoplamiento de unos adecuados restos de aminoácidos mediante un análisis de la estructura espacial de la proteína, de manera preferida de unos restos situados fuera de la superficie de interacción de (I) con el ligando;
- Activación de un partícipe en el acoplamiento mediante un adecuado reactivo de acoplamiento;
- Realización de la reacción de acoplamiento;
- Aislamiento del conjugado; y
- Detección de la funcionalidad de ambos componentes del conjugado.

Un procedimiento modificado para la preparación de un conjugado del invento comprende, partiendo del componente (I) con una secuencia conocida, en el que no se había identificado ningún resto de aminoácido adecuado para el acoplamiento, las siguientes etapas:

- Introducción de unos restos de aminoácidos adecuados para el acoplamiento mediante sustitución, inserción o fusión, de manera preferida de unos restos expuestos sobre la superficie fuera de la superficie de interacción de (I) con el ligando;
- Detección de la accesibilidad de los restos de aminoácidos introducidos;
- Detección de la funcionalidad del componente (I) modificado de esta manera;
- Activación de un partícipe en el acoplamiento mediante un adecuado reactivo de acoplamiento;
- Realización de la reacción de acoplamiento;
- Aislamiento del conjugado; y
- Detección de la funcionalidad de los dos componentes del conjugado.

Unas explicaciones más detalladas respecto a los procedimientos de acoplamiento, etc., se encuentran más arriba.

En este contexto se describe una composición farmacéutica, que abarca un conjugado producido conforme al invento y un vehículo farmacéuticamente compatible.

- En la composición farmacéutica se mezcla el conjugado con unos vehículos adecuados o unas adecuadas sustancias de vehículo en ciertas dosis, de tal manera que la enfermedad sea tratada o por lo menos aliviada. Una composición de este tipo puede contener (adicionalmente a las sustancias activas y al vehículo) unos agentes de dilución, unos materiales de relleno, unas sales, unos tampones, unos agentes estabilizadores, unos agentes solubilizantes y otros materiales, que son bien conocidos en la técnica. El concepto de "farmacéuticamente compatible" define a un material no tóxico, que no perturba a la eficacia de la actividad biológica de la sustancia constitutiva activa o respectivamente de la sustancia activa. La elección del vehículo depende de la vía de administración.
- La composición farmacéutica puede contener adicionalmente otros agentes, que aumentan la actividad de la sustancia activa o que complementan a la actividad o a la utilización de ésta en el caso del tratamiento. Tales factores y/o agentes adicionales pueden estar contenidos en la composición farmacéutica, con el fin de conseguir un efecto sinérgico o de minimizar unos efectos secundarios o respectivamente unos efectos indeseados.
- Unas técnicas para la formulación o respectivamente preparación y administración de los conjugados de la presente solicitud se pueden encontrar en la obra "Remington's Pharmaceutical Sciences", Mack Publishing Co., Easton, PA, última edición. Una dosis terapéuticamente eficaz se refiere además a una cantidad del compuesto, que es suficiente como para conseguir un mejoramiento de los síntomas, por ejemplo, un tratamiento, una curación, una prevención o un mejoramiento de tales estados. Unas vías adecuadas de administración pueden incluir, por ejemplo, una administración por vía oral, rectal, transmucosal o intestinal, y una administración por vía parenteral, inclusive unas inyecciones intramusculares, subcutáneas, intramedulares, al igual que unas inyecciones intratecales, directamente intraventriculares, intravenosas, intraperitoneales o intranasales. Se prefiere la administración por vía intravenosa a un paciente.
- Un conjugado definido tal como en este contexto se puede utilizar en el diagnóstico, la terapia y la cromatografía por afinidad.
- Los métodos de acoplamiento expuestos y los datos obtenidos con ellos hacen posible los más diversos usos de los conjugados, dentro de ellos el empleo de los conjugados en la cromatografía por actividad. Ejemplos de ellos son el empleo de la proteína A para la purificación de anticuerpos y la purificación de proteínas del plasma sanguíneo, factores de crecimiento o vacunas contra la influenza, mediante una cromatografía por afinidad así como la purificación de unas proteínas con apéndices de afinidad, producidas por medios recombinantes, o el empobrecimiento de endotoxinas o respectivamente albuminas. Mediante un acoplamiento con unas matrices es concebible además la utilización en la plasmáforésis sanguínea o la biorremediación.
- Otro sector de uso se establece en el diagnóstico. En este caso son concebibles los empleos en el escrutinio de bancos de sangre en cuanto a infecciones bacterianas o víricas o en técnicas clásicas de detección tales como un ELISA o unos nuevos desarrollos tales como en un sistema Luminex. Asimismo en el diagnóstico pero también en la terapia, estos conjugados se pueden emplear en la separación de células.
- La utilización de los conjugados preparados conforme al invento en la terapia es asimismo posible, en particular el uso general como moléculas de transporte. Otros usos en la terapia se podrían encontrar en la terapia génica, en el caso de la dirección deliberada a un objetivo mediante una molécula polipeptídica de acuerdo con el invento y el acoplamiento a unos sistemas destinados a la transferencia de genes. Asimismo, mediante una dirección deliberada a un objetivo y el acoplamiento a una toxina bacteriana se establecería el empleo como una inmunotoxina en la terapia.
- El presente invento se describirá en lo sucesivo con ayuda de varias figuras y los ejemplos acompañantes, que sin embargo no deben de restringir la extensión del invento, sino solamente ilustrar a éste.
- Figura 1: Estructura espacial de la gamma II cristalina. La superficie de fijación generada de novo en el dominio situado en el extremo terminal de N se ha representado de color amarillo. La situación en el extremo terminal de C de los restos de lisina localizados fuera de la superficie de fijación se ha resaltado mediante unos casquetes esféricos de color rojo.
- Figura 2: Sensogramas de los experimentos según Biacore para la competición en la fijación de las variantes de Affilin™ SPC1-A1 (A), SCP1-A7 (B) y SPC1-G3 (C) a un chip de CM5 con una IgG-Fc inmovilizada. Para los experimentos se inmovilizaron 180 RU de una IgG-Fc policlonal. Para la competición en la fijación se emplearon las concentraciones indicadas de las variantes y de la IgG-Fc. Como tampón de elución se utilizó HBS-EP con una velocidad de circulación de 30 µl/min.
- Figura 3: ELISA dependiente de la concentración para la detección de la fijación de SCP7-E9 a proNGF. La placa de microtitulación se revistió con 10 µg/ml de proNGF. Como anticuerpo de detección sirvió un conjugado de un anticuerpo anti-gamma II cristalina humana y de una POD en una dilución de 1:1.000. Los valores de absorción representados son unos valores promedios de dos mediciones paralelas. Se pudo calcular un valor de K_D aparente de 200 nM.

Figura 4: ELISA dependiente de la concentración para la detección de la fijación de SCP1-A7-Cys a una IgG-Fc humana. La placa de microtitulación se revistió con 10 µg/ml de la IgG-Fc. Como anticuerpo de detección sirvió un conjugado de un anticuerpo anti-gamma II cristalina humana y de una POD en una dilución de 1:1.000. Los valores de absorción representados son los valores promedios de dos mediciones paralelas. Se pudo calcular un valor de K_D aparente de 233 nM.

Figura 5: Sensogramas de los experimentos según Biacore acerca de la fijación de un conjugado de SCP1-A7BB-PE a un chip de CM5 con una IgG-Fc inmovilizada. Se inmovilizaron 3.000 RU de la IgG-Fc y a través del chip se condujeron unas concentraciones de 121 nM (en color rojo), 75 nM (en color verde) y 6 nM (en color azul) de un conjugado de SPC1-A7BB-PE. La fase de asociación fue de 1 min, seguida por una fase de disociación durante 3 min. Como tampón de elución sirvió HBS-EP con una velocidad de circulación de 30 µl/min. A partir de las curvas se pudo calcular un valor de K_D macroscópico de 15 nM.

Figura 6: Sensogramas de los experimentos según Biacore para la comprobación de la fijación de SPC1-A7 Oyster556 a un chip de CM5 con un IgG-Fc inmovilizado. Se inmovilizaron 1.000 RU de la IgG-Fc sobre el chip y el SPC1-A7 Oyster556 se condujo en unas concentraciones de 1 µM (en color azul) y 5 µM (en color rojo) a través del chip. Las fases de asociación y disociación fueron en cada caso de 3 min. Como tampón de elución sirvió HBS-EP con una velocidad de circulación de 30 µl/min.

Figura 7: Detección de la fijación de un conjugado de una AffilinTM y una POD a una IgG mediante un ELISA. Se inmovilizaron 10 µg/ml de una IgG humana a una placa de microtitulación. Se incubaron diversas diluciones del conjugado de AffilinTM y POD en una PBS durante 1 h sobre la placa de microtitulación. Después de una etapa de lavado se detectó la actividad de la POD fijada por medio de una solución del sustrato TMB.

Figura 8: Sensogramas de los experimentos según Biacore acerca de la fijación de SPU11-3-A1_Cys a NGF. Se acoplaron 200 RU de SPU11-3-A1_Cys al chip de CM5 con ayuda de PDEA y se condujeron diversas concentraciones de NGF a través del chip. Como tampón de elución sirvió una PBS (EDTA 1 mM, Surfactant P20 al 0,005 %) con una velocidad de circulación de 30 µl/min. A partir de las curvas se pudo calcular un valor de K_D de 46 nM.

Figura 9: Sensogramas de los experimentos según Biacore acerca de la fijación de SPC7-E9 a un chip de CM5 con proNGF. Se inmovilizaron 280 RU de proNGF y se condujeron diversas concentraciones de proNGF a través del chip. Como tampón de elución sirvió HBS-EP con una velocidad de circulación de 30 µl/min. A partir de las curvas se pudo calcular un valor de K_D de 1,4 nM.

Figura 10: Elución de proNGF desde una columna de afinidad con SPC7-EP9. Se aplicaron 400 µg de proNGF purificado (momento 0, línea de color rosa dibujada de trazos discontinuos) y a continuación se enjuagó con 20 volúmenes de la columna del tampón de elución. La elución se efectuó con glicina 0,1 M de pH 2,2 (línea de color verde). La elución se llevó a cabo con un caudal de paso de 1 ml/min. La detección de la proteína se efectuó a 280 nm (línea de color azul).

Figura 11: SDS-PAGE de la separación de proNGF desde una solución de BSA y desde un extracto en bruto de E. coli (v.l.n.r) banda 1: proteínas marcadoras, banda 2: patrón de BSA, banda 3: patrón de proNGF, banda 4: mezcla de los patrones de BSA y proNGF (aplicación), banda 5: material que ha pasado por la columna, banda 6: elución con glicina 0,2 M (de pH 2,2), banda 7: vacía, banda 8: mezcla a base de un extracto en bruto de E. coli (BI 21) y un patrón de proNGF, banda 9: material que ha pasado por la columna, banda 10: elución con glicina 0,2 M (de pH 2,2).

Ejemplo 1

Selección de la variante de AffilinTM que fija a IgG-Fc y proNGF a partir de la biblioteca de gamma II cristalina humana, expresión y purificación

Partiendo de la biblioteca de gamma cristalina humana CR20 se llevó a cabo un proceso de selección con ayuda del sistema de presentación por fagos. En este caso, ya después de una ronda se pudieron seleccionar y aislar varias variantes de AffilinTM, que en el ELISA de fagos individuales manifestaron una fijación específica a una IgG-Fc. Se ha de mencionar que el concepto de "AffilinTM", utilizado aquí, corresponde al componente de molécula polipeptídica conforme al invento del conjugado, que está basado en la ubiquitina o en la gamma cristalina, y que tiene en comparación con el tipo silvestre una propiedad modificada de fijación para la fijación específica a un ligando. Después de un cambio de clonación de los genes en el vector de expresión pET20b (de Novagen) se sobreexpresaron las variantes de AffilinTM por medios recombinantes en E. coli (BL21(DE3), de Stratagene), y a continuación se purificaron en dos etapas de cromatografía (IMAC y filtración a través de un gel). En un ELISA dependiente de la concentración y en unos experimentos según BIACORE se pudo determinar una fijación específica a la IgG-Fc con una constante de disociación situada en la región de los nM.

ES 2 414 605 T3

- Para la selección de las variantes de Affilin™ que se fijan a una IgG-Fc, se incubó 1 ml de la biblioteca CR20 (6,5 x 10¹⁰ cfu (unidades de formación de colonias)) en 1 de medio 12 x YT con glucosa al 2 % y 100 µg/ml de ampicilina a 37 °C y 220 rpm hasta llegar a una densidad óptica de DO₆₀₀ = 0,4. A continuación, el cultivo de bacterias se incubó con un exceso de 10 veces de fagos ayudadores M13K07 (de Invitrogen, Karlsruhe, Alemania) para la infección durante 1 h a 37 °C y 100 rpm. La suspensión de bacterias se centrifugó entonces durante 20 min a 1.000 x g, y el sedimento se resuspendió en un medio 112 x YT con GSH 8 mM, 100 µg/ml de ampicilina y 50 µg/ml de kanamicina. La producción de los fagos o respectivamente la liberación de los fagos se efectuó a 30 °C y 200 rpm durante una noche. Para el aislamiento de los fagos se utilizó el protocolo descrito por Kay, Winter & McCafferty (1996).
- 1 ml de los fagos aislados (1,4 x 10¹⁴ cfu) se bloqueó con 1 ml de BSA al 6 % en una PBS durante 1 h a la temperatura ambiente (TA). Mientras tanto se revistieron 10 pocillos de una placa de microtitulación (NUNC), que habían sido revestidos durante una noche a la TA con 100 µl de una solución 10 µg/ml de la IgG-Fc monoclonal (de Roche) en una PBS, y se lavaron tres veces con una PBS; Tween 20 al 0,1 %. A continuación, los sitios de fijación libres de los pocillos se bloquearon con en cada caso 300 µl de una PBS (BSA al 3 %, Tween 20 al 0,5 %) durante 2 h a la TA. A esto siguió un lavado repetido tres veces de los pocillos con una PBS (Tween 20 al 0,1 %). Después de una adición de en cada caso 100 µl de los fagos bloqueados por cada pocillo se efectuó una incubación durante 1 h a la TA y 20 rpm. Los fagos no fijados o respectivamente fijados débilmente se eliminaron mediante un lavado repetido 2 veces con 2 x PBS, un lavado repetido dos veces con 2 x PBS, BSA al 3 % y finalmente repetido 2 veces con 2 x PBS. Los fagos todavía fijados se eluyeron mediante una adición de 100 µl/pocillo de trietilamina 100 mM y una incubación durante 10 min a la TA. Para la neutralización de los fagos eluidos en un medio de carácter básico (en total 1 ml), éstos se mezclaron con 500 ml de Tris 1 M/HCl, de pH 7,4. Después de esto, los pocillos se lavaron tres veces con una PBS.
- Los fagos fijados fuertemente, que habían permanecido en la placa de microtitulación a pesar de la elución con trietilamina, se incubaron directamente para la reinfección con 100 µl de un cultivo de células que crecía exponencialmente (DO₆₀₀ = 0,4) de XL1-Blue durante 30 min a 37 °C. Para la reinfección de unas células XL1-Blue con los fagos eluidos en un medio de carácter básico, se incubaron 750 µl del material eluido neutralizado con 9 ml de células XL-1-Blue con una DO₆₀₀ = 0,4 durante 30 min a 37 °C. A continuación, las células reinfectadas de fagos eluidos en un medio de carácter básico y de fagos fuertemente fijados se reunieron, se sembraron en placas de 16 x 16 cm con un medio SOBAG (inclusive ampicilina) y se incubaron durante una noche a 37 °C. Después de un proceso de rebozamiento se obtuvieron aproximadamente 2.000 clones, que se separaron por anegamiento de las placas con aproximadamente 12,5 ml de un medio 2 x YT; glicerol al 20 % y se conservaron a -80 °C.
- Para la cultivación de los fagos individuales, la agrupación de células obtenida después de la primera ronda de rebozamiento se sembró en placas sobre un medio de selección (SOBAG) y se incubó durante una noche a 37 °C. Desde la placa con SOBAG se transfirieron 92 clones individuales a unas placas de pocillos profundos (del inglés "deep well") de 24 x 5 ml con en cada caso 2 ml/pocillo del medio 2 x YT con glucosa al 2 % y 100 µg/ml de Amp y se incubaron durante una noche a 37 °C y 180 rpm. Adicionalmente, por cada placa se condujo concomitantemente una colonia individual (X11-blue) con el gen para la gamma cristalina humana de tipo silvestre en el vector fagémido como testigo. Unas placas de pocillos profundos, de 24 x 5 ml, estériles, se inocularon con en cada caso 2,5 ml/pocillo del medio 2 x YT con glucosa al 2 % y 100 µg/ml de Amp con un inóculo al 1 % del cultivo durante una noche, y los cultivos de bacterias se incubaron a 37 °C y 180 rpm hasta una DO₆₀₀ de aproximadamente 0,4. A continuación, los cultivos se infectaron con 2,5 µl por cada pocillo de fagos ayudadores M13K07 con 10¹³ cfu/ml y se incubaron durante 1 h a 37 °C y 100 rpm. A continuación, las bacterias se sedimentaron mediante centrifugación, el material sobrenadante se desechó y los sedimentos se resuspendieron en 2,5 ml por cada pocillo del medio 2 x YT, GSH 8 mM, 100 µg/ml de ampicilina, 50 µg/ml de kanamicina y se incubaron durante una noche a 30 °C y 200 rpm. Para la obtención del material sobrenadante de los fagos se efectuó una centrifugación de las placas a 4.600 rpm. La precipitación y la sedimentación de los fagos se llevaron a cabo tal como ha sido descrito por Kay, Winter & McCafferty, y el sedimento de los fagos se resuspendió en aproximadamente 200 µl de una PBS, BSA al 3 %, de pH 7,4. Mediante este modo de proceder los fagos se pudieron concentrar y emplear a continuación en un ELISA.
- Para esto, los pocillos de una placa NUNC se revistieron con 100 µl de una solución de antígeno (10 µg/ml de una IgG-Fc monoclonal humana, o respectivamente BSA) durante una noche a 4 °C. La placa de ELISA se incubó al día siguiente con un tampón de bloqueo (una PBS, BSA al 3 %, Tween 20 al 0,1 %, de pH 7,4) durante 2 h a la temperatura ambiente. Después de haber lavado los pocillos con un tampón de lavado (una PBS, Tween 20 al 0,1 %, de pH 7,4), se introdujeron en cada caso 100 µl de los preparados de fagos en los pocillos y se incubaron durante 1 h a la TA. Después de un lavado renovado de los pocillos con un tampón de lavado (una PBS, Tween 20 al 0,1 %, de pH 7,4), el anticuerpo monoclonal anti-M13 (conjugado con una POD; de MoBiTec, Göttingen) se aplicó en una dilución de 1:5.000 en una PBS, de pH 7,4 (100 µl/pocillo) y se incubó otra vez durante 1 h a la TA. Después de esto, los pocillos se lavaron 3 x (veces) con un tampón de lavado (una PBS, Tween 20 al 0,1 %, de pH 7,4) y 3 x con una PBS, y la reacción cromática se inició con TMB Plus (de Kementec, Dinamarca) (100 µl/pocillo). Después de 20 minutos, la reacción cromática se interrumpió mediante una adición de H₂SO₄ 0,2 M. La coloración de amarillo obtenida se registró por lectura a 450 nm (longitud de onda de referencia: 620 nm) y se documentó.
- A partir de los preparados de fagos, que mostraron una señal nítida en lo que respecta a la fijación a una IgG-Fc monoclonal y una fijación apenas detectable a BSA, los genes de las variantes de gamma II cristalina se

secuenciaron con el cebador pCAN700. Tres clones SPC1-A1, SPC1-A7 y SPC1-G3 resultantes a partir de esto se cambiaron de clonación en el vector de expresión pET20b a través de los sitios de corte por restricción con NcoI y BstEII y se introdujeron en la cepa de expresión BL21(DE3), pUBS520 (de Stratagene).

5 Las células se cultivaron en un medio 2 x YT con 100 µg/ml de ampicilina y 50 µg/ml de kanamicina hasta llegar a una densidad óptica de $DO_{600} = 0,6 - 0,8$ a 37 °C y 200 rpm, y a continuación se indujo la expresión de la proteína recombinante con IPTG (concentración final 1 mM). Después de un crecimiento durante cuatro horas a 30 °C y 200 rpm, las células se cosecharon mediante centrifugación (a 6.000 x g, 20 min, 4 °C). La disgregación se efectuó en un tampón de NPI-10 (de Qiagen) por medio de lisozima (0,1 mg/ml) y ultrasonidos (6 X 15 s, mediando enfriamiento con hielo) en presencia de beta-mercaptoetanol 5 mM. Después de una centrifugación (a 40.000 x g, 30 min, 4 °C) el material sobrenadante se aplicó sobre una columna con IMAC (HiTrap Chelating HP, de Amersham Bioscience) y se lavó con NPI-20 (Qiagen, + beta-mercaptoetanol 5 mM) (20 volúmenes de la columna). La elución se efectuó mediante un gradiente lineal con NPI-500 (Qiagen, + beta-mercaptoetanol 5 mM) en 30 volúmenes de la columna. Las fracciones, que contienen gamma II cristalina se analizaron mediante SDS-PAGE, se agruparon unas muestras correspondientes y se aplicaron sobre una columna de filtración a través de un gel (1,6 x 60, Sephadex 75, de Amersham Biosciences). Como tampón de elución sirvió una PBS, con una velocidad de circulación de 0,75 ml/min. El análisis de la filtración a través de un gel se efectuó mediante una SDS-PAGE, las fracciones que contenían gamma II cristalina se reunieron y se conservaron a 4 °C. Las variantes de Affilin™ tenían después de este proceso de purificación una pureza de >95 % (SDS-PAGE).

20 Las propiedades de fijación de las proteínas purificadas se ensayaron seguidamente tal como se ha descrito más arriba en un ELISA dependiente de la concentración. En este caso, se emplearon diferentes concentraciones (100 nM - 10 µM) de las variantes de Affilin™ y se empleó un anticuerpo anti-gamma II cristalina (un conjugado de anticuerpo monoclonal con POD) como anticuerpo de detección. En este caso, se puso de manifiesto que todas las tres variantes de Affilin™ ensayadas poseen una fijación específica frente a la IgG-Fc humana y que no era detectable una fijación inespecífica al BSA o a la placa de microtitulación. La gamma II cristalina humana de tipo silvestre conducida concomitantemente como testigo no mostró ninguna fijación a la IgG-Fc, a BSA o a la placa de microtitulación.

25 En unos experimentos según BIACORE se determinaron las constantes de disociación de las tres variantes de Affilin™. Para esto se inmovilizaron sobre un chip de CM5 aproximadamente 180 RU de una IgG-Fc humana (50 µg/ml en citrato de Na 50 mM, de pH 5,0). Los sitios de fijación libres se desactivaron finalmente mediante etanolamina 1 M (de pH 8,5).

30 En el caso de un caudal de circulación de 30 µl/min se condujeron seguidamente 6 concentraciones diferentes (166 nM - 1µM) durante 180 s a través del chip. A continuación, el chip se enjuagó con HBS, Surfactant P20 al 0,005 % (de Biacore) con el mismo caudal de circulación durante 180 s. A partir de los sensogramas resultantes, con ayuda del software BiaEvaluation (de Biacore, Uppsala, Suecia) se determinan las siguientes constantes de disociación de las variantes de Affilin™ frente a una IgG-Fc: SPC1-A1 con 230 nM, SPC1-A7 con 280 nM y SPC1-G3 con 800 nM. En unos experimentos de competición se pudo detectar la fijación específica de las variantes de Affilin™ a una IgG-Fc y no a la matriz del chip (Fig. 2).

35 Análogamente a la selección de las variantes SPC1-A1, SPC1-A7 y SPC1-G3 se aisló la variante Affilin™ SPC7-E9 frente a la molécula diana proNGF. La constante de disociación se pudo determinar con ayuda de mediciones según BIACORE con 1-6 nM (Fig. 3).

Ejemplo 2

40 Selección de variantes de Affilin™ a partir de la biblioteca de ubiquitina humana (UB10) frente a una proteína de nudo de cisteína - expresión y purificación

Puesta a disposición de un gen artificial de ubiquitina para la selección de proteínas modificadas con una afinidad de fijación generada de nuevas

45 Los trabajos de tecnología genética se llevaron a cabo, siempre y cuando que no se haya indicado otra cosa distinta, según unos protocolos clásicos habituales para un experto en la especialidad tales como p.ej. el de Sambrook y colaboradores (1989).

50 Para la producción de la secuencia de ADN (SEQ ID NO: 25) para un entramado proteínico modificado de ubiquitina con las sustituciones Ile44Ala, Lys48Arg, Arg54Leu, Val70Ala, Arg72Leu, Gly75Ala, así como con la supresión Gly76, como punto de partida para la obtención de unas proteínas fijadoras artificiales se procedió de la siguiente manera: Para la síntesis del gen se llevó a cabo una reacción de PCR en un volumen de 50 µl, en el que estaban presentes como moldes en cada caso 2,5 µl de los seis oligodesoxinucleótidos (SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31; en cada caso 0,1 µM), que representan en su orden de sucesión de los pares de bases en total al gen que ha de ser sintetizado. Las secuencias de los oligodesoxinucleótidos empleados correspondían en cada caso a unos segmentos con una longitud de 40 hasta 50

pares de bases de la cadena de ADN codificadora o respectivamente no codificadora del gen artificial, y se solapaban alternadamente junto sus extremos de 3' y 5' con aproximadamente 15 bases. Adicionalmente, la tanda contenía en cada caso 2,5 µl de unos cebadores flanqueadores ((SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33; 10 µM) así como 5 µl de un tampón 10 x Taq (Tris/HCl 100 mM, de pH 9,0, KCl 500 mM, Triton X-100 al 1 % (v/v)), 3 µl de MgCl₂ 25 mM y 4 µl de una mezcla de dNTP's (dATP, dCTP, dGTP, dTTP en cada caso 2,5 mM). Después de haber rellenado con H₂O la tanda de reacción se calentó en el termociclador con el fin de efectuar una desnaturalización durante 2 min a 94 °C. Luego se añadieron en caliente 2,5 U de la polimerasa de Taq (de Promega) (Hot Start = inicio caliente) y se inició el programa de PCR. En 25 ciclos se incubó en cada caso durante 1 min a 94 °C, durante 1 min a 55 °C y durante 1,5 min a 72 °C. Se efectuó una incubación final durante 5 min a 72 °C.

El deseado producto de la PCR se identificó mediante una electroforesis analítica a través de un gel de agarosa y se purificó a partir de la tanda con ayuda del estuche MinElute Reaction Cleanup-Kit (de Qiagen). 1,0 ng del ADN aislado se utilizaron como un molde para una segunda amplificación, que esta vez se realizó mediando utilización de la polimerasa de Pfu (de Promega) asimismo en un volumen de 50 µl. Para esto se utilizaron 5 µl del tampón 10 x Pfu suministrado concomitantemente (Tris/HCl 200 mM, de pH 8,8, MgCl₂ 20 mM, KCl 100 mM, (NH₄)₂SO₄ 100 mM, Triton X-100 al 1 % (v/v), 1 mg/ml de BSA) así como 4 µl de una mezcla de dNTP's y se rellenó con H₂O. Adicionalmente, la tanda contenía unos cebadores flanqueadores (SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33; 10 µM) para la introducción de unos adecuados sitios de corte. El deseado producto de la PCR se aisló mediante una electroforesis preparativa a través de un gel de agarosa y se insertó con ayuda del estuche Zero Blunt® TOPO® PCR Cloning Kit (de Invitrogen) según los datos del fabricante en el vector de clonación pCR®4Blunt-TOPO®. Con la correspondiente tanda de reacción de ligación se transformaron unas células químicamente competentes suministradas concomitantemente y se sembraron sobre una placa de agar con un medio de LB/Amp/Kan. La placa se incubó durante 16 horas a 37 °C, y las colonias que habían crecido se analizaron en lo que respecta al deseado producto de ligación. Para esto, un ADN plasmídico se preparó a la mini-escala con ayuda del estuche de aislamiento de plásmidos de la entidad Qiagen según los datos del fabricante y se sometió a una digestión por restricción con las endonucleasas de ADN NdeI y XhoI (de New England Biolabs), cuyas secuencias de reconocimiento habían sido introducidas por los cebadores flanqueadores en el producto de la PCR. Con unos plásmidos, que tenían el modelo de corte esperado, se llevó a cabo un análisis de la secuencia de ADN en la región del casete de gen insertado con ayuda de la polimerasa de ADN Taq. En este caso, se utilizaron el estuche CycleReader™ AutoDNA Sequencing Kit (de Fermentas) según los datos del fabricante, así como 0,5 µg de un ADN plasmídico y 1,0 pmol del correspondiente cebador marcado por fluorescencia. La cadena de ADN sintetizada de nuevas en este caso se marcó durante la reacción de la polimerasa y se terminó estadísticamente, pero de un modo específico para una base, mediante la incorporación de di-desoxinucleótidos. Los fragmentos de ADN fluorescentes resultantes se separaron a continuación en un autómata secuenciador del Licor (líquido de tratamiento) mediante una electroforesis a través de un gel de poliacrilamida y urea y se hizo visible como un modelo de bandas para A, C, G y T en unas trazas contiguas.

Los casetes de genes con la secuencia correcta de ADN se cortaron mediante una digestión preparativa por restricción con NdeI/XhoI desde el vector de clonación pCR®4Blunt-TOPO® y se aislaron mediante una electroforesis preparativa a través de un gel de agarosa. La inserción del gen para el entramado proteínico modificado de la ubiquitina se efectuó en el vector de expresión pET20B(-) (de Novagen) para la producción de la correspondiente proteína o respectivamente en el vector fasmídico pMUBI-1 para la construcción de una biblioteca de variantes de ubiquitina.

45 Producción de una biblioteca de variantes de ubiquitina

Para la mutagénesis aleatoria dirigida a un sitio de 8 codones en el extremo terminal de amino o respectivamente en el de carboxi del gen sintético de la ubiquitina se llevaron a cabo dos reacciones consecutivas de PCR. La primera etapa de amplificación tuvo lugar mediando utilización de la polimerasa de Pfu (de Promega) en un volumen de 10 x 50 µl. Para esto, por cada tanda se utilizaron 5 µl del tampón 10 x Pfu suministrado concomitantemente así como 4 µl de una mezcla de dNTP's y se rellenó con H₂O. Además, la tanda contenía en cada caso 2,5 µl de unos cebadores flanqueadores (SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35; 10 µM) para la introducción de los deseados intercambios de pares de bases. Como moldes se utilizaron 1,0 ng de pMUBI-1, que llevaba el gen sintético no mutado de la ubiquitina. Después de una adición de 2,5 U de la polimerasa de Pfu (véase más arriba) se incubó en 25 ciclos durante en cada caso 1 min a 94 °C, 1 min a 60 °C y 1,5 min a 72 °C. Se efectuó una incubación final durante 5 min a 72 °C. Para la degradación selectiva del ADN de matriz empleado se añadieron por cada tanda de reacción 10 U de DpnI y se incubó durante 1 hora a 37 °C. El deseado producto de la PCR se aisló por medio de una electroforesis preparativa a través de un gel de agarosa y del estuche QIAquick Gel Extraction Kit (de Qiagen).

La segunda etapa de amplificación se llevó a cabo en una tanda de 1.000 µl, utilizándose aproximadamente 1,0 ng del producto obtenido en la primera etapa de PCR y la polimerasa de Taq. La tanda de reacción - adaptada a un volumen 20 veces mayor - se pipeteó tal como se ha expuesto más arriba desde un tampón 10 x Taq, con MgCl₂ 25 mM, una mezcla de dNTP's así como los cebadores flanqueadores (SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37; 10 µM), que habían sido biotinilados junto a sus extremos 5' y que llevaban en cada caso unas secuencias de reconocimiento no compatibles entre sí para la endonucleasa SfiI. Después de haber rellenado con H₂O, se añadieron 2,5 U de la

polimerasa de Taq en caliente (véase más arriba) y se inició el programa de PCR. En 25 ciclos se incubó durante en cada caso 1 min a 94 °C, 1 min a 60 °C y 1,5 min a 72 °C. Se efectuó una incubación final durante 5 min a 72 °C.

5 La disociación subsiguiente del producto de amplificación obtenido se efectuó directamente en la tanda de reacción de PCR. Para esto, en un volumen total de 4.000 µl se mezcló la solución completa de la reacción de PCR con el correspondiente volumen del tampón 10 x II (Tris/HCl 100 mM, de pH 7,9, MgCl₂ 100, NaCl 500 mM, ditiotreitól 10 mM) suministrado concomitantemente, una solución de 10 x BSA y H₂O. Además se añadieron 4.000 U de la enzima de restricción Sfil (de New England Biolabs) y se incubó durante 16 horas a 50 °C. El ADN se aisló a partir de la tanda con ayuda del estuche MinElute Reaction Cleanup Kit (de Qiagen) y se recogió en 400 µl de H₂O estéril.

10 Para la separación del producto de la PCR no cortado con Sfil, el ADN aislado se mezcló con el mismo volumen de una "Binding-Solution" [solución de fijación] (de Dynal), que contenía 1,0 mg/ml de bolitas magnéticas con estreptavidina acoplada a la superficie ("Dynabeads Kilobase Binder"), y se incubó durante 4,5 horas en un mezclador de rodillos a la temperatura ambiente (TA). Las bolitas se precipitaron con el ADN, que eventualmente estaba todavía presente, mientras que el ADN cortado completamente con Sfil, que ya no debería tener ningún extremo biotinilado, permaneció en el material sobrenadante y se precipitó durante una noche. El gen de ubiquitina disociado con Sfil y mutagenizado en las posiciones deseadas obtenido de esta manera, se disolvió en H₂O estéril, se desalinizó de nuevo con ayuda del estuche QIAquick PCR Purification Kit (de Qiagen) y tenía finalmente una concentración de 200 fmol/µl en H₂O.

20 Para la preparación previa del vector receptor, el fasmido pMUBI-1 se cortó con Sfil según los datos del fabricante y el fragmento (del vector) más grande se aisló mediante una electroforesis preparativa a través de un gel de agarosa y con el QIAquick PCR Extraction Kit (de Qiagen). Con el fin de impedir una ligación intramolecular, se desfosforilaron sus extremos de 5'. Para esto se utilizaron 0,5 U de la fosfatasa alcalina de gamba (*Pandalus borealis*) así como el tampón concomitantemente suministrado en un volumen total de 200 µl. La mezcla se incubó durante 90 min a 37 °C, el ADN se aisló a partir de la tanda con ayuda del QIAquick PCR Purification Kit (de Qiagen) y se desalinizó otra vez (con el QIAquick PCR Purification Kit). El ADN del fragmento de vector tenía finalmente una concentración de 50 fmol/µl en H₂O.

30 Para la ligación se incubaron 1,6 pmoles del fragmento de PCR y 8,0 pmoles del fragmento del vector de pMUBI-1 en presencia de 2 U de la ligasa de ADN T4 (de GibcoBRL) en un volumen total de 1.600 µl (Tris/HCl 50 mM, de pH 7,6, MgCl₂ 10 mM, ATP 1 mM, DTT 1 mM, PEG-8.000 al 5 % (p/v)) durante tres días a 16 °C. Después del calentamiento de la tanda a 65 °C, el ADN se precipitó durante 15 min. Para esto, en cada caso 100 µl de la solución de reacción se mezclaron con 100 µl de etanol así como con 10 µl de NaAc 5 M, de pH 3,0, y se almacenaron durante 16 horas a -20 °C. A continuación, se centrifugó (durante 60 min, a 12.500 g), se lavó con etanol (al 70 % v/v, a -20 °C), se centrifugó de nuevo y el ADN precipitado se disolvió finalmente en 60 µl de H₂O estéril.

40 Para la electroporación se utilizaron el sistema Gene Pulser[®] II (de Biorad) así como unas cubetas con una distancia entre los electrodos de 1,0 mm (de Biozym) a 4 °C en la cámara frigorífica. Con en cada caso 3,5 µl de la solución arriba obtenida se transformaron unas células *E. coli* XL1Blue electrocompetentes (de Stratagene) según los datos del fabricante. La suspensión de células obtenida se sembró en placas sobre cinco placas de agar (de 20 x 20 cm) con un medio de LB y cloramfenicol. Las placas se incubaron durante 16 horas a 37 °C y se contaron las colonias que habían crecido. La biblioteca construida contenía conforme a ello 2,8 x 10⁷ clones independientes, cada uno de los cuales debería estar presente 10.000 veces en la biblioteca. Las colonias se lavaron entonces por anegamiento con 100 ml en total del medio SOC con glicerol al 10 % (v/v = volumen/volumen) y se almacenaron en partes alícuotas de 1,0 ml a -80 °C. A partir de los clones obtenidos, con ayuda del estuche DNA-Miniprep Kit de la entidad Qiagen, se aislaron 12 vectores fasmídicos seleccionados arbitrariamente y se analizó la secuencia de ADN en la región del gen mutagenizado de la ubiquitina. En este caso, todos los clones tenían unas secuencias funcionales - es decir ningún desplazamiento del marco de lectura por inserciones o supresiones - así como unas sustituciones totalmente diferentes cualitativamente junto a las posiciones mutagenizadas. No se presentó ningún intercambio aleatorio fuera de las regiones mutagenizadas.

50 Sobre el fundamento de esta biblioteca, basándose en la ubiquitina humana, de una manera análoga al Ejemplo 1, mediante el método conocido para un experto en la especialidad del sistema de presentación por fagos, se llevó a cabo una selección. Unas desviaciones más pequeñas resultaron solamente en relación con la selección del antibiótico utilizado (cloramfenicol en lugar de ampicilina).

60 Como diana sirvió un factor de crecimiento de la familia de las proteínas de nudo de cisteína. La ubiquitina Affilin[™] SPU11-3-A1 tenía una constante de disociación, determinada en el ELISA, situada en la región de los nM, y se utilizó para los estudios de acoplamiento en el sistema BIACORE.

Una de las variantes seleccionadas a partir de éstas, la SPU11-3-A1, se introdujo por clonación en el vector de expresión pET20b a través de los sitios de corte por restricción con NdeI y XhoI. Las condiciones de cultivo y el procedimiento de purificación fueron idénticas(o) a las (al) de la SPC Affilin[™] (IMAC, filtración a través de gel), tal como se ha expuesto en el Ejemplo 1. Para la detección de las propiedades de fijación se llevó a cabo un ELISA dependiente de la concentración. En este caso, se aplicaron diferentes concentraciones (10 nM - 1 µM) de la variante de Affilin[™] sobre la placa de microtitulación (MTP) revestida con la molécula diana y se empleó un

antisuero policlonal anti-ubiquitina (de Sigma) como reactivo de detección primario. Después de haber incubado (durante 1 h) a la TA, los pocillos de la MTP se lavaron 3x (veces) con una PBS, y en una segunda etapa se empleó un conjugado de un anticuerpo monoclonal (anti IgG, de Sigma) con una POD como el anticuerpo de detección. En este caso, se puso de manifiesto que la variante de Affilin™ ensayada posee una fijación específica frente al NGF humano, y que era detectable una fijación inespecífica al BSA o a la placa de microtitulación. La ubiquitina humana de tipo silvestre conducida concomitantemente como testigo no mostró ningún tipo de fijación al NGF, al BSA o a la placa de microtitulación.

Ejemplo 3

Fusión en el extremo terminal de C de la Affilin™ con un engarzador peptídico que contiene cisteína, para el acoplamiento selectivo a diferentes moléculas

En el siguiente Ejemplo se muestra que la variante de Affilin™ SPC1-A7, que fija a una IgG-Fc, se podía acoplar selectivamente a diversas moléculas a través de una cisteína situada en el extremo terminal de C.

La variante empleada de Affilin™ SPC1-A7 tiene, junto a las 7 cisteínas localizadas en el interior de la proteína, en la posición variable 4 ya una cisteína accesible para el disolvente y por consiguiente libre. Ésta fue reemplazada primeramente por una serina mediante una QuickChange® PCR. Partiendo de esta Affilin™ modificada (SPC1-A7BB) en el extremo terminal de C se insertaron dos glicinas y una cisteína así como, adicionalmente a las seis histidinas, presentes otras cuatro histidinas mediante una QuickChange® PCR. La marca de afinidad prolongada en 10 histidinas debería servir para una purificación mejorada. En los experimentos de titulación con el reactivo de Ellmann, la cisteína introducida se manifestó como inadecuada para los experimentos de acoplamiento debido a unos sucesos de barajadura de las cisteínas con otras cisteínas presentes en la variante de Affilin™. A causa de esto, la cisteína fue reemplazada en el plano del ADN por una serina (TCT), y partiendo de esta construcción artificial, detrás de un engarzador de Gly₄Ser, se introdujo otra vez una cisteína. Esto debería aumentar la distancia de la cisteína insertada con respecto a las cisteínas en la proteína y reprimir una barajadura de las cisteínas. La construcción artificial resultante se secuenció finalmente y en unos experimentos de titulación con el reactivo de Ellmann se manifestó como adecuada para los experimentos de acoplamiento.

Para el reemplazo de la cisteína en la posición 4 por una serina en la variante de Affilin™ SPC1-A7 se utilizó el método de la QuickChange® PCR (de Stratagene, La Jolla, EE.UU.) con los cebadores A7Cys4Ser_for y A7Cys4Ser_rev. Para la reacción de PCR se emplearon 5 µl de un tampón de reacción 10 x (KCl 100 mM, (NH₄)₂SO₄ 100 mM, Tris-HCl 200 mM, de pH 8,8, MgSO₄ 20 mM, Triton® X-100 al 1%, 1 mg/ml de BSA), en cada caso 125 ng de los dos cebadores, 1 µl de la polimerasa de ADN Pfu-Turbo, 1 µl de una mezcla de dNTP's y H₂O hasta llegar a un volumen total de 50 µl. Como ADN de molde sirvió el gen de la variante de Affilin™ SPC1-A7 en el vector pET20b. Se comenzó con una primera etapa de desnaturalización durante 3 min a 95 °C. Después de esto, siguieron 18 ciclos repetidos de desnaturalización, adosamiento de los engarzadores y síntesis. La desnaturalización a 95 °C duró 30 s, la adición de los cebadores se efectuó durante 1 min a 60 °C. La duración de la etapa de síntesis fue de 5 min a 68 °C. Al final de la PCR se efectuó una síntesis final durante 5 min a 68 °C. La amplificación se comprobó mediante electroforesis a través de un gel de agarosa. A una amplificación exitosa le siguió una digestión por restricción del ADN de molde empleado con ayuda de la enzima de restricción DpnI. Se añadió con una pipeta 1 µl de la enzima (10 U/µl) a la tanda de PCR, se mezcló y se incubó durante 1 h a 37 °C. El vector se introdujo seguidamente mediante una electroporación en una cepa competente (X1-1blue, de Stratagene). Para esto, 1 µl de la tanda de restricción tratada con DpnI se añadió con una pipeta sobre hielo a 50 µl de células XL-1 blue electrocompetentes, se mezcló y se pulsó en una cubeta de electroporación (de 0,1 mm) enfriada con hielo a 2,5 kV, 25 µF y 200 Ω. Las células se recogieron en 1 ml del medio SOC y se incubaron durante 60 min a 37 °C mediando rebozamiento a 500 rpm. A continuación, las células se sembraron en placas sobre un medio de selección (2 x YT, 100 µg/ml de ampicilina) y se incubaron a 37 °C durante 16 h. A partir de los clones obtenidos se secuenciaron por separado 12 de ellos para el control de la incorporación correcta con el cebador pETTerm. El vector de un clon correcto sirvió como ADN de molde para la siguiente QuickChange® PCR con el fin de efectuar la incorporación en el extremo terminal de C de dos glicinas, una cisteína y cuatro histidinas adicionales. Tal como se ha descrito más arriba, con los dos cebadores A7Gly2Cys_for y A7Gly2Cys_rev se llevaron a cabo una QuickChange® PCR, la subsiguiente digestión con DpnI y la transformación de la cepa XL1-Blue mediante una electroporación. Para el control de la incorporación correcta se secuenciaron por su parte los plásmidos de 12 clones. El plásmido de un clon correcto (SPC-1-A7JJ) se introdujo en la cepa de expresión BL21 con el plásmido pUBS520, con el fin de expresar a continuación la variante de Affilin™ SPC1-A7BB, y tal como se ha descrito más arriba (en el Ejemplo 1), purificarla en dos etapas de cromatografía (cromatografía por afinidad en presencia de Ni-NTA y filtración a través de un gel en presencia de Sephadex 75).

Para la comprobación de la accesibilidad (Haber, 1972) del resto de cisteína introducido deberían ser titulados todos los grupos SH libres con ayuda del reactivo de Ellmann (una solución de DTNB). Para esto, a 1 ml de una solución de una proteína de la variante de Affilin™ SPC1-A7JJ (50 - 350 µg de una proteína en Tris/HCl 100 mM; de pH 8,0), se añadieron 30 µl de una solución de DTNB (4 mg/ml de DTNB en Tris/HCl 100 mM, de pH 8). 1 ml de la solución de proteína con 30 µl de un tampón (Tris/HCl 100 mM, de pH 8) representó el valor de vacío 1. Como valor de vacío 2 sirvió 1 ml de un tampón (Tris/HCl 100 mM, de pH 8) con 30 µl de una solución de DTNB. Las tandas se incubaron

durante 15 min a la temperatura ambiente y se midió la absorción a 410 nm. Las absorciones de los valores de vacío 1 y 2 se restaron de la absorción de la tanda de ensayo. A partir del valor de absorción resultante, con ayuda del coeficiente de extinción de DTNB-SH se calculó la concentración molar de los grupos SH libres ($\epsilon_{410} [\text{DTNB-SH}] = 13.600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) y se dividió por la concentración de la proteína empleada. Como resultado se obtuvo el número de los grupos tiol libres por cada molécula de la proteína. En tal contexto, en el caso la variante construida de Affilin™ SPC1-A7JJ se pudieron titular 3-4 restos de cisteína libres. Se esperaba un resto de cisteína libre, puesto que las cisteínas presentes en la proteína, tal como se comprobó al realizar el control de la titulación con la variante de Affilin™ SPC-1-A7Cys4Ser, no son accesibles. Esto apunta a la posibilidad de una barajadura de cisteínas de la cisteína introducida en el extremo terminal de C con las cisteínas ocultas dentro de la proteína, y por consiguiente a una distancia demasiado pequeña de la cisteína introducida con respecto a la proteína. Debido a esto, la cisteína localizada en el extremo terminal de C de la variante de Affilin™ SPC1-A7JJ fue reemplazada por una serina mediante una QuickChange® PCR tal como se ha descrito más arriba con los cebadores A7Gly2Ser_for y A7Gly2Ser_rev. Después de haber comprobado la incorporación correcta, esta construcción artificial sirvió como molde para una PCR con el fin de efectuar la incorporación de un engarzador Gly4Ser seguido por una cisteína. Con ayuda de los cebadores Gly4SerCys_HindIII y A7Cys4Ser_Nde se llevó a cabo una PCR. Para la reacción de PCR se emplearon 5 µl del tampón de reacción 10 x (KCl 100 mM, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 100 mM, Tris-HCl 200 mM, de pH 8,8, MgSO_4 20 mM, Triton® X-100 al 1 %, 1 mg/ml de BSA), en cada caso 125 ng de ambos cebadores, 1 µl de la polimerasa de ADN Pfu-Turbo, 1 µl de una mezcla de dNTP's y H_2O hasta llegar a un volumen total de 50 µl. Además, para la disolución de unas estructuras secundarias de los cebadores se añadieron 2 µl de DMSO a la mezcla de reacción. Al contrario que en el modo de proceder antes descrito, se llevaron a cabo 25 etapas repetidas de desnaturalización, adosamiento de cebadores y síntesis, y a una temperatura modificada del adosamiento de cebadores de 58 °C. La amplificación del producto de PCR de esta variante de Affilin™ (SPC1-A7_Cys) se comprobó mediante una electroforesis a través de un gel de agarosa. La Tabla 2 reproduce una recopilación acerca de las construcciones artificiales aquí descritas (véase la Tabla 2). En el cebador A7Cys4Ser_Nde se ha integrado un sitio de corte por restricción para la enzima NdeI y en el cebador Gly4SerCys_HindIII se ha integrado un sitio de corte por restricción para la enzima HindIII, con lo cual es posible ligar el producto de la PCR después de su purificación y restricción por medio de las dos enzimas en el vector pET20b tratado asimismo con NdeI y HindIII. La restricción mediante las dos enzimas se llevó a cabo al mismo tiempo en una digestión doble. Para esto se incubaron aproximadamente 1 µg del producto de la PCR de la variante de Affilin™ SPC1-A7_Cys o respectivamente 1 µg del vector pET20b con 1 µl de la enzima de restricción NdeI (de New England Biolabs, Frankfurt am Main, Alemania, 20 U/µl) y 1 µl de la enzima de restricción HindIII (de New England Biolabs, Frankfurt am Main, Alemania, 20 U/µl) así como 10 µl del tampón de reacción 10 x NEB 2 (NaCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM, de pH 7,9, MgCl_2 10 mM, DTT 1 mM) en un volumen total de 100 µl durante 4 h a 37 °C. Los fragmentos resultantes se purificaron por separado mediante una electroforesis preparativa a través de un gel de agarosa. Para la ligación se emplearon 20 ng del fragmento del vector pET20b purificado y tratado con NdeI/HindIII y 120 ng del fragmento tratado de igual manera de la variante de Affilin™ SPC1-A7Cys así como 2 µl del tampón de reacción 10 x (Tris-HCl 300 mM, de pH 7,8, MgCl_2 100 mM, DTT 100 mM, ATP 10 mM) y 0,5 µl de la ligasa de ADN T4 (de Promega, Mannheim, Alemania 1 - 3 U/µl) en un volumen total de 20 µl. La tanda de reacción se incubó durante 16 h a 16 °C y el vector resultante se introdujo tal como se ha descrito más arriba en unas células XL-1 blue mediante una electroporación. La introducción correcta del gen fue controlada por 12 clones obtenidos después de la transformación mediante secuenciación con el cebador pETTerm. Unas células E. coli (BL21(DE3), + pUBS520) se transformaron a continuación con el vector de la variante de Affilin™ SPC1-A7_Cys con una secuencia correcta. Después de una expresión y una purificación tal como se ha descrito para la variante de Affilin™ SPC1-A7 (Ejemplo 1), para la variante de Affilin™ SPC1-A7_Cys, por su parte, tal como se ha descrito más arriba, se titularon los restos de cisteína libres con ayuda del reactivo de Ellmann. En este caso, tal como se esperaba, sólo pudo ser detectado un resto de cisteína, con lo cual se confirmó la incorporación exitosa de una cisteína en el extremo terminal de C, accesible para el disolvente, a una distancia suficiente con respecto de la proteína para el acoplamiento selectivo a unos correspondientes partícipes (véase la Tabla 1). Esta detección de una cisteína accesible individual constituye el fundamento para el acoplamiento selectivo de Affilin™ a unos partícipes en el acoplamiento y unas matrices adecuados/as.

Con el fin de proveer a la Affilin™ SPU11-3-A1 de una cisteína en el extremo terminal de C, se introdujo por clonación el gen para SPU11-3-A1 en el pET20b modificado para la Affilin™ SPC1-A7 (véase más arriba) a través de los sitios de corte por restricción con NcoI y XhoI. La expresión y la purificación de la Affilin™ SPU11-3-A1_Cys se realizaron idénticamente al modo de proceder como en el caso de SPC1-A7_Cys.

Ejemplo 4

Análisis de las propiedades de fijación de la variante de Affilin™ SPC1-A7_Cys modificada con un engarzador peptídico (con una cisteína en el extremo terminal de C)

Las propiedades de fijación de la Affilin™ SPC1-A7_Cys purificada como en el Ejemplo 3 se ensayaron en un ELISA dependiente de la concentración. Para esto, los pocillos de una placa NUNC se revistieron con 100 µl de una solución de un antígeno (10 µg/ml de la parte Fc de una IgG monoclonal humana, de Roche) durante una noche a 4 °C. La placa de ELISA se bloqueó al día siguiente con una PBS (BSA al 3 %, Tween 20 al 0,5 %) durante 2 h a la temperatura ambiente. Después de haber lavado los pocillos con una PBS (Tween 20 al 0,1 %), la Affilin™

modificada se añadió de un modo dependiente de la concentración a los pocillos (intervalo de concentraciones 10 μM - 0 μM) y se incubó durante 1 h a la TA. Después de haber lavado de nuevo los pocillos con una PBS (Tween 20 al 0,1 %) se aplicó el anticuerpo monoclonal anti-hGC (conjugado con POD; de Biogenes, Berlín) en una dilución de 1:1.000 (50 μl /pocillo) y se incubó otra vez durante 1 h a la TA. Después de esto, los pocillos se lavaron con 3 x PBS (Tween 20 0,1) y 3 x PBS y se inició la reacción cromática con TMB Plus (de Kementec, Dinamarca) (50 μl /pocillo). Después de haber incubado durante 20 minutos a la temperatura ambiente, se interrumpió la reacción cromática mediante una adición de H_2SO_4 0,2 M (50 μl /pocillo). La tinción de amarillo obtenida se registró por lectura a 450 nm (longitud de onda de referencia: 620 nm) y se documentó (véase la Fig. 4). La evaluación de los puntos de medición proporcionó un valor de KD aparente de 233 nM, que corresponde aproximadamente al de las Affilin™ SPC1-A7 y SPC1-A7BB no modificadas (280 nM). Por consiguiente, la modificación en el extremo terminal de C de la Affilin™ SPC1-A7 con un engarzador peptídico, inclusive una cisteína, no tiene ninguna repercusión sobre la capacidad de fijación de la variante.

Ejemplo 5

Acoplamiento selectivo de la Affilin™ SPC1-A7_Cys, que fija a una IgG, con la ficoeritrina (PE)

El acoplamiento de la Affilin™ SPC1-A7_Cys, que fija a IgG, a una PE activada se llevó a cabo como sigue:

1 mg/ml de SPC1-A7_Cys (en una PBS) se redujeron con DTT 10 mM durante 30 min a la temperatura ambiente. Durante la fase de reducción, una columna con PD-10 (de Amersham Biosciences) se enjuagó con 5 volúmenes de la columna de una PBS. Después de haberse efectuado la reducción, la mezcla de reacción se añadió a la columna con PD-10 equilibrada, con el fin de separar el DTT en exceso. La SPC1-A7_Cys reducida de esta manera se mezcló en la relación molar de 5:1 con una ficoeritrina activada con maleinimida (de Prozyme) y se incubó durante 1 h a la temperatura ambiente mediando un ligero sacudimiento. Después de esto, los grupos sulfhidrilo libres de la Affilin™, que no habían reaccionado, fueron bloqueados mediante una adición de NEM (N-etil-maleinimida) durante 20 min a la TA. La mezcla de reacción se purificó a continuación mediante una filtración a través de un gel (Sephadex S-200 HR) y las correspondientes fracciones se reunieron y se almacenaron a 4 °C. El análisis del conjugado se efectuó por espectroscopía. Para esto, se registraron los espectros de absorción en el intervalo de 250-750 nm y las concentraciones de PE y Affilin™ se determinaron a través de los coeficientes de extinción determinados o respectivamente suministrados concomitantemente. El conjugado obtenido de esta manera a base de Affilin™ SPC1-A7_Cys y de PE (SPC1-A7_Cys_PE) se investigó en el BIACORE en cuanto a sus propiedades de fijación frente a una IgG-Fc. Para esto, en el caso de un caudal continuo de circulación de 30 $\mu\text{l}/\text{min}$ y con HBS-EP como tampón de elución, se utilizó un chip de CM5 acoplado con la IgG-Fc. Consecutivamente se condujeron diferentes concentraciones de SPC1-A7_Cys-PE a través del chip y los sensogramas obtenidos se analizaron con el software BIACORE-Evaluation. En este caso se puso de manifiesto que mediante el acoplamiento se obtuvo un efecto de avidéz, que se manifestaba en una disminución de la constante de disociación macroscópica desde $K_D=10^{-7}$ M hasta $K_D=10^{-8}$ M (véase la Fig. 5).

Ejemplo 6

Acoplamiento inespecífico del colorante fluorescente Oyster® 556 a la Affilin™ SPC1-A7BB, que fija a una IgG

El colorante fluorescente Oyster® 556 (de Molecular Probes) se acopló a la Affilin™ SPC1-A7BB que fija a una IgG, (sin ninguna cisteína libre!) y se llevaron a cabo unas investigaciones acerca de la fijación.

El proceso de acoplamiento se realizaba de la siguiente manera: 1 mg/ml de SPC1-A7BB se mezcló en un tampón de fosfato 10 mM (de pH 8,5) en la relación molar 1:2 con el colorante fluorescente Oyster® 556 (disuelto en 20 μl de DMF seca) y se incubó durante 30 min a la TA. La reacción de acoplamiento se interrumpió mediante una adición de 1 volumen de una solución al 10 % de glicina y la tanda se purificó a través de una columna con PD-10. El grado de acoplamiento se cuantificó a continuación de esto por espectrometría. Para esto, la concentración del conjugado se determinó a través de la absorción a 280 nm y se corrigió con un factor de corrección suministrado concomitantemente (de Molecular Probes). El grado de acoplamiento resultó entonces a partir del cociente de las concentraciones del Oyster® 556 y del conjugado y se pudo determinar con 1 molécula de Affilin™/0,8 moléculas de Oyster® 556. El análisis de la capacidad de fijación del conjugado obtenido de esta manera se efectuó mediante un ELISA dependiente de la concentración (para la realización véase el Ejemplo 1), así como mediante unas mediciones con el BIACORE (véase la Fig. 6). Se pudo mostrar que la capacidad de fijación de la Affilin™ SPC1-A7BB no es perjudicada después del acoplamiento con el colorante fluorescente Oyster®.

Ejemplo 7

Acoplamiento inespecífico de la enzima peroxidasa de rábano rústico (POD) a la Affilin™ SPC1-A7BB, que fija a una IgG

La variante de Affilin™ SPC1-A7BB se podía acoplar inespecíficamente con la enzima POD y unos estudios de fijación mostraron la conservación de la actividad de fijación de la Affilin™ así como de la actividad enzimática de la POD. El conjugado se preparó según el siguiente protocolo:

- 5 5 mg de la peroxidasa liofilizada de rábano rusticano (POD, de Sigma) se disolvieron en 250 µl de agua purísima, se mezclaron con 37,5 µl de una solución de peryodato de sodio 0,1 M, y se incubaron durante 10 min a 20 °C. Después de esto, se añadieron 25 µl de etilenglicol y se incubaron durante otros 5 min a 20 °C. La peroxidasa se dializó mediante una filtración a través de un gel (G25, columna con NAP-5) frente a agua purísima.
- 10 250 µl de Affilin™ SPC1-A7BB purificada (IMAC, filtración a través de un gel, 4 mg/ml de una PBS) se mezclaron con 100 µl de un tampón de carbonato 0,1 M (de pH 9,6) y se añadió 1 mg de la peroxidasa activada (de Sigma) (aproximadamente 100 µl). La mezcla de acoplamiento se incubó mediando agitación durante 2 h a 20 °C. A continuación, por cada ml de la mezcla de acoplamiento se añadieron 10 µl de borohidruro de sodio 0,5 M, se mezcló brevemente y se incubó durante otras 2 h a 4 °C sin agitación. La tanda de reacción fue sometida a un cambio de tampón por una PBS con una columna con G25. Para la conservación se añadió Thiomersal al 0,1 % (de Roth). La investigación de la actividad de fijación del conjugado a la IgG humana se realizó de la siguiente manera:

15 La Affilin™ marcada se diluyó en una PBS (BSA al 0,5 %, Tween 20 al 0,05 %, Thiomersal al 0,01 %) y las soluciones se aplicaron sobre una placa de microtitulación revestida con una IgG humana (10 mg/ml, 100 ml/ml). El período de tiempo de incubación fue de 1 h a la temperatura ambiente. A continuación, los pocillos se lavaron 3 veces con en cada caso 250 µl de una PBS (Tween 20 al 0,1 %, Thiomersal al 0,01 %) y se incubó de nuevo con 100 µl de TMB durante 10 - 20 min a la temperatura ambiente. La reacción se finalizó mediante una adición de 100 µl de ácido sulfúrico 0,5 M. La absorción (a 450 nm frente a 620 nm de referencia) se midió en un fotómetro para placas de microtitulación (Fig. 7). Se pudo detectar una actividad de POD hasta una dilución de 1:10.000 de la tanda de reacción, lo que demuestra el acoplamiento exitoso de una POD a la SPC1-A7BB. Mediante unas mediciones de testigo se pudo excluir que una POD no acoplada falsifique las señales.

Ejemplo 8

- 30 Acoplamiento específico e inespecífico de una Affilin™ basada en gamma II cristalina y ubiquitina a unas matrices

El acoplamiento de Affilin™ a unas matrices se pudo realizar con los siguientes métodos:

- 35 1.) Acoplamiento de Affilin™ SPU3-A1_Cys a través de una cisteína localizada en el extremo terminal de C a una matriz de dextrano 2.) Acoplamiento de la Affilin™ SPC7-E9 a través de grupos amino primarios a la matriz de dextrano del sistema BIACORE y 3.) Acoplamiento inespecífico de la Affilin™ SPC7-E9 con ayuda de EDC/NHS a una matriz de un polimetacrilato.

40 1.) El acoplamiento de SPU3-A1_Cys a la matriz de dextrano del sistema BIACORE se realizó selectivamente a través de la cisteína introducida en el extremo terminal de C. Para esto, los grupos carboxilo de la matriz de dextrano se activaron con NHS/EDC con un período de tiempo de contacto de 2 min y a continuación se mezclaron con el reactivo de acoplamiento de tiol PDEA (2-(2-piridinil-ditio)etanamina, en un tampón de borato 0,1 M, de pH 8,5). Después de un período de tiempo de reacción de 4 min se añadió una SPU3-A1_Cys purificada (en un tampón de fosfato 20 mM, de pH 6,0) al chip de dextrano modificado de esta manera y la reacción se continuó durante 7 min. La desactivación de los grupos PDEA no convertidos químicamente se llevó a cabo con L-cisteína 50 mM (NaCl 1 M) durante 4 min. Con este método 350 unidades (RU) de SPU3-A1_Cys se pudieron inmovilizar sobre el chip y se aprovecharon para otros análisis cinéticos. Después de unas mediciones cinéticas, el chip se regeneró con glicina 0,1 (de pH 2,2), Gua/HCl 6 M, urea 6 M y etanol al 20 %. La afinidad de fijación del chip de Affilin™ permaneció conservada también después de 20 - 30 ciclos de regeneración (véase la Fig. 8).

50 2.) Además, la SPC7-E9 se pudo acoplar inespecíficamente a través de unos grupos amino (lisinas) expuestos sobre la superficie con NHS/EDC a los grupos carboxilo de la matriz de dextrano del BIACORE de la siguiente manera: El chip de CM5 se activó durante 7 min con NHS/EDC y a continuación se condujo a través del chip una SPC7-E9 purificada (en un tampón de fosfato de Na 20 mM, de pH 6,0) durante otros 7 min. Después de haberse efectuado el acoplamiento, se desactivaron los grupos reactivos restantes con etanolamina 1 M. Para el análisis de las constantes de disociación, la diana proNGF se condujo en diferentes concentraciones a través del chip, la fijación se vigiló online (véase la Fig. 9) y las curvas se evaluaron a continuación con el software BiaEvaluation. El valor de K_D se pudo determinar de esta manera como de 1,4 nM. Después de unas mediciones cinéticas, el chip se regeneró con glicina 0,1 (pH 2,2), HCl 10 mM, NaOH 10 mM, Gua/HCl 6 M, urea 6 M y etanol al 20 %. La actividad de fijación del chip con Affilin™ permaneció conservada también después de varios ciclos de regeneración.

65 3.) La proteína SPC7-E9 purificada (4 mg) fue sometida a un cambio de tampón a través de una columna con PD-10 (de Amersham) en un tampón de borato 0,1 M (Na₂SO₄ 0,5 M, pH 9) y se acopló a Fractogel® EMD Epoxy (M). Para esto, el gel (0,5 g) se incubó en un tampón de borato 0,1 M (Na₂SO₄ 0,5 M, de pH 9) durante 2 h a la TA y después de esto se lavó varias veces con este tampón. La reacción de acoplamiento se inició mediante una adición de SPC7-E9 a la matriz de epoxi y se continuó a la TA durante 24 h mediando agitación continua. Una columna de referencia

5 sin SPC7-E9 se aportó asimismo como testigo y se trató idénticamente. Con ayuda de etanolamina 1 M (de pH 9,5) se interrumpió la reacción durante 48 h a la TA y la matriz del gel se lavó con un tampón de acetato de sodio (0,1 M, de pH 4,0), NaCl 1 M y una PBS (en cada caso 50 volúmenes de la columna). La matriz de afinidad de Affilin™ SPC7-E9 producida de esta manera se rellenó en una columna con C (de Amersham Biosciences, 1 x 10 cm) y se conectó a una instalación de cromatografía (Äkta Explorer, de Amersham Biosciences). Como el tampón de elución se utilizó en todos los casos una PBS (EDTA al 0,5 mM) a una velocidad de circulación de 1 ml/min. Para el ensayo de la capacidad de fijación de la columna con Affilin™ producida de esta manera se aplicó un proNGF purificado. Después de haber enjuagado la columna con 10 - 20 volúmenes de la columna del tampón de elución, el proNGF fijado se eluyó con glicina 0,1 M (de pH 2,2) (véase la Fig. 10). La separación del proNGF se consiguió además desde unas mezclas de sustancias con BSA y desde un extracto en bruto de E.coli. Para esto, 1 ml de la solución de BSA (5 mg/ml, de Sigma) se mezcló con 0,5 ml de proNGF (1,3 mg/ml) y se aplicaron sobre la columna con Affilin™. Después de haber enjuagado la columna con 20 volúmenes de la columna del tampón de elución, el proNGF no fijado se eluyó con glicina (0,1 M, de pH 2,2). Después de una regeneración de la columna con 10 volúmenes de la columna de Gua/HCl 6 M, se aplicó por lo demás una mezcla a base de 1 ml de un extracto en bruto de E.coli (un material sobrenadante soluble resultante después de la disgregación (con lisozima/benzonasa/ultrasonidos) del sedimento de bacterias de 50 ml de un cultivo durante la noche de B121) y 0,5 ml de proNGF (1,3 mg/ml) sobre la columna con Affilin™. Después de haber enjuagado la columna con 20 volúmenes de la columna del tampón de elución, el proNGF no fijado se eluyó asimismo con glicina (0,1 M, de pH 2,2). La columna se regeneró a continuación con glicina 0,1 M (de pH 2,2), HCl 10 mM, NaOH 10 mM, Gua/HCl 6 M, urea 6 M y etanol al 20 %. Las fracciones eluidas procedentes de la separación del proNGF con respecto de BSA y del extracto en bruto de E. coli se analizaron mediante una electroforesis a través de un gel de agarosa (véase la Fig. 11). Después de 10 cursos de ensayo se pudo observar una fijación no modificada del proNGF a la columna con SPC7-E9.

Anexo

25

Tabla 1:

Variante	A ₄₁₀	Valor de vacío 1	Valor de vacío 2	A ₄₁₀ corr.	Concentración empleada [µg/ml]	Número de cisteínas en la proteína	Cisteínas accesibles teóricamente	Número de cisteínas tituladas
SPC-1-A7BB	0,2142 0,2254	0,0897 0,1003	0,1232 0,1232	0,0013 0,0019	50 100	7	0	0
SCP-1-A7JJ	0,3154 0,4412	0,0832 0,0738	0,1232 0,1232	0,109 0,2442	50 100	8	1	4
SPC-1-A7-Cys	0,235 0,272	0,0834 0,0966	0,1232 0,1232	0,0286 0,0522	50 10	8	1	1

Tabla 2:

SPC-1-A7

5'- ATGGGTCTGATCTGT
NH₂-M G L I C

gamma cristalina

CTCGAGCACCACCACCACCACCAC -3'
L E H H H H H H -COOH

SPC-1-A7BB

5'- ATGGGTCTGATCTCT
NH₂-M G L I S

gamma cristalina

CTCGAGCACCACCACCACCACCAC -3'
L E H H H H H H -COOH

SPC-1-A7JJ

5'- ATGGGTCTGATCTCT
NH₂-M G L I S

gamma cristalina

CTCGAGTCCGGCGGCCATCACCATCACCACCACCACCACCAC -3'
L E C G G H H H H H H H H H H -COOH

SPC-1-A7_Cys

5'- ATGGGTCTGATCTCT
NH₂-M G L I S

gamma cristalina

CTCGAGTCCGGCGGGGGGGAGGATCTTGCCATCACCATCACCACCACCACCACCAC
L E S G G G G G S C H H H H H H H H H H -COOH

Secuencia de ADN de la biblioteca de la gamma II cristalina humana

5 CR20 (SEQ ID NO:1)
ATGGGTNNKATCNNKTTTCNNKGAAGACCGTGCTTTCCAGGGTTCGTNNKTACNNKTGCN
NKACCGACTGCCCGAACCTGCAGCCGTA CTCTCCC GTTGCAACTCCATCNNKGTNN
KTCCGGTTGCTGGATGATCTACGAACGTCCGA ACTACCAGGGTCACCGTCACCAGTAC
TTCTGCGGCGTG GGGAGTACCCCGACTACCAGCAATGGATGGGCCTCAGCGACTCCA
TCCGCTCCTGCTGCCTCATCCCCCCCCACTCTGGCGCTTACAGAATGAAGATCTACGAC
AGAGATGAATTGAGGGGACAAATGTCAGAGCTCACAGACGACTGTCTCTCTGTT CAGG
ACCGCTTCCACCTCACTGAAATT

CACTCCCTCAATGTGCTGGAGGGCAGCTGGATCCTCTATGAGATGCCCAACTACAGGG
GGAGGCAGTATCTGCTGAGGCCGGGGGAGTACAGGAGGTTTCTTGATTGGGGGGCTCC
AAATGCCAAAGTTGGCTCTCTTAGACGAGTCATGGATTTGTACGCG

Secuencias de ADN de las AffilinTM basadas en la gamma II cristalina

SPC1-A1 (SEQ ID NO:2)

ATGGGTTTTATCTGGTTCATGGAAGACCGTGCTTTCCAGGGTCGTAGGTACGATTGCGG
TACCGACTGCCCCGAACCTGCAGCCGTA CTCTCCCGTTGCAACTCCATCAAGGTTAAGT
CCGGTTGCTGGATGATCTACGAACGTCCGA ACTACCAGGGTCACCGTCACCAGTACTT
CCTGCGGCGTGGGGAGTACCCCGACTACCAGCAATGGATGGGCCTCAGCGACTCCATC
CGCTCCTGCTGCCTCATCCCCCCCCACTCTGGCGCTTACAGAATGAAGATCTACGACA
GAGATGAATTGAGGGGACAAATGTCAGAGCTCACAGACGACTGTCTCTCTGTTTCAGGA
CCGCTTCCACCTCACTGAAATTCACTCCCTCAATGTGCTGGAGGGCAGCTGGATCCTCT
ATGAGATGCCCAACTACAGGGGGAGGCAGTATCTGCTGAGGCCGGGGGAGTACAGGA
GGTTTCTTGATTGGGGGGCTCCAAATGCCAAAGTTGGCTCTCTTAGACGAGTCATGGA
TTTGTACGCG

SPC1-A7 (SEQ ID NO:3)

ATGGGTCTGATCTGTTTCTCTGAAGACCGTGCTTTCCAGGGTCGTAGGTACATGTGCCT
GACCGACTGCCCCGAACCTGCAGCCGTA CTCTCCCGTTGCAACTCCATCAATGTTTGGI
CCGGTTGCTGGATGATCTACGAACGTCCGA ACTACCAGGGTCACCGTCACCAGTACTT
CCTGCGGCGTGGGGAGTACCCCGACTACCAGCAATGGATGGGCCTCAGCGACTCCATC
CGCTCCTGCTGCCTCATCCCCCCCCACTCTGGCGCTTACAGAATGAAGATCTACGACA
GAGATGAATTGAGGGGACAAATGTCAGAGCTCACAGACGACTGTCTCTCTGTTTCAGGA
CCGCTTCCACCTCACTGAAATTCACTCCCTCAATGTGCTGGAGGGCAGCTGGATCCTCT
ATGAGATGCCCAACTACAGGGGGAGGCAGTATCTGCTGAGGCCGGGGGAGTACAGGA
GGTTTCTTGATTGGGGGGCTCCAAATGCCAAAGTTGGCTCTCTTAGACGAGTCATGGA
TTTGTACGCG

5 SPC1-G3 (SEQ ID NO:4)

ATGGGTTCTATCATTTTCTTGAAGACCGTGCTTTCCAGGGTCGTATTTACGGTTGCAC
TACCGACTGCCCCGAACCTGCAGCCGTA CTCTCCCGTTGCAACTCCATCGTGGTTCAGT
CCGGTTGCTGGATGATCTACGAACGTCCGA ACTACCAGGGTCACCGTCACCAGTACTT
CCTGCGGCGTGGGGAGTACCCCGACTACCAGCAATGGATGGGCCTCAGCGACTCCATC
CGCTCCTGCTGCCTCATCCCCCCCCACTCTGGCGCTTACAGAATGAAGATCTACGACA
GAGATGAATTGAGGGGACAAATGTCAGAGCTCACAGACGACTGTCTCTCTGTTTCAGGA
CCGCTTCCACCTCACTGAAATTCACTCCCTCAATGTGCTGGAGGGCAGCTGGATCCTCT
ATGAGATGCCCAACTACAGGGGGAGGCAGTATCTGCTGAGGCCGGGGGAGTACAGGA
GGTTTCTTGATTGGGGGGCTCCAAATGCCAAAGTTGGCTCTCTTAGACGAGTCATGGA
TTTGTACGCG

SPC1-A7BB (SEQ ID NO:5)

ATGGGTCTGATCTCTTTCTCTGAAGACCGTGCTTTCCAGGGTCGTAGGTACATGTGCCT
GACCGACTGCCCCGAACCTGCAGCCGTACTTCTCCCGTTGCAACTCCATCAATGTTTGGT
CCGGTTGCTGGATGATCTACGAACGTCCGAACTACCAGGGTCACCAGTACTTCCTGCG
GCGTG GGGAGTACCCCGACTACCAGCAATGGATGGGCCTCAGCGACTCCATCCGCTCC
TGCTGCCTCATCCCCCCCCACTCTGGCGCTTACAGAATGAAGATCTACGACAGAGATG
AATTGAGGGGACAAATGTCAGAGCTCACAGACGACTGTCTCTCTGTTTCAGGACCGCTT
CCACCTCACTGAAATTCACTCCCTCAATGTGCTGGAGGGCAGCTGGATCCTCTATGAG
ATGCCCAACTACAGGGGGAGGCAGTATCTGCTGAGGCCGGGGGAGTACAGGAGGTTT
CTTGATTGGGGGGCTCCAAATGCCAAAGTTGGCTCTCTTAGACGAGTCATGGATTTGT
ACCTCGAGCACCACCACCACCACC

SPC1-A7JJ (inclusive His10) (SEQ ID NO:6)

ATGGGTCTGATCTCTTTCTCTGAAGACCGTGCTTTCCAGGGTCGTAGGTACATGTGCCT
GACCGACTGCCCCGAACCTGCAGCCGTACTTCTCCCGTTGCAACTCCATCAATGTTTGGT
CCGGTTGCTGGATGATCTACGAACGTCCGAACTACCAGGGTCACCAGTACTTCCTGCG
GCGTG GGGAGTACCCCGACTACCAGCAATGGATGGGCCTCAGCGACTCCATCCGCTCC
TGCTGCCTCATCCCCCCCCACTCTGGCGCTTACAGAATGAAGATCTACGACAGAGATG
AATTGAGGGGACAAATGTCAGAGCTCACAGACGACTGTCTCTCTGTTTCAGGACCGCTT
CCACCTCACTGAAATTCACTCCCTCAATGTGCTGGAGGGCAGCTGGATCCTCTATGAG
ATGCCCAACTACAGGGGGAGGCAGTATCTGCTGAGGCCGGGGGAGTACAGGAGGTTT
CTTGATTGGGGGGCTCCAAATGCCAAAGTTGGCTCTCTTAGACGAGTCATGGATTTGT
ACCTCGAGTGCGGCGGCCATCACCATCACCACCACCACCACCACC

5

SPC1-A7_Cys (inclusive His10) (SEQ ID NO:7)

ATGGGTCTGATCTCTTTCTCTGAAGACCGTGCTTTCCAGGGTCGTAGGTACATGTGCCT
GACCGACTGCCCCGAACCTGCAGCCGTACTTCTCCCGTTGCAACTCCATCAATGTTTGGT
CCGGTTGCTGGATGATCTACGAACGTCCGAACTACCAGGGTCACCAGTACTTCCTGCG
GCGTG GGGAGTACCCCGACTACCAGCAATGGATGGGCCTCAGCGACTCCATCCGCTCC
TGCTGCCTCATCCCCCCCCACTCTGGCGCTTACAGAATGAAGATCTACGACAGAGATG
AATTGAGGGGACAAATGTCAGAGCTCACAGACGACTGTCTCTCTGTTTCAGGACCGCTT
CCACCTCACTGAAATTCACTCCCTCAATGTGCTGGAGGGCAGCTGGATCCTCTATGAG
ATGCCCAACTACAGGGGGAGGCAGTATCTGCTGAGGCCGGGGGAGTACAGGAGGTTT
CTTGATTGGGGGGCTCCAAATGCCAAAGTTGGCTCTCTTAGACGAGTCATGGATTTGT
ACCTCGAGTCCGGCGGCGGGGGGGGAGGATCTTGCCATCACCATCACCACCACCACC
ACCACCAC

10

SPC7-E9 (inclusive His6) (SEQ ID NO:8)

ATGGGTTTTATCTGTTTCTTGGAAGACCGTGCTTCCAGGGTCGTTCTTACGCTTGCGA
TACTGACTGCCCGAACCTGCAGCCGTACTTCTCCCGTTGCAACTCCATCAGTGTTCTGT
CCGGTTGCTGGATGATCTACGAACGTCCGAACTACCAGGGTCACCAGTACTTCCTGCG
GCGTGGGGAGTACCCCGACTACCAGCAATGGATGGGCCTCAGCGACTCCATCCGCTCC
TGCTGCCTCATCCCCCCCCACTCTGGCGCTTACAGAATGAAGATCTACGACAGAGATG
AATTGAGGGGACAAATGTCAGAGCTCACAGACGACTGTCTCTCTGTTTCAGGACCGCTT
CCACCTCACTGAAATTCCTCCCTCAATGTGCTGGAGGGCAGCTGGATCCTCTATGAG
ATGCCCAACTACAGGGGGAGGCAGTATCTgCTGAGGCCGGGGGAGTACAGGAGGTTTC
TTGATTGGGGGGCTCCAAATGCCAAAGTTGGCTCTCTTAGACGAGTCATGGATTTGTA
CCTCGAGCACCACCACCACCAC

Secuencia de ADN de la biblioteca de ubiquitina humana

5 Ubiquitina de tipo silvestre (SEQ ID NO:9)

ATGCAGATCTTCGTGAAGACCCTGACCGGCAAGACCATCACTCTGGAGGTGGAGCCCA
GTGACACCATCGAAAATGTGAAGGCCAAGATCCAAGATAAAGAAGGCATTCCCCCG
ACCAGCAGAGGCTCATCTTTGCAGGCAAGCAGCTGGAAGATGGCCGCACCTTTTCTGA
CTACAACATCCAGAAAGAGTCGACCCTGCACCTGGTCTCCGCCTGAGGGGGCGGC

Ubiquitina modificada (MUBI) (SEQ ID NO:10)

ATGCAAATCTTCGTTAAAACCCTGACGGGAAAGACTATCACCTGGAGGTAGAACCGT
CCGACACCATCGAAAATGTCAAAGCTAAAATCCAAGACAAAGAAGGAATTCCACCTG
ACCAGCAACGCCTAGCTTTTCGCAGGACGACAACCTAGAGGACGGGCTCACCTGTCTGA
CTACAACATCCAAAAAGAATCCACCCTCCACCTGGCACTCCTCCTGCGGGCC

10 UB10 (biblioteca) (SEQ ID NO:11)

ATGNNKATCNNKGTNNKACCCTGACGGGAAAGACTATCACCTGGAGGTAGAACCG
TCCGACACCATCGAAAATGTCAAAGCTAAAATCCAAGACAAAGAAGGAATTCCACCT
GACCAGCAACGCCTAGCTTTTCGCAGGACGACAACCTAGAGGACGGGCTCACCTGTCTG
ACTACAACATCNNKNNKNNKNNKNNKCTCCACCTGGCACTCCTCCTGCGGGCC

Secuencias de ADN de las Affilin™ basadas en la ubiquitina

15 SPU11-3-A1 (inclusive His6) (SEQ ID NO:12)

ATGCGGATCCGTGTTGCTACCCTGACGGGAAAGACTATCACCTGGAGGTAGAACCGT
CCGACACCATCGAAAATGTCAAAGCTAAAATCCAAGACAAAGAAGGAATTCCACCTG
ACCAGCAACGCCTAGCTTTTCGCAGGACGACAACCTAGAGGACGGGCTCACCTGTCTGA
CTACGACATCCGTCATGGTACGTCGCTCCACCTGGCACTCCTCCTGCGGGCCCTCGAGC
ACCACCACCACCACCAC

20

SPU11-3-A1_Cys (inclusive His10) (SEQ ID NO:13)

ATGCGGATCCGTGTTGCTACCCTGACGGGAAAGACTATCACCCCTGGAGGTAGAACCGT
CCGACACCATCGAAAATGTCAAAGCTAAAATCCAAGACAAAGAAGGAATTCCACCTG
ACCAGCAACGCCTAGCTTTCGCAGGACGACA ACTAGAGGACGGGCTCACCCCTGTCTGA
CTACGACATCCGTCATGGTACGTCGCTCCACCTGGCACTCCTCCTGCGGGCCCTCGAGT
CCGGCGGCGGGGGGGGAGGATCTTGCCATCACCATCACCACCACCACCACCACCAC

5 Cebador:

pCAN700 (5'-CCA TGA TTA CGC CAA GCT TTG GAG CC-3') (SEQ ID NO:14)
A7Cys4Ser_for (5'-CCA TGG GTC TGA TCT CTT TCT CTG AAG ACC G-3') (SEQ ID NO:15)
A7Cys4Ser_rev (5'-CGG TCT TCA GAG AAA GAG ATC AGA CCC ATG G-3') (SEQ ID NO:16)
pETTerm (5'-GCT AGT TAT TGC TCA GCG GTG GC-3') (SEQ ID NO:17)

A7Gly2Cys_for (5'-GGA TTT GTA CCT CGA GTG CGG CGG CCA TCA CCA TCA CCA CCA
CCA CCA CCA CCA CTG AGA TCC GGC-3') (SEQ ID NO:18)

A7Gly2Cys_rev (5'-GCC GGA TCT CAG TGG TGG TGG TGG TGG TGG TGA TGG TGA
TGG CCG CCG CAC TCG AGG TAC AAA TCC-3') (SEQ ID NO:19)

A7Gly2Ser_for (5'-GGA TTT GTA CCT CGA GTC CGG CGG CCA TCA CC-3') (SEQ ID NO:20) und *A7Gly2Ser
rev* (5'-GGT GAT GGC CGC CGG ACT CGA GGT ACA AAT CC-3') (SEQ ID NO:21)
A7Gly2Ser_rev (5'-GGT GAT GGC CGC CGG ACT CGA GGT ACA AAT CC-3') (SEQ ID NO:22)

Gly4SerCys_HindIII (5'-GGG GGA AGC TTT TAT CAG TGG TGG TGG TGG TGG TGG TGA
TGG TGA TGG CAA GAT-3') (SEQ ID NO:23)

A7Cys4Ser_Nde (5'-GGA GAT ATA CAAT ATG GGT CTG ATC TCT TTC TCT G-3') (SEQ ID NO:24)

SEQ ID NO:25

ATGAAATACC TATTGCCTAC GGCAGCCGCT GGATTGTTAT TACTCGCGGC
CCAGCCGGCC 60

ATGGCCATGC AAATCTTCGT TAAAACCCTG ACGGGAAAGA CTATCACCCCT
GGAGGTAGAA 120

CCGTCCGACA CCATCGAAAA TGTCAAAGCT AAAATCCAAG ACAAAGAAGG
AATTCCACCT 180

GACCAGCAAC GCCTAGCTTT CGCAGGACGA CAACTAGAGG ACGGGCTCAC
CCTGTCTGAC 240

TACAACATCC AAAAAGAATC CACCCTCCAC CTGGCACTCC TCCTGCGGGC C 291

SEQ ID NO: 26

ATGCAAATCT TCGTTAAAAC CCTGACGGGA AAGACTATCA CCCTGGAGGT 50

SEQ ID NO: 27

GGATTTTAGC TTTGACATTT TCGATGGTGT CGGACGGTTC TACCTCCAGG GTG 53

SEQ ID NO: 28

GTCAAAGCTA AAATCCAAGA CAAAGAAGGA ATTCCACCTG ACCAGCAACG CCT 53

SEQ ID NO: 29

GGGTGAGCCC GTCCTCTAGT TGTCGTCCTG CGAAAGCTAG GCGTTGCTGG 50

SEQ ID NO: 30

GACGGGCTCA CCCTGTCTGA CTACAACATC CAAAAGAAT CCACCCTCCA 50

SEQ ID NO: 31

GAGTGCTCGC AGCAGGAGTG CCAGGTGGAG GGTGGATTC 39

SEQ ID NO: 32

GATATACATA TGCAAATCTT CG 22

SEQ ID NO: 33

GTGGTGCTCG AGTGCTCG 18

SEQ ID NO: 34

CCAGCCGGCC ATGGCCATGN NKATCNNKGT TNNKACCCTG ACGGGAAAGA CTATC 55

SEQ ID NO: 35

CAGGAGGAGT GCCAGGTGGA GMNNMNMN MNMNMNGATG TTGTAGTCAG ACAGG 55

SEQ ID NO: 36

GTTATTACTC GCGGCCAGC CGGCCATGGC CATG 34

SEQ ID NO: 37

GAGTTTTTGT TCGGCCTCGA GGGCCCGCAG GAGGAGTGCC AGGTGGAG 48

Bibliografía citada:

- 5 Ausubel, F.M., Brent, R., Kinston, R.E., Moore, D.D., Seidmann, J.G., Smith, J.A. y Struhl, K. (1994): Current protocols in molecular biology. John Wiley & Sons, Inc.
- Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H., Shindyalov, I. N. y Bourne, P. E. (2000) The Protein Data Bank. *Nucleic Acid Res.*, 28, 235-242.
- 10 Blundell, T., Lindley, P., Miller, L., Moss, D., Slingsby, C., Tickle, I., Turnell, B., y Wistow, G. (1981). The molecular structure and stability of the eye lens: x-ray analysis of gamma-crystallin II. *Nature* 289, 771-777.
- Buchberger A, Howard MJ, Proctor M, Bycroft M, National Library of Medicine, *J Mol Biol.* 2001 Mr 16; 307(1); 17-24.
- Butt, T. R., Jonnalagadda, S., Monia, B. P., Sternberg, E. J., Marsh, J. A., Stadel, J. M., Ecker, D. J. y Crooke, S. T. (1989) Ubiquitin fusion augments the yield of cloned gene products in *Escherichia coli*. *PNAS* 86, 2540-2544.
- 15 Finucane, M. D., Tuna, M., Lees, J. H., y Woolfson, D. N. (1999). Core-directed protein design. I. An experimental method for selecting stable proteins from combinatorial libraries. *Biochemistry* 38, 11604-11612.
- Finucane, M. D., y Woolfson, D. N. (1999). Core-directed protein design. II. Rescue of a multiply mutated and destabilized variant of ubiquitin. *Biochemistry* 38, 11613-11623.
- Haber, A. F. S. A. (1972). Reaction of protein sulfhydryl groups with Ellman's reagent. In *Methods Enzymology*, C. H. Hirs, and S. N. Timasheff, (compiladores de edición), págs. 457-464.

- Hanes, J. y colaboradores (1997): In vitro selection and evolution of functional proteins by using ribosome display. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94, 4937-42.
- Hazes, B. y Hol, W. G. J. (1992): Comparison of the hemocyanin β -barrel with other greek key β -barrels: possible importance of the "beta-zipper" in protein structure and folding. *Proteins: Struct., Funct. Gen.* 12, 278-298.
- 5 Hemmingsen, J. M., Gernert, K. M., Richardson, J. S. y Richardson, D. C. (1994): The tyrosine corner: a feature of most greek key β -barrel proteins. *Prot. Science* 3, 1927-1937.
- Herrmann, J. E., y Morse, S. A. (1973) Coupling of peroxidase to poliovirus antibody: Characteristics of the conjugates and their use in virus detection. *Infection and Immunity*, 645-649.
- 10 Jaenicke, R. (1994). Eye-lens proteins: structure, superstructure, stability, genetics. *Naturwissenschaften* 81, 423-429.
- Jaenicke, R. (1996). Stability and folding of ultrastable proteins: eye lens crystallins and enzymes from thermophiles. *Faseb J* 10, 84-92.
- Jaenicke, R., y Slingsby, C. (2001). Lens crystallins and their microbial homologs: structure, stability, and function. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 36, 435-499.
- 15 Kumaraswamy, V. S., Lindley, P. F., Slingsby, C., y Glover, I. D. (1996). An eye lens protein-water structure: 1.2 angstrom resolution structure of gamma B-crystallin at 150K. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 52, 611.
- Larsen CN, Wang H., National Library of Medicine ; *J Proteome Res.* 2002 Sep-Oct; 1(5): 411-9.
- Lazar, G. A., Desjarlais, J. R., and Handel, T. M. (1997). De novo design of the hydrophobic core of ubiquitin. *Protein Sci* 6, 1167-1178.
- 20 Ling, M. M. (2003). Large antibody display libraries for isolation of high-affinity antibodies. *Comb Chem High Throughput Screen* 6, 421-432.
- Lottspeich, F., and Zorbas, H. (1998). *Bioanalytik* (Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag).
- Mandal, K., Chakrabart, B., Thomson, J. y Siezen, R. J. (1987): Structure and stability of β -crystallins. Denaturation and proteolysis behaviour. *J. Biol. Chem.* 262, 8096-8102.
- 25 Mayr, E. M., Jaenicke, R., and Glockshuber, R. (1994). Domain interactions and connecting peptides in lens crystallins. *J Mol Biol* 235, 84-88.
- Murzin A. G., Brenner S. E., Hubbard T. y Chothia C. (1995). SCOP: a structural classification of proteins database for the investigation of sequences and structures. *J. Mol. Biol.* 247, 536-540.
- Najmudin, S., Nalini, V., Driessen, H. P., Slingsby, C., Blundell, T., Moss, D., y Lindley, P. (1993). Structure of bovine gB (g II)-crystalline at 1.47 Å. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 49, 223-233.
- 30 Norledge, B. V., Mayr, E. M., Glockshuber, R., Bateman, O. A., Slingsby, C., Jaenicke, R., y Driessen, H. P. (1996). The X-ray structures of two mutant crystallin domains shed light on the evolution of multi-domain proteins. *Nat Struct Biol* 3, 267-274.
- Reichlin, M. (1980) Use of glutaraldehyde as a coupling agent for proteins and peptides. *Methods Enzymol* 70, 159-165.
- 35 Richardson, J. S., Richardson, D. C., Tweedy, N. B., Gernert, K. M., Quinn, T. P., Hecht, M. H., Erickson, B. W., Yan, Y., McClain, R. D., Donlan, M. E. y Surles, M. C. (1992): Looking at proteins: representations, folding, packing and design. *Biophys. J.* 63, 1186-1209.
- Riddle, D. S., Santiago, J. V., Bray-Hall, S. T., Doshi, N., Grantcharova, Q. Y and Baker, D. (1997): Functional rapidly folding proteins from simplified amino acid sequences. *Nature structural biology* 4, 805-809.
- 40 Rudolph, R., Siebendritt, R., Nessler, G., Sharma, A. K., y Jaenicke, R. (1990). Folding of an all-beta protein: independent domain folding in gamma II-crystallin from calf eye lens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 4625-4629.
- Sambrook, J., Maniatis, T. y Fritsch, E.F. (1989): *Molecular Cloning: A laboratory manual*. Cold spring Harbor. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York.
- 45 Sharma, A. K., Minke-Gogl, V., Gohl, P., Siebendritt, R., Jaenicke, R., y Rudolph, R. (1990). Limited proteolysis of gamma II-crystallin from calf eye lens. Physicochemical studies on the N-terminal domain and the intact twodomain protein. *Eur J Biochem* 194, 603-609.
- Slingsby, C.(1985): Structural variation in lens crystallins. *TIBS* 10, 281-284.
- Smith, G. P (1985): Filamentous Fusion Phage: Novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* 228, 1315-1317.
- 50 Stahl, S. y Uhlen, M. (1997): Bacterial surface display: trends and progress. *TIBTECH* 15, 185-192.
- Takamiya, H., Shimizu, F., y Vogt, A. (1975) A two-stage method for cross-linking antibody globulin to ferritin by glutaraldehyde.III. Size and antibody activity of the conjugates. *J Immunol Methods* 8(4), 301-306.
- Vijay-Kumar, S., Bugg, C. E., y Cook, W. J. (1987). Structure of ubiquitin refined at 1.8 Å resolution. *J Mol Biol* 194, 531-544.
- 55 Voet, D., y Voet, J. G. (1995). *Biochemistry*, Second Edition edn (New York, John Wiley & Sons, Inc.).
- Wistow, G., Turnell, B., Summers, L., Slingsby, C., Moss, D., Miller, L., Lindley, P., y Blundell, T. (1983). X-ray analysis of the eye lens protein gamma-II crystallin at 1.9 Å resolution. *J Mol Biol* 170, 175-202.
- Wistow, G. J., y Piatigorsky, J. (1988). Lens crystallins: the evolution and expression of proteins for a highly specialized tissue. *Annu Rev Biochem* 57, 479-504.
- 60

LISTADO DE LAS SECUENCIAS

- <110> Scil Proteins GmbH
- 5 <120> Conjugados de proteínas para la utilización en la terapia, el diagnóstico y la cromatografía
- <130> P19718
- <140>
- 10 <141> 2005-10-11
- <150> DE 10 2004 049 479.7
- <151> 2004-10-11
- 15 <160> 37
- <170> PatentIn version 3.3
- <210> 1
- 20 <211> 534
- <212> ADN
- <213> Artificial
- <220>
- 25 <223> Secuencia de ADN de la biblioteca - CR20 de la gamma II cristalina humana
- <220>
- <221> Característica variada
- <222> (7)..(8)
- 30 <223> n es a, c, g, ó t
- <220>
- <221> Característica variada
- <222> (13)..(14)
- 35 <223> n es a, c, g, ó t
- <220>
- <221> Característica variada
- <222> (19)..(20)
- 40 <223> n es a, c, g, ó t
- <220>
- <221> Característica variada
- <222> (46)..(47)
- 45 <223> n es a, c, g, ó t
- <220>
- <221> Característica variada
- <222> (52)..(53)
- 50 <223> n es a, c, g, ó t

ES 2 414 605 T3

<220>
 <221> Característica variada
 <222> (58)..(59)
 <223> n es a, c, g, ó t
 5

<220>
 <221> Característica variada
 <222> (109)..(110)
 <223> n es a, c, g, ó t
 10

<220>
 <221> Característica variada
 <222> (115)..(116)
 <223> n es a, c, g, ó t
 15

<400> 1
 atgggtnnka tcnnkttcnn kgaagaccgt gctttccagg gtcgtnnkta cnnktgcnnk 60
 accgactgcc cgaacctgca gccgtacttc tcccgttgca actccatcnn kgttnnktcc 120
 ggttgctgga tgatctacga acgtccgaac taccagggtc accgtcacca gtacttctctg 180
 cggcgtgggg agtaccocga ctaccagcaa tggatgggcc tcagcgactc catccgctcc 240
 tgctgcctca tccccccca ctctggcgct tacagaatga agatctacga cagagatgaa 300
 ttgaggggac aaatgtcaga gctcacagac gactgtctct ctgttcagga ccgcttccac 360
 ctcactgaaa ttcactccct caatgtgctg gagggcagct ggatcctcta tgagatgccc 420
 aactacaggg ggaggcagta tctgctgagg ccgggggagt acaggagggt tcttgattgg 480
 ggggctccaa atgccaaagt tggctctctt agacgagtca tggatttcta cgcg 534

<210> 2
 <211> 534
 <212> ADN
 <213> Artificial
 20

<220>
 <223> Secuencia de ADN de una afilina - SPC1-A1 basada en la gamma II cristalina
 25

<400> 2

ES 2 414 605 T3

```

atgggtttta tctggttcat ggaagaccgt gctttccagg gtcgtaggta cgattgcbggt      60
accgactgcc cgaacctgca gccgtacttc tcccgttgca actccatcaa ggttaagtcc      120
ggttgctgga tgatctacga acgtccgaac taccagggtc accgtcacca gtacttctctg      180
cggcgtgggg agtaccocga ctaccagcaa tggatgggoc tcagcgaote catccgctcc      240
tgctgcctca tcccccccca ctctggcgct tacagaatga agatctacga cagagatgaa      300
ttgaggggac aaatgtcaga gctcacagac gactgtctct ctgttcagga ccgcttccac      360
ctcactgaaa ttcactccct caatgtgctg gagggcagct ggatcctcta tgagatgccc      420
aactacaggg ggaggcagta tctgctgagg ccgggggagt acaggagggt tcttgattgg      480
ggggctccaa atgccaaagt tggctctctt agacgagtca tggatttgta cgcg          534

```

5 <210> 3
 <211> 534
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Secuencias de ADN de una afilina - SPC1-A7 basada en la gamma II cristalina

```

<400> 3
atgggtctga tctgtttctc tgaagaccgt gctttccagg gtcgtaggta catgtgcctg      60
accgactgcc cgaacctgca gccgtacttc tcccgttgca actccatcaa tgtttgggtcc      120
ggttgctgga tgatctacga acgtccgaac taccagggtc accgtcacca gtacttctctg      180
cggcgtgggg agtaccocga ctaccagcaa tggatgggoc tcagcgaote catccgctcc      240
tgctgcctca tcccccccca ctctggcgct tacagaatga agatctacga cagagatgaa      300
ttgaggggac aaatgtcaga gctcacagac gactgtctct ctgttcagga ccgcttccac      360
ctcactgaaa ttcactccct caatgtgctg gagggcagct ggatcctcta tgagatgccc      420
aactacaggg ggaggcagta tctgctgagg ccgggggagt acaggagggt tcttgattgg      480
ggggctccaa atgccaaagt tggctctctt agacgagtca tggatttgta cgcg          534

```

15 <210> 4
 <211> 534
 <212> ADN
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Secuencias de ADN de una afilina - SPC1-G3 basada en la gamma II cristalina

<400> 4

ES 2 414 605 T3

```

atgggttcta tcattttcct tgaagaccgt gctttccagg gtcgtattta cggttgcaact    60
accgactgcc cgaacctgca gccgtacttc tcccgttgca actccatcgt ggttcagtcc    120
ggttgctgga tgatctacga acgtccgaac taccagggtc accgtcacca gtacttcctg    180
cggcgtgggg agtaccocga ctaccagcaa tggatggggc tcagcgaact catccgctcc    240
tgctgcctca tcccccccca ctctggcgtc tacagaatga agatctacga cagagatgaa    300
ttgaggggac aaatgtcaga gctcacagac gactgtctct ctgttcagga ccgcttcac    360
ctcactgaaa ttcactccct caatgtgctg gagggcagct ggatcctcta tgagatgccc    420
aactacaggg ggagggcagta tctgctgagg ccgggggagt acaggaggtt tcttgattgg    480

ggggctccaa atgccaaagt tggctctctt agacgagtca tggatttgta cgcg        534

```

5 <210> 5
 <211> 549
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Secuencias de ADN de una afilina - SPC1-A7BB basada en la gamma II cristalina

```

<400> 5
atgggtctga tctctttctc tgaagaccgt gctttccagg gtcgtaggta catgtgcctg    60
accgactgcc cgaacctgca gccgtacttc tcccgttgca actccatcaa tgtttggtcc    120
ggttgctgga tgatctacga acgtccgaac taccagggtc accagtactt cctgcggcgt    180
ggggagtacc ccgactacca gcaatggatg ggcctcagcg actccatccg ctctgctgc    240
ctcatcccc cccactctgg cgcttacaga atgaagatct acgacagaga tgaattgagg    300
ggacaaatgt cagagctcac agacgactgt ctctctgttc aggaccgctt ccacctcact    360
gaaattcaact ccctcaatgt gctggagggc agctggatcc tctatgagat gcccaactac    420
agggggaggg agtatctgct gaggccgggg gaggacagga ggtttcttga ttggggggct    480
ccaaatgcca aagttggctc tcttagacga gtcattgatt tgtacctcga gcaccaccac    540
caccaccac                                     549

```

15 <210> 6
 <211> 570
 <212> ADN
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Secuencias de ADN de una afilina - SPC1-A7JJ basada en la gamma II cristalina

<400> 6

ES 2 414 605 T3

```

atgggtctga tctctttctc tgaagaccgt gctttccagg gtcgtaggta catgtgacctg      60
accgactgcc cgaacctgca gccgtacttc tcccgttgca actccatcaa tgtttgggtcc      120
ggttgctgga tgatctacga acgtccgaac taccagggtc accagtactt cctgcgggcgt      180
ggggagtacc ccgactacca gcaatggatg ggcctcagcg actccatccg ctctgctgc      240
ctcatcccc cccactctgg cgcttacaga atgaagatct acgacagaga tgaattgagg      300
ggacaaatgt cagagctcac agacgactgt ctctctgttc aggaccgctt ccaccteact      360
gaaattcact ccctcaatgt gctggagggc agctggatcc tctatgagat gcccaactac      420
agggggaggc agtatctgct gaggccgggg gagtacagga ggtttcttga ttggggggct      480
ccaaatgcca aagttggctc tcttagacga gtcattgatt tgtacctcga gtgcggcggc      540
catcaccatc accaccacca ccaccaccac      570

```

<210> 7
 <211> 588
 <212> ADN
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Secuencias de ADN de una afilina - SPC1-A7-Cys basada en la gamma II cristalina

10 <400> 7

```

atgggtctga tctctttctc tgaagaccgt gctttccagg gtcgtaggta catgtgacctg      60
accgactgcc cgaacctgca gccgtacttc tcccgttgca actccatcaa tgtttgggtcc      120
ggttgctgga tgatctacga acgtccgaac taccagggtc accagtactt cctgcgggcgt      180
ggggagtacc ccgactacca gcaatggatg ggcctcagcg actccatccg ctctgctgc      240
ctcatcccc cccactctgg cgcttacaga atgaagatct acgacagaga tgaattgagg      300
ggacaaatgt cagagctcac agacgactgt ctctctgttc aggaccgctt ccacctcact      360
gaaattcact ccctcaatgt gctggagggc agctggatcc tctatgagat gcccaactac      420
agggggaggc agtatctgct gaggccgggg gagtacagga ggtttcttga ttggggggct      480
ccaaatgcca aagttggctc tcttagacga gtcattgatt tgtacctcga gtccggcggc      540
gggggggggag gatcttgcca tcaccatcac caccaccacc accaccac      588

```

<210> 8
 <211> 549
 <212> ADN
 <213> Artificial

15

<220>
 <223> Secuencias de ADN de una afilina - SPC7-E9 basada en la gamma II cristalina

20

<400> 8

ES 2 414 605 T3

atgggtttta tctgtttctt ggaagaccgt gctttccagg gtogttctta cgcttgcgat 60
 actgactgcc cgaacctgca gccgtacttc tcccgttgca actccatcag tgttctgtcc 120
 ggttgctgga tgatctacga acgtccgaac taccagggtc accagtactt cctgcggcgt 180
 ggggagtacc ccgactacca gcaatggatg ggctcagcg actccatccg ctctgctgc 240
 ctcatcccc cccactctgg cgcttacaga atgaagatct acgacagaga tgaattgagg 300
 ggacaaatgt cagagctcac agacgactgt ctctctgttc aggaccgctt ccacctact 360
 gaaattcact ccctcaatgt gctggagggc agctggatcc tctatgagat gcccaactac 420
 agggggagggc agtatctgct gaggccgggg gagtacagga ggtttcttga ttggggggct 480
 ccaaatgcca aagttggctc tcttagacga gtcattggatt tgtacctcga gcaccaccac 540
 caccaccac 549

5 <210> 9
 <211> 228
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Secuencia de ADN de la biblioteca de ubiquitina humana - ubiquitina de tipo silvestre

<400> 9
 atgcagatct tcgtgaagac cctgaccggc aagaccatca ctctggaggt ggagcccagt 60
 gacaccatcg aaaatgtgaa ggccaagatc caagataaag aaggcattcc ccccgaccag 120
 cagaggctca tctttgcagg caagcagctg gaagatggcc gcactctttc tgactacaac 180
 atccagaaag agtcgaccct gcacctggtc ctccgcctga ggggcggc 228

15 <210> 10
 <211> 225
 <212> ADN
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Ubiquitina modificada (MUBI)

<400> 10
 atgcaaatct tcgttaaac cctgacggga aagactatca ccctggaggt agaaccgtcc 60
 gacaccatcg aaaatgtcaa agctaaaatc caagacaaag aaggaattcc acctgaccag 120
 caacgcctag ctttcgcagg acgacaacta gaggacgggc tcacctgtc tgactacaac 180
 atccaaaaag aatccaccct ccacctggca ctctcctgc gggcc 225

ES 2 414 605 T3

- <210> 11
- <211> 225
- <212> ADN
- <213> Artificial
- 5
- <220>
- <223> UB10 (biblioteca)
- <220>
- 10 <221> Característica variada
- <222> (4)..(5)
- <223> n es a, c, g, ó t
- <220>
- 15 <221> Característica variada
- <222> (10)..(11)
- <223> n es a, c, g, ó t
- <220>
- 20 <221> Característica variada
- <222> (16)..(17)
- <223> n es a, c, g, ó t
- <220>
- 25 <221> Característica variada
- <222> (184)..(185)
- <223> n es a, c, g, ó t
- <220>
- 30 <221> Característica variada
- <222> (187)..(188)
- <223> n es a, c, g, ó t
- <220>
- 35 <221> Característica variada
- <222> (190)..(191)
- <223> n es a, c, g, ó t
- <220>
- 40 <221> Característica variada
- <222> (193)..(194)
- <223> n es a, c, g, ó t
- <220>
- 45 <221> Característica variada
- <222> (196)..(197)
- <223> n es a, c, g, ó t

<400> 11

```

atgnnkacn nkgttnnkac cctgacggga aagactatca cctggaggt agaaccgtcc      60
gacaccatcg aaaatgtcaa agctaaaatc caagacaaag aaggaattcc acctgaccag      120
caacgcctag ctttcgcagg acgacaacta gaggacgggc tcaccctgtc tgactacaac      180
atcnnknnkn nknnknnket ccacctggca ctctctctgc gggcc                      225

```

50

ES 2 414 605 T3

<210> 12
 <211> 249
 <212> ADN
 <213> Artificial
 5
 <220>
 <223> Secuencia de ADN de una afilina - SPU11-3-A1 basada en la ubiquitina
 <400> 12
 atgCGGatcc gtgTtgctac cctgacggga aagactatca cCctggaggt agaaccgtcc 60
 gacaccatcg aaaatgtcaa agctaaaatc caagacaaag aaggaattcc acctgaccag 120
 caacgcctag ctttcgcagg acgacaacta gaggacgggc tcaccctgtc tgactacgac 180
 atccgtcatg gtacgtcgct ccacctggca ctctctctgc gggccctcga gcaccaccac 240
 caccaccac 249
 10
 <210> 13
 <211> 288
 <212> ADN
 <213> Artificial
 15
 <220>
 <223> Secuencia de ADN de una afilina- SPU11-3-A1_Cys basada en la ubiquitina
 <400> 13
 atgCGGatcc gtgTtgctac cctgacggga aagactatca cCctggaggt agaaccgtcc 60
 gacaccatcg aaaatgtcaa agctaaaatc caagacaaag aaggaattcc acctgaccag 120
 caacgcctag ctttcgcagg acgacaacta gaggacgggc tcaccctgtc tgactacgac 180
 atccgtcatg gtacgtcgct ccacctggca ctctctctgc gggccctcga gtccgggggc 240
 ggggggggag gatcttgcca tcaccatcac caccaccacc accaccac 288
 20
 <210> 14
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Artificial
 25
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 14
 30 ccatgattac gccaaGcttt ggagcc 26
 <210> 15
 <211> 31
 <212> ADN
 35 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador
 40 <400> 15
 ccatgggtct gatctcttc tctgaagacc g 31
 <210> 16
 <211> 31
 <212> ADN
 45 <213> Artificial

ES 2 414 605 T3

<220>
 <223> Cebador

5 <400> 16
 cggtcttcag agaaagagat cagacccatg g 31

<210> 17
 <211> 23
 10 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador

15 <400> 17
 gctagtatt gctcagcggg ggc 23

<210> 18
 <211> 66
 20 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 25 <223> Cebador

<400> 18
 ggatttgatc ctcgagtgcg gcggccatca ccatcaccac caccaccacc accactgaga 60
 tccggc 66

<210> 19
 <211> 66
 30 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 35 <223> Cebador

<400> 19
 gccggatctc agtggtggtg gtggtggtgg tgatggtgat ggccgccgca ctcgaggatc 60
 aaatcc 66

<210> 20
 <211> 32
 40 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 45 <223> Cebador

<400> 20
 ggatttgatc ctcgagtccg gcggccatca cc 32

<210> 21
 <211> 32
 50 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 55 <223> Cebador

<400> 21
 60 ggtgatggcc gccgactcg aggtacaaat cc 32

ES 2 414 605 T3

<210> 22
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Artificial
 5
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 22
 10 ggtgatggcc gccggactcg aggtacaaat cc 32
 <210> 23
 <211> 54
 <212> ADN
 15 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador
 20 <400> 23
 gggggaagct ttatcagtg gtggtggtgg tgggtgat ggtgatggca agat 54
 <210> 24
 <211> 35
 25 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador
 30 <400> 24
 ggagatatac aatatgggtc tgatctctt ctctg 35
 <210> 25
 <211> 291
 <212> ADN
 <213> Artificial
 35 <220>
 40 <223> Secuencia de ADN para un entramado proteínico de una ubiquitina modificada
 <400> 25
 atgaaatacc tattgcctac ggcagccgct ggattgttat tactcgcggc ccagccggcc 60
 atggccatgc aaatcttcgt taaaaccctg acgggaaaga ctatcacctt ggaggtagaa 120
 ccgtccgaca ccatcgaaaa tgtcaaagct aaaatccaag acaaagaagg aattccacct 180
 gaccagcaac gcctagcttt cgcaggacga caactagagg acgggctcac cctgtctgac 240
 tacaacatcc aaaaagaatc cacctccac ctggcactcc tcctgcgggc c 291
 <210> 26
 45 <211> 50
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 50 <223> Molde
 <400> 26
 atgcaaactc tcgttaaac cctgacggga aagactatca cctggaggt 50

55

ES 2 414 605 T3

<210> 27
 <211> 53
 <212> ADN
 <213> Artificial
 5
 <220>
 <223> Molde
 <400> 27
 10 ggattttagc tttgacattt tcgatggtgt cggacgggtc tacctccagg gtg 53
 <210> 28
 <211> 53
 <212> ADN
 15 <213> Artificial
 <220>
 <223> Molde
 20 <400> 28
 gtcaaagcta aatccaaga caaagaagga attccacctg accagcaacg cct 53
 <210> 29
 <211> 50
 25 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Molde
 30 <400> 29
 gggtagccc gtcctctagt tgcgtcctg cgaaagctag gcggtgctgg 50
 <210> 30
 <211> 50
 35 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 40 <223> Molde
 <400> 30
 gacgggctca cctgtctga ctacaacatc caaaaagaat ccaccctcca 50
 45 <210> 31
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Artificial
 50 <220>
 <223> Molde
 <400> 31
 55 gagtgcctgc agcaggagtg ccaggtggag ggtggattc 39
 <210> 32
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial
 60 <220>
 <223> Cebador
 <400> 32
 65 gatatacata tgcaaatctt cg 22

ES 2 414 605 T3

<210> 33
<211> 18
<212> ADN
<213> Artificial
5
<220>
<223> Cebador

<400> 33
10 gtgggtgctcg agtgctcg 18

<210> 34
<211> 55
<212> ADN
15 <213> Artificial

<220>
<223> Cebador

20 <220>
<221> Característica variada
<222> (20)..(21)
<223> n es a, c, g, ó t

25 <220>
<221> Característica variada
<222> (26)..(27)
<223> n es a, c, g, ó t

30 <220>
<221> Característica variada
<222> (32)..(33)
<223> n es a, c, g, ó t

35 <400> 34
ccagccggcc atggccatgn nkacnknkt tnnkaccctg acgggaaaga ctatc 55

<210> 35
<211> 55
40 <212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador
45
<220>
<221> Característica variada
<222> (23)..(24)
<223> n es a, c, g, ó t
50
<220>
<221> Característica variada
<222> (26)..(27)
<223> n es a, c, g, ó t
55
<220>
<221> Característica variada
<222> (29)..(30)
<223> n es a, c, g, ó t
60
<220>
<221> Característica variada
<222> (32)..(33)
<223> n es a, c, g, ó t
65

ES 2 414 605 T3

<220>
<221> Característica variada
<222> (35)..(36)
<223> n e s a, c, g, ó t
5
<400> 35
caggaggagt gccaggtgga gmnmnmnmn mnmnngatg ttgtagtcag acagg 55
10
<210> 36
<211> 34
<212> ADN
<213> Artificial
15
<220>
<223> Cebador
<400> 36
gttattactc gcggcccagc cggccatggc catg 34
20
<210> 37
<211> 48
<212> ADN
<213> Artificial
25
<220>
<223> Cebador
<400> 37
gagttttgt tcggcctcga gggcccgcag gaggagtgcc aggtggag 48
30

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la preparación de un conjugado, que abarca los siguientes componentes:

5 una o varias moléculas polipeptídicas (I) basadas en la ubiquitina humana, y, unido(s) covalentemente con ésta, uno o varios componentes funcionales (II) que se escogen entre el conjunto formado por polipéptidos y proteínas, polímeros orgánicos, azúcares, sustancias de bajo peso molecular, péptidos, así como derivados de estas sustancias, realizándose que, después del acoplamiento de (I) a (II), la funcionalidad de todos los componentes permanece conservada, y realizándose que el procedimiento comprende las siguientes etapas:

- a) Puesta a disposición de la ubiquitina humana;
- 15 b) Puesta a disposición de un ligando, que se escoge entre el conjunto formado por unos/as (poli)péptidos/proteínas;
- c) Selección de los aminoácidos 2, 4, 6, 62, 63, 64, 65 y 66 de la ubiquitina humana;
- d) Modificación de los aminoácidos seleccionados mediante sustitución mediando conservación del motivo de plegamiento del tipo del de la ubiquitina;
- 20 e) Puesta en contacto de la proteína modificada con el ligando puesto a disposición en la etapa b);
- f) Determinación de aquéllas proteínas, que son adecuadas para una fijación específica a los ligandos con una constante de disociación de $K_D = 10^{-5}$ M o menor, efectuándose la detección de la actividad de fijación a través de la técnica ELISA o de una resonancia de plasmones superficiales;
- 25 g) Acoplamiento de los componentes (I) y (I) en una región situada fuera de la región expuesta superficialmente de la lámina plegada β de la molécula polipeptídica (I), que está prevista para la fijación específica al ligando, a través de una fusión terminal de péptidos con (I), o a través de unas cadenas laterales de cisteína o lisina en (I);
- h) Aislamiento del conjugado; y
- i) Detección de la funcionalidad de ambos componentes del conjugado.

30 2. Procedimiento para la preparación de un conjugado tal como se ha definido en la reivindicación 1, partiendo de un componente (I) con una secuencia conocida, que abarca las siguientes etapas:

- Identificación de unos restos de aminoácidos adecuados para el acoplamiento mediante un análisis de la estructura espacial de la proteína, de manera preferida de unos restos situados fuera de la superficie de interacción de (I) con el ligando;
- 35 - Activación de un partícipe en el acoplamiento mediante un reactivo adecuado de acoplamiento;
- Realización de la reacción de acoplamiento;
- Aislamiento del conjugado; y
- 40 - Detección de la funcionalidad de ambos componentes del conjugado.

3. Procedimiento para la preparación de un conjugado tal como se ha definido en la reivindicación 1, partiendo de un componente (I) con una secuencia conocida, en el que no se había identificado ningún resto de aminoácido adecuado para el acoplamiento, que abarca las siguientes etapas:

- 45 - Introducción de unos restos de aminoácidos adecuados para el acoplamiento mediante sustitución, inserción o fusión, de manera preferida de unos restos expuestos sobre la superficie fuera de la superficie de interacción de (I) con los ligandos;
- Detección de la accesibilidad de los restos de aminoácidos introducidos;
- Detección de la funcionalidad del componente (I) modificado de esta manera;
- 50 - Activación de un partícipe en el acoplamiento mediante un adecuado reactivo de acoplamiento;
- Realización de la reacción de acoplamiento;
- Aislamiento del conjugado; y
- Detección de la funcionalidad de los componentes del conjugado.

55 4. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, realizándose que el acoplamiento se efectúa a través de los restos de lisina 11, 29, 33 y 48 de la molécula de ubiquitina.

5. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2, realizándose que la adicional fusión terminal de péptidos con (I) contiene uno o varios restos de cisteína o uno o varios restos de lisina, realizándose que estos restos de aminoácidos no participan preferiblemente en la interacción de (I) con el ligando.

6. Procedimiento de acuerdo con una o varias de las reivindicaciones 1-5, realizándose que el componente funcional (II) es un péptido, un polipéptido o una proteína, de manera preferida una proteína de cromóforo, una enzima, una inmunoglobulina, un derivado de una inmunoglobulina, una toxina o un polipéptido de acuerdo con I.

65

7. Procedimiento de acuerdo con una o varias de las reivindicaciones 1-5, realizándose que el componente funcional (II) es un polímero, de manera preferida un dextrano, un polimetacrilato, un Sepharose, una agarosa, un polímero vinílico, un poliestireno, un gel de sílice, una celulosa, un poli(etilenglicol) o un derivado de un polímero.
- 5 8. Procedimiento de acuerdo con una o varias de las reivindicaciones 1-5, realizándose que el componente funcional (II) es una sustancia de bajo peso molecular, de manera preferida un colorante, biotina, digoxigenina, un metal pesado, un agente formador de quelatos, un radioisótopo, un antibiótico o una sustancia citotóxica.
- 10 9. Procedimiento de acuerdo con una o varias de las reivindicaciones precedentes, realizándose que el componente (I) tiene una propiedad de fijación generada de nuevas para la fijación específica a un ligando, que es un polipéptido o una proteína, de manera preferida a unas inmunoglobulinas y unos derivados de inmunoglobulinas, unas proteínas obtenidas a partir del plasma sanguíneo, unos factores y unos inhibidores de la coagulación sanguínea, unas interleucinas, unas citocinas, unas proteínas de receptores, unas glicoproteínas, unas proteínas víricas y unos marcadores de la superficie celular, de manera preferida CD 14, CD 25, CD 34.
- 15 10. Procedimiento de acuerdo con una o varias de las reivindicaciones precedentes, realizándose que el componente (I) tiene una propiedad de fijación generada de nuevas para la fijación específica a un ligando, que es un péptido, de manera preferida un apéndice de afinidad, de manera preferida una marca S, una marca His, una marca Strep, una marca Myc o una marca FLAG, o unos péptidos de procedencia vírica.
- 20 11. Procedimiento de acuerdo con una o varias de las reivindicaciones precedentes, realizándose que el componente (I) tiene una propiedad de fijación generada de nuevas para la fijación específica a un ligando, que es una sustancia de bajo peso molecular, de manera preferida unos esteroides, colesterol y unas sustancias contaminantes, tales como, por ejemplo, unos hidrocarburos halogenados.
- 25 12. Procedimiento de acuerdo con una o varias de las reivindicaciones precedentes, realizándose que el componente (II) es uno o varios polipéptidos basados en la ubiquitina, que son idénticos a (I), y que están unidos por enlaces covalentes con éste, con lo cual se alcanza un aumento de la afinidad para los ligandos de (I) a través de unos efectos de avidéz.
- 30 13. Procedimiento de acuerdo con una o varias de las reivindicaciones precedentes, realizándose que el componente (II) es un polipéptido, una proteína o un polímero, con el/la que el componente (I) está unido múltiples veces por enlaces covalentes, con lo cual se alcanza un aumento de la afinidad para los ligandos de (I) a través de unos efectos de avidéz.
- 35 14. Procedimiento de acuerdo con una o varias de las reivindicaciones precedentes, realizándose que el componente (II) es un polipéptido o un polímero, el cual, después de haberse unido por enlaces covalentes con el componente (I) pasa a tomar parte de enlaces covalentes o no covalentes con otros conjugados de este tipo, con lo cual se alcanza un aumento de la afinidad para los ligandos de (I) a través de unos efectos de avidéz.
- 40 15. Procedimiento de acuerdo con una o varias de las reivindicaciones precedentes, realizándose que el componente (I) es SPU11-3-A1 (SEQ ID NO: 12 y 13).
- 45 16. Procedimiento de acuerdo con una o varias de las reivindicaciones precedentes, que abarca además la producción de un estuche diagnóstico con un conjugado preparado de acuerdo con una o varias de las reivindicaciones 1-15.
- 50 17. Procedimiento de acuerdo con una o varias de las reivindicaciones precedentes, que abarca además la preparación de una composición farmacéutica con un conjugado preparado de acuerdo con una o varias de las reivindicaciones 1-15.
- 55 18. Procedimiento de acuerdo con una o varias de las reivindicaciones precedentes, que abarca además la preparación de una composición para el enriquecimiento por afinidad con un conjugado preparado de acuerdo con una o varias de las reivindicaciones 1-15, realizándose que el componente funcional es una membrana, unas bolitas poliméricas o un material de soporte cromatográfico.

Figura 1:



Figura 2:

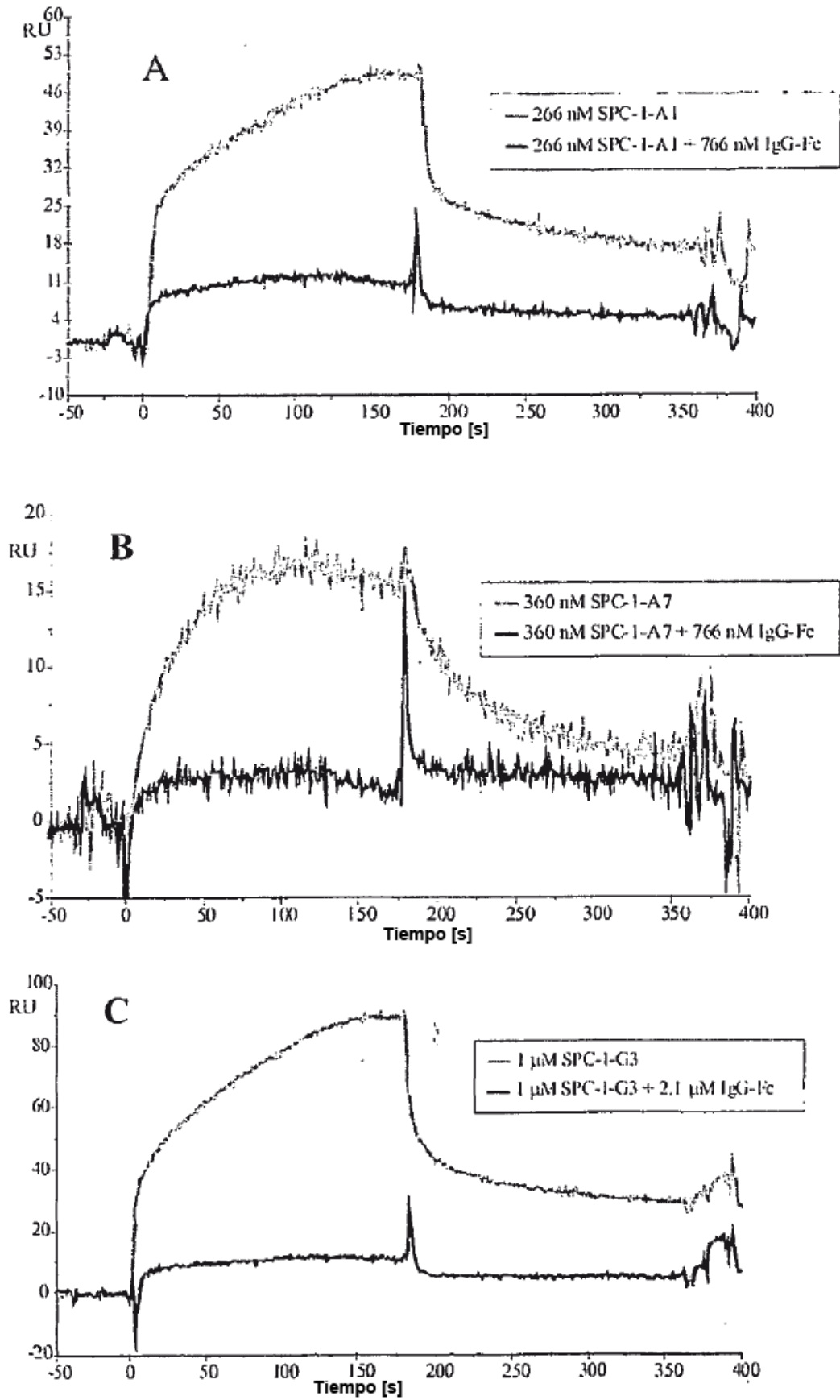


Figura 3:

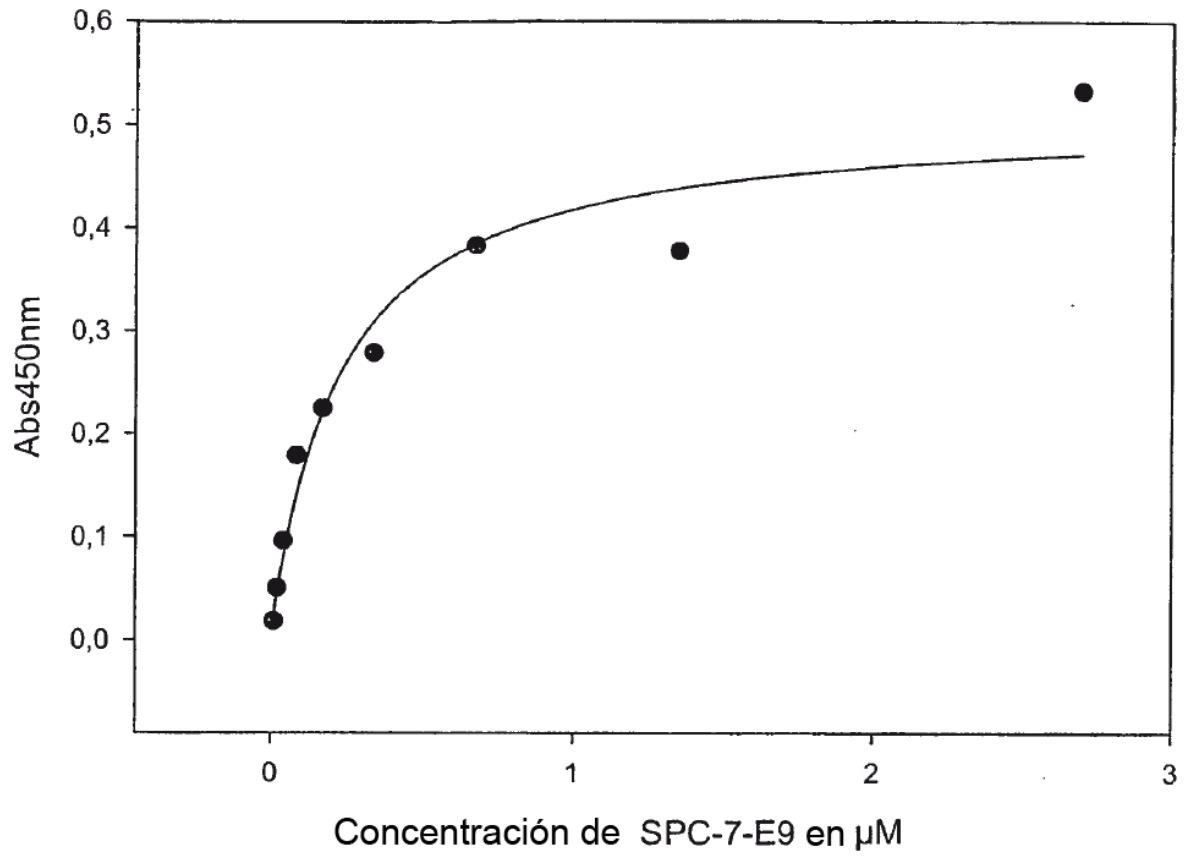


Figura 4:

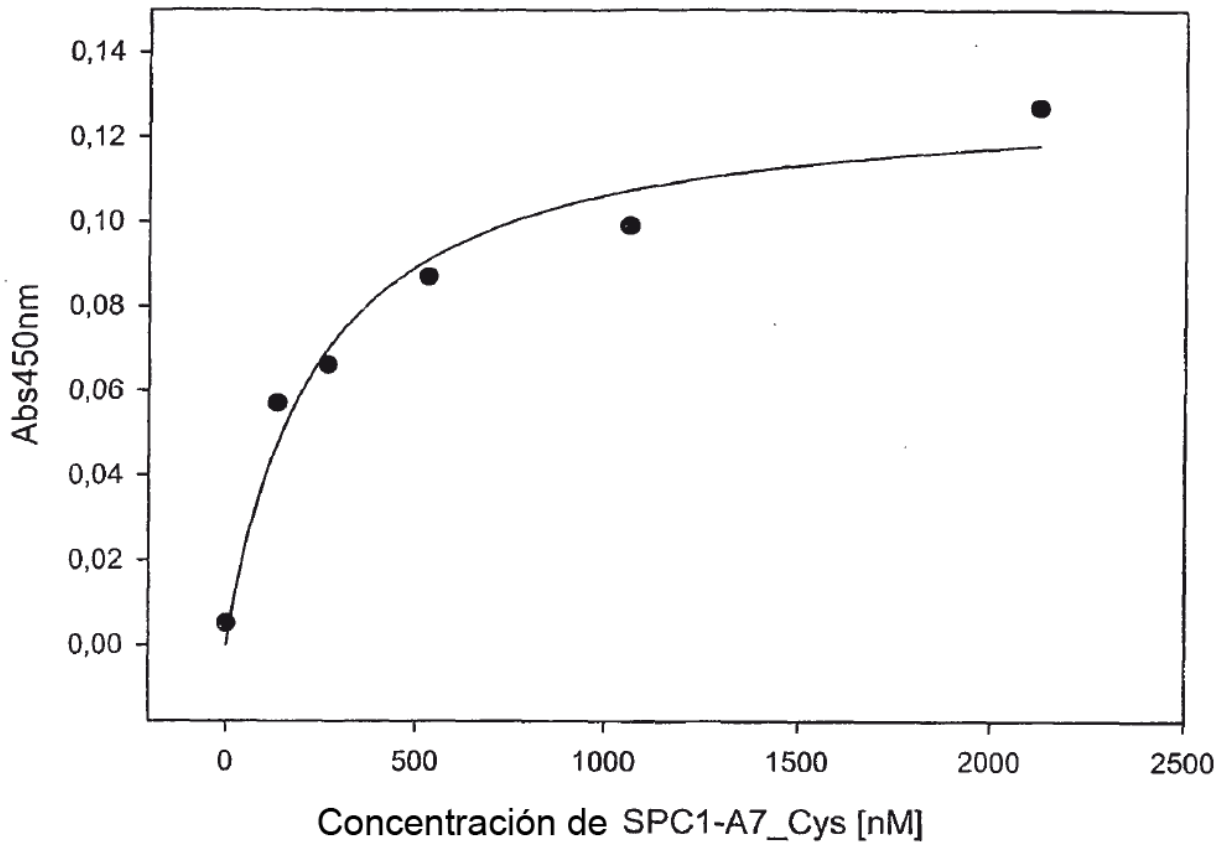


Figura 5:

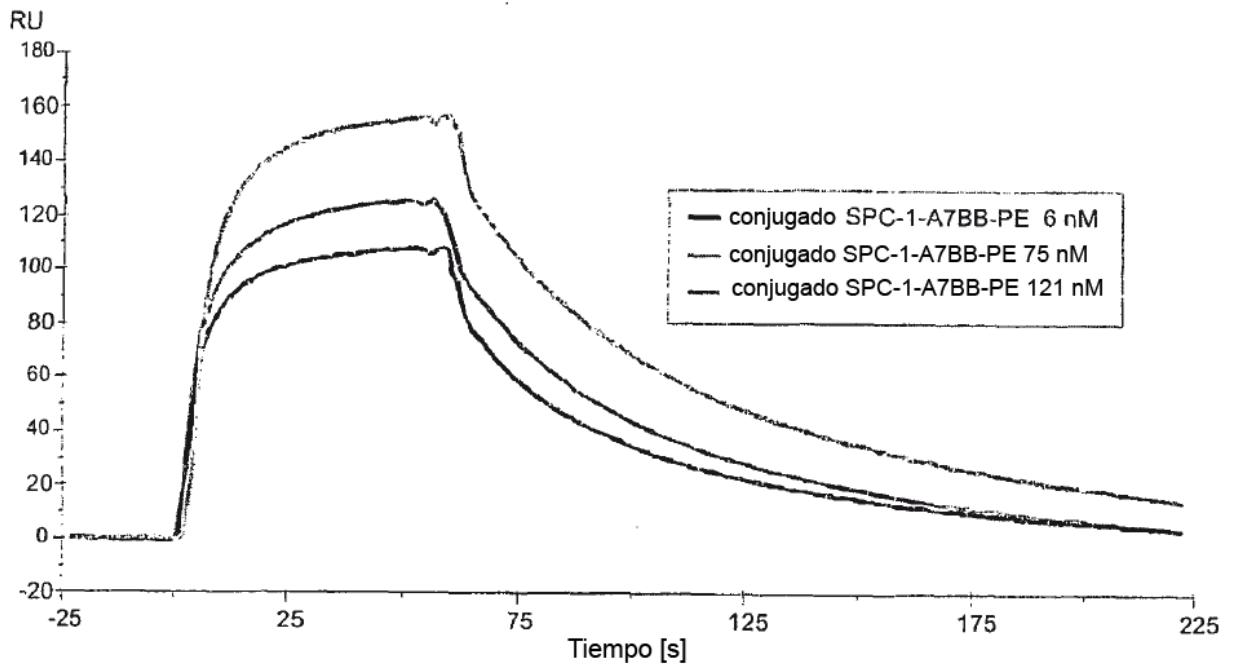


Figura 6:

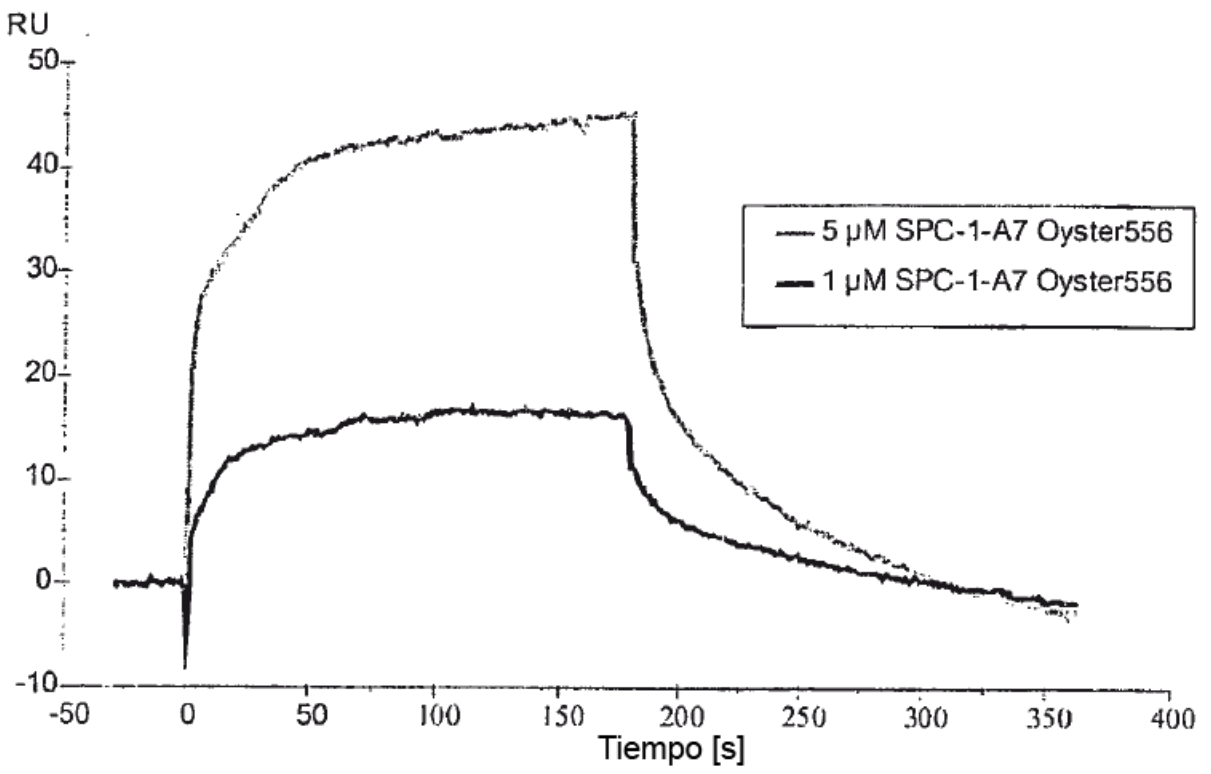


Figura 7:

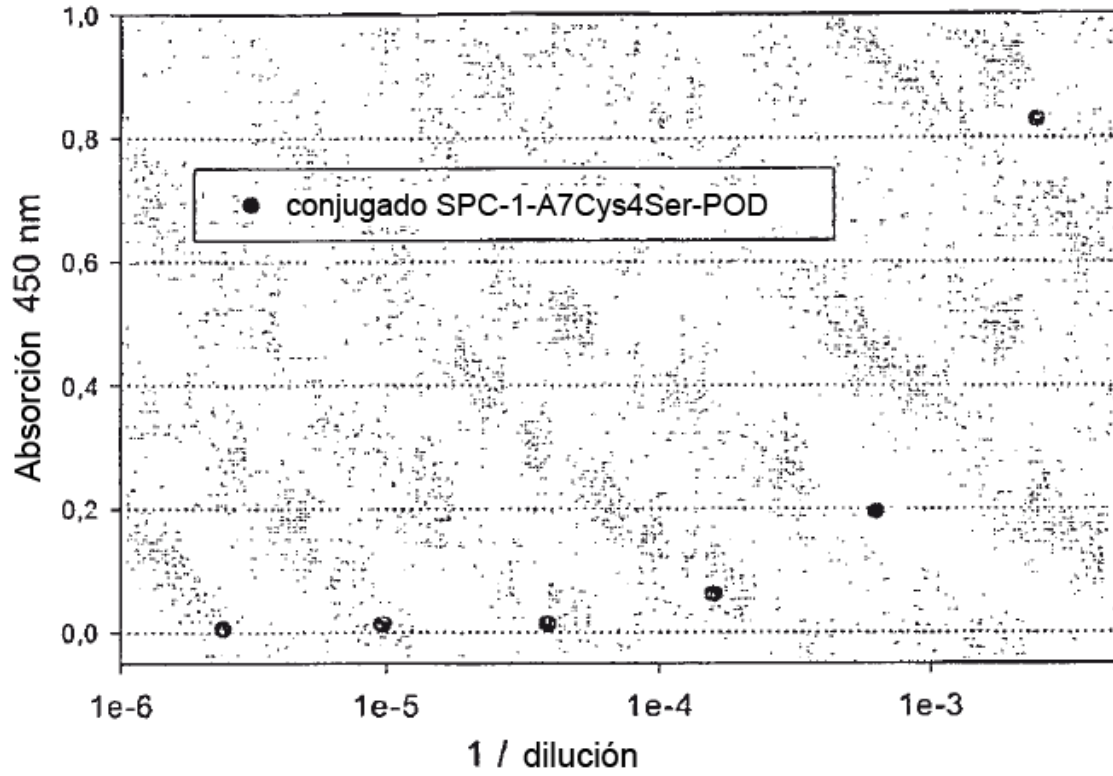


Figura 8:

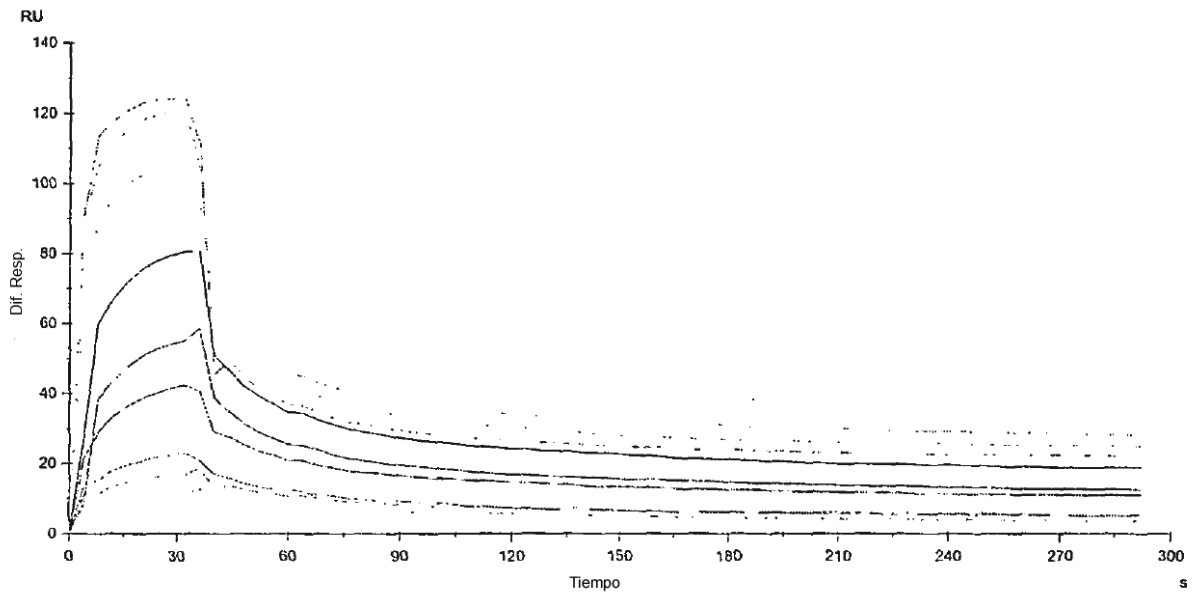


Figura 9:

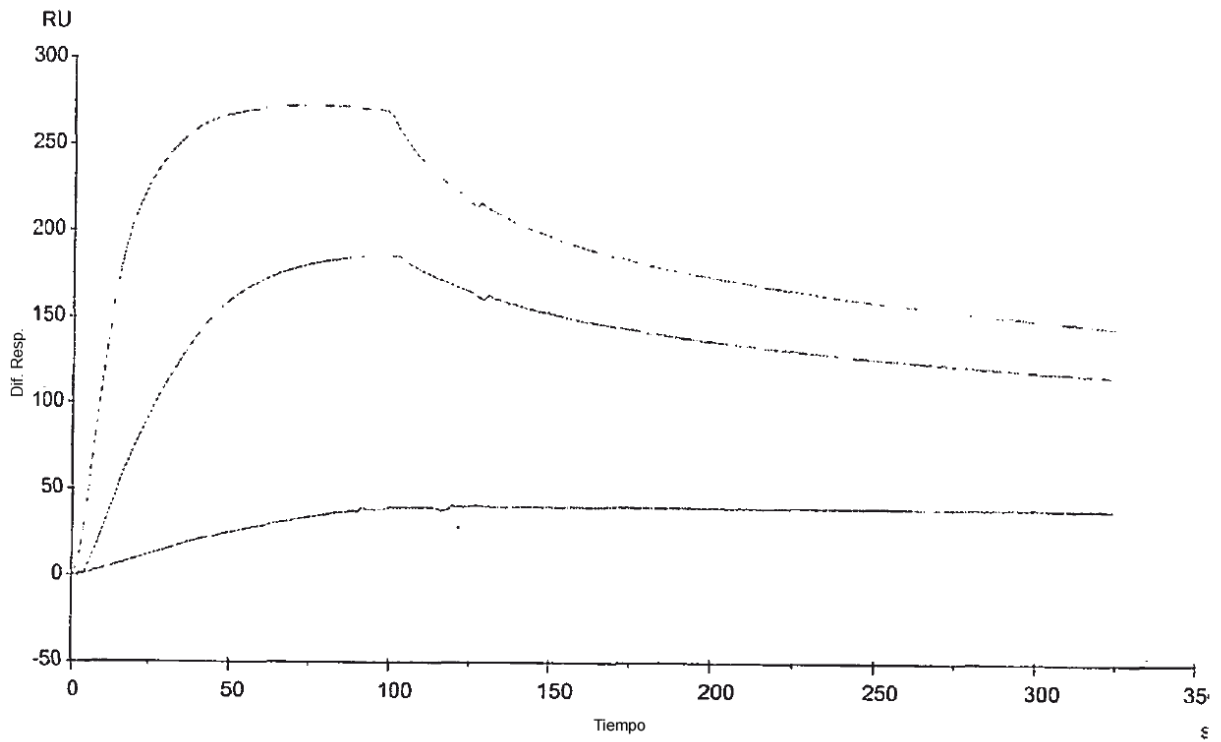


Figura 10:

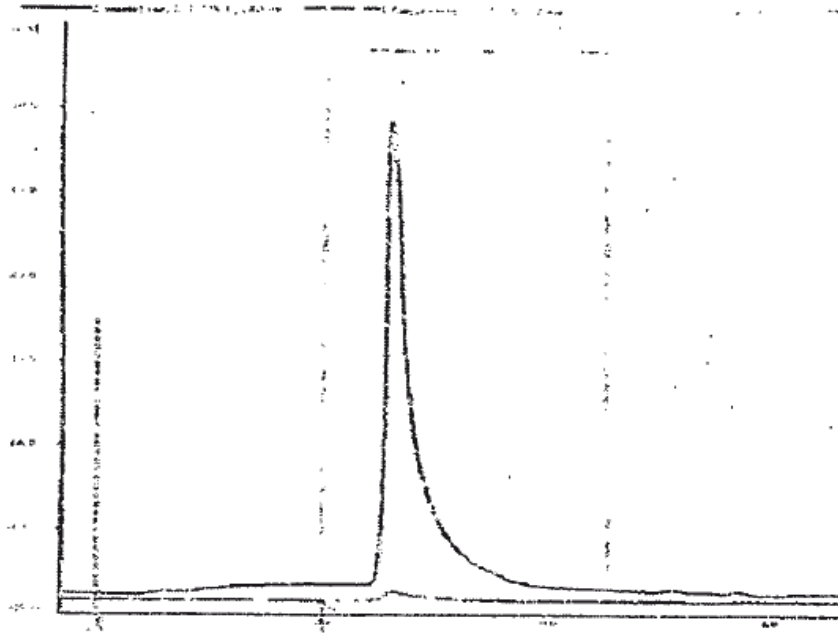


Figura 11:

