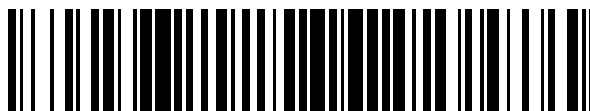


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 420 905**

51 Int. Cl.:

C12N 11/02 (2006.01)

C07K 14/215 (2006.01)

C07K 17/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.03.2000 E 00929335 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.05.2013 EP 1165764**

54 Título: **Acoplamiento covalente, sin enlazadores, de bacteriorrodopsina en forma de membrana púrpura**

30 Prioridad:

31.03.1999 DE 19914702

08.11.1999 DE 19953607

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

27.08.2013

73 Titular/es:

U-NICA TECHNOLOGY AG (100.0%)

Industriestrasse 4

7208 Malans , CH

72 Inventor/es:

HAMPP, NORBERT;

SEITZ, ARNE;

PASTERNAK, RALF y

FUCHSBAUER, H.-L.

74 Agente/Representante:

DURÁN MOYA, Luis Alfonso

ES 2 420 905 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

Acoplamiento covalente, sin enlazadores, de bacteriorrodopsina en forma de membrana púrpura

5 La invención se refiere al acoplamiento covalente sin enlazadores, de bacteriorrodopsina (BR) de forma unida a membrana, en especial en forma de membrana púrpura.

10 La bacteriorrodopsina (BR) es una proteína de la membrana que se presenta, por ejemplo, en halobacterias en forma de cristales no solubles en agua, de forma discooidal, bidimensionales, la llamada membrana púrpura (PM). La membrana púrpura tiene un grosor de unos 5 nm. El diámetro de la membrana púrpura se encuentra de manera típica en la zona de 300 nm hasta 1000 nm.

15 La membrana púrpura se compone de moléculas de bacteriorrodopsina en forma α -helicoidal y aproximadamente 10 moléculas de lípidos para cada molécula de bacteriorrodopsina. La bacteriorrodopsina está casi completamente incorporada en la membrana de lípidos, constituida a base de las moléculas de lípidos. De ello resulta, una desacostumbrada estabilidad termodinámica.

20 La bacteriorrodopsina en forma de membrana púrpura es utilizada técnicamente como material fotocromico para aplicaciones ópticas. Además la bacteriorrodopsina en forma de membrana púrpura tiene significación técnica como material con características fotoeléctricas.

25 Para estas aplicaciones técnicas es ventajosa, entre otras, la reticulación covalente de membranas púrpura. En la utilización de la bacteriorrodopsina en aplicaciones fotovoltaicas se consiguen para cada capa de membrana púrpura aproximadamente 300 mV. Mediante la constitución de varias capas de membrana púrpura una encima de otra mediante reticulación covalente, se pueden conseguir elementos que facilitan tensiones más elevadas. Otro aspecto adicional interesante es el acoplamiento covalente de membranas púrpura sobre superficies, polímeros o pequeñas moléculas, por ejemplo colorantes.

30 Normalmente se pretende la utilización de bajo peso molecular de enlazadores, por ejemplo glutaraldehído, para la unión covalente de membranas púrpura. No obstante estas reacciones de acoplamiento tienen lugar con un rendimiento muy desfavorable. La causa de ello es que pocos aminoácidos de la bacteriorrodopsina se encuentran fuera de la doble capa de lípidos de la membrana, están sometidos a impedimento estérico y reaccionan de modo difícil con los reactivos de acoplamiento de bajo peso molecular. Los reactivos de acoplamiento en forma de bajo peso molecular tienen además otro importante inconveniente. Pueden entrar a través del canal de protones hasta el centro activo de la bacteriorrodopsina. En especial, una reacción de las moléculas de los enlazadores con el lugar de unión del retinaldehído en la lisina-216 (base Schiff) conduce a perjuicios irreversibles de las funciones deseadas de la proteína. Por esta razón los reactivos de acoplamiento de bajo peso molecular, ampliamente extendidos, que reaccionan con grupos amino, son especialmente desfavorables. Además, los enlazadores de molécula pequeña deben ser suministrados en exceso para conseguir, como mínimo, un rendimiento y velocidad de reticulación aceptables en cierta medida. Múltiples moléculas sin reaccionar permanecen en el material y deben ser eliminadas después de la reacción. Esto no es posible, por ejemplo, en la fabricación de películas ópticas.

45 Los inconvenientes de los enlazadores de bajo peso molecular se reúnen brevemente a continuación en los siguientes puntos:

- Pocos aminoácidos de la bacteriorrodopsina son accesibles para los enlazadores.
- Los enlazadores que reaccionan con grupos amino funcionales no se deben utilizar.
- Los enlazadores que no han reaccionado se deben eliminar, puesto que de lo contrario tiene lugar una postreacción incontrolada, duradera en el tiempo, que conduce a una variación continuada de las propiedades del material y a falta de estabilidad a largo plazo.

50 El documento EP 0 417 541 da a conocer un procedimiento para la reticulación de proteínas orientadas con utilización de enlazadores de bajo peso molecular tales como glutaraldehído, carbodiimida o diaminas.

55 El documento B.J. Gaffney, Biochim. Biophys. Acta, 822 (1985) 289-313 es un artículo de resumen sobre la reticulación química y bioquímica de diferentes partes de la membrana. El artículo da a conocer entre otros, la reticulación bioquímica de proteínas del citoesqueleto y de la membrana no especificadas en detalle, de eritrocitos mediante transglutaminasa propia de las células en la alimentación de un ionóforo de calcio y de calcio minimolar. La reticulación de la bacteriorrodopsina es descrita solamente, por el contrario, con utilización de enlazadores fotoactivables de bajo peso molecular, con un grupo de isotiocianato.

60 El documento WO 99/06446 da a conocer un procedimiento para el acoplamiento de transglutaminasa catalizada de proteínas o péptidos en un soporte. El documento no proporciona indicaciones de si la bacteriorrodopsina es apropiada como sustrato de una transglutaminasa.

65 Un objetivo de la invención consiste por lo tanto en un procedimiento para el acoplamiento covalente de

bacteriorrodopsina en forma de membrana, en especial para reticulación directa de membranas púrpura sin utilización de enlazadores de bajo peso molecular. Otro campo de utilización es el acoplamiento de bacteriorrodopsina en forma de membrana en superficies de polímeros o materiales auxiliares, en especial colorantes.

5 Este objetivo es conseguido mediante un procedimiento para la fabricación de bacteriorrodopsina reticulada covalente, la cual se caracteriza porque la bacteriorrodopsina en forma unida a la membrana es utilizada como sustrato de una transglutaminasa, en especial, de una transglutaminasa bacteriana y de esta forma es reticulada de forma covalente.

10 Bajo el concepto de bacteriorrodopsina, tal como se utilizará en adelante, se comprenderá tanto la bacteriorrodopsina de tipo natural o salvaje (BR-WT) como la bacteriorrodopsina. El concepto de variantes de bacteriorrodopsina comprende también las moléculas de bacteriorrodopsina que se diferencian de BR-WT por adición, sustitución, delección y/o inserción de aminoácidos, en especial como mínimo de un aminoácido, de manera especialmente preferente un mínimo de dos, de manera más preferente un mínimo de tres y hasta 50, preferentemente hasta 20, y en especial preferentemente hasta 10 aminoácidos. Además se comprenden bajo el concepto de variantes, moléculas de bacteriorrodopsina en las que el retinal está sustituido por moléculas análogas a retinal así como moléculas de bacteriorrodopsina que han sido modificadas químicamente, por ejemplo, mediante introducción de grupos protectores o grupos secundarios funcionales.

20 Para el objetivo de la presente invención la expresión "bacteriorrodopsina" comprende también proteínas de la membrana estructuralmente relacionadas con la bacteriorrodopsina, que se encuentran en forma unida a la membrana y que presentan una homología de mínimo 70%, más preferentemente como mínimo 80% y con máxima preferencia como mínimo 90% con respecto al tipo natural o salvaje de la bacteriorrodopsina.

25 La homología, tal como se utiliza en esta descripción, es definida del modo siguiente

$$H (\%) = (1 - A/[BR-WT]) \times 100,$$

30 en la que H significa homología en porcentaje, A es el número de variaciones con respecto a la secuencia salvaje de la bacteriorrodopsina y [BR-WT] el número de aminoácidos de la secuencia de la bacteriorrodopsina de tipo salvaje.

35 Son ejemplos para proteínas de la membrana estructuralmente relacionadas con bacteriorrodopsina en forma unida a la membrana, que están comprendidos en la invención, la halorrodopsina así como sensorrodopsina. Estas proteínas de la membrana se encuentran de forma no cristalina en la membrana.

40 Los materiales de bacteriorrodopsina a utilizar preferentemente según la invención comprenden bacteriorrodopsina de tipo salvaje así como variantes de la bacteriorrodopsina con una secuencia modificada de aminoácidos. De manera preferente las variantes de la bacteriorrodopsina presentan una función física modificada, en especial una sensibilidad a la luz modificada, un color modificado o una cinética modificada del comportamiento fotocromático de la bacteriorrodopsina. Tienen la máxima preferencia las variantes de bacteriorrodopsina en la que se han delecionado o bien introducido lugares de unión para la reticulación enzimática con transglutaminasa. De manera especialmente preferente se utilizarán variantes de bacteriorrodopsina en las que se ha delecionado Gln o Lys o que se han cambiado por otros aminoácidos. En la bacteriorrodopsina se encuentra un lugar de unión Lys-intracelular (término =C-) en las posiciones Lys41, Lys42, Lys159 y Lys 172 así como (término -N) extracelular en la posición Lys129. Los puntos de unión Gln se encuentran en la bacteriorrodopsina extracelular (término =N-) en las posiciones Gln3 y Gln75. Se ha comprobado que en especial los aminoácidos Gln3 y Lys129 actúan como lugares de unión en la transformación con transglutaminasa.

50 Son además especialmente preferentes las variantes de bacteriorrodopsina en las que se han introducido en un bucle Gln o Lys de manera tal que es accesible para la transglutaminasa. Son especialmente preferentes variantes de la bacteriorrodopsina en las que se encuentran uno o dos lugares de unión para la transglutaminasa. En caso de existencia de dos lugares de unión que son accesibles para la transglutaminasa, ambos lugares de unión pueden estar dispuestos o bien sobre el mismo lado de la membrana o preferentemente sobre diferentes lados de la membrana, es decir un lugar de unión sobre la cara citoplasmática y otro sobre la cara extracelular. De esta manera es posible una disposición deseada en capas superpuestas de membranas en oposición a una reticulación estática mediante una superposición controlada por capas se pueden fabricar elementos en los que la tensión de 300 Mv por capa aumenta con el número de capas. En procedimientos conocidos hasta el momento para la constitución de membranas púrpura BR de varias capas se consigue solamente una orientación preferente de aproximadamente 10%. Por el contrario, una disposición en capas superpuestas controlada es posible, por el contrario, con una orientación preferente sustancialmente elevada. De manera preferente se superponen de 4 a 10 capas de membrana púrpura BR, de manera que se puede conseguir una orientación preferente de más de 30%, preferentemente más de 50% y de manera especialmente preferente más de 80%.

65 Además son preferentes las variantes de bacteriorrodopsina en las que el retinal ha sido cambiado por moléculas análogas al retinal de manera que, por ejemplo, se puede variar el fotociclo del material de bacteriorrodopsina. Las

moléculas análogas al retinal son moléculas que pueden ser incorporadas como cromóforo en bacteriorrodopsina y que se diferencian del retinal, por ejemplo, por una derivatización.

5 Otra clase adicional preferente de materiales de bacteriorrodopsina son variantes de bacteriorrodopsina o bien bacteriorrodopsina de tipo salvaje que han sido modificadas químicamente. Son modificaciones apropiadas, por ejemplo, las que se describen en la patente US 5.922.843. Las variantes pueden ser también modificadas por bloqueo de aminoácidos, por ejemplo, mediante grupos de protección u otras modificaciones químicas de las cadenas de los aminoácidos.

10 Las variantes de la bacteriorrodopsina pueden ser conseguidas también mediante tratamiento enzimático previo de bacteriorrodopsina de tipo salvaje o bien de variantes de bacteriorrodopsina. La división enzimática puede ser realizada, por ejemplo, mediante peptidasas, de manera que en especial el término amino es eliminado o se llevarán a cabo divisiones en los bucles ("Loops") que se encuentran por fuera de la membrana.

15 Se pueden utilizar también variantes que presentan una combinación de varias modificaciones de las anteriormente mencionadas.

20 Se ha manifestado de forma sorprendente que la bacteriorrodopsina en forma unida a la membrana y en especial la forma de membrana púrpura es un sustrato de la transglutaminasa y en especial de la transglutaminasa bacteriana (bTGA). Esto es por lo tanto especialmente inesperado puesto que, tal como se ha explicado, los aminoácidos de la bacteriorrodopsina en forma de membrana, especial en forma de membrana púrpura, se encuentran en una proporción predominante dentro de la capa de lípidos de la membrana y por lo tanto no son accesibles. La bacteriorrodopsina no se encuentra en forma libre en la membrana púrpura sino como estructura cristalina proteína-lípido de estructura discoidal, de orden superior. No obstante, de modo sorprendente, es adoptada como sustrato y transformada por la transglutaminasa bacteriana.

25 Hasta el momento se sabía solamente que proteínas solubles tales como, por ejemplo, enzimas, podían ser acopladas mediante catalizador de transglutaminasa a un soporte, por ejemplo, gelatina o enzima de marcado. Este procedimiento se describe, por ejemplo, en el documento DE 197 32 917 C1. Además, se hacen reaccionar las soluciones de proteínas con transglutaminasa. La indicación de que las proteínas no solubles en agua o agregados proteínas-lípidos completamente insolubles en agua podían ser adoptados por la transglutaminasa como sustrato no se indica en el documento DE 197 32 917. Mucho menos se toma en consideración la bacteriorrodopsina ni tampoco la bacteriorrodopsina en forma de membrana púrpura.

30 Un procedimiento similar para la transformación de proteínas solubles en agua con TGA, por ejemplo, la reticulación de caseína o gelatina, se describen también en los documentos US 5.731.183 y US 5.948.662. Para ello se hacen reaccionar soluciones de las proteínas con las transglutaminasas especiales dadas a conocer en dichas patentes US. No obstante, no se encuentra divulgación o indicación de que también proteínas insolubles en agua o estructuras relacionadas podían servir como sustrato para TGA. Todavía menos se explican la bacteriorrodopsina o la bacteriorrodopsina en forma de membrana púrpura.

35 Actualmente se ha descubierto, de manera sorprendente, que con ayuda de TGA, bacteriorrodopsina en forma de membrana o incluso en forma de membrana púrpura, se pueden reticular de manera directa una encima de otra, sin añadidura de enlazadores de bajo peso molecular. Además, se pueden unir a los polímeros de bacteriorrodopsina también otras sustancias tales como sustancias superficiales o sustancias auxiliares, por ejemplo, colorantes. La reticulación tiene lugar aproximadamente a 40°C. Mediante calentamiento posterior del conjunto de reacción a 80°C se inactiva el TGA. La bacteriorrodopsina en forma de membrana púrpura resiste el tratamiento térmico sin daños. De este modo se puede interrumpir la reacción de modo controlado. No es necesaria la retirada de enlazadores sobrantes en forma de bajo peso molecular.

40 Las membranas púrpura de bacteriorrodopsina, en especial diferentes variantes de membranas púrpura de bacteriorrodopsina, pueden actuar como primero y también como segundo sustrato para TGA, en especial bTGA. De esta manera se consiguen múltiples posibilidades para la reticulación directa de membranas púrpura entre sí y/o para acoplamiento covalente de polímeros, superficies y/o sustratos en bacteriorrodopsina en forma de membrana púrpura así como en forma reticulada y también no reticulada.

45 Un aspecto de la invención se refiere, por lo tanto, a un procedimiento para la unión covalente de bacteriorrodopsina en forma de membrana, en especial en forma de membrana púrpura en polímeros, superficies y/o materiales auxiliares mediante TGA, de manera que la bacteriorrodopsina y el sustrato adicional son tratados con una transglutaminasa y se enlazan entre sí de forma covalente. Mediante este procedimiento se pueden constituir, por ejemplo, conjugados enlazados de forma covalente que consisten en bacteriorrodopsina en forma de membrana púrpura y otra molécula adicional. Son polímeros apropiados, en los que se puede unir la bacteriorrodopsina en forma de membrana púrpura mediante TGA de forma covalente, por ejemplo, gelatina, alcohol polivinílico y polietileno que pueden estar modificados mediante grupos secundarios. Son sustratos adecuados o materiales auxiliares en especial compuestos de bajo peso molecular tales como, por ejemplo, colorantes.

Dado que, según la invención, se puede renunciar a cualquier molécula de enlace, se consiguen ventajas notables desde el punto de vista económico y tecnológico.

Además de las bacteriorrodopsinas anteriormente descritas en forma unida a la membrana, se pueden reticular de forma covalente, según la invención, con utilización de una transglutaminasa, también bacteriorrodopsina en forma soluble, en especial en forma de monómero o trímero. En especial la bacteriorrodopsina tal como se constituye por expresión eteróloga de bacteriorrodopsina o bien bacteriorrodopsina que se produce por solubilización de membranas púrpura (bacteriorrodopsina monomerizada) se puede transformar según el procedimiento de la invención como sustrato de una glutaminasa y puede ser reticulada de forma covalente.

Además, es también posible según la invención transformar varias proteínas de membrana de bacteriorrodopsina como sustrato de una transglutaminasa y proceder a su reticulación covalente si se encuentran en forma unida a la membrana. En especial se pueden transformar proteínas de membrana que contienen varias secciones de aminoácido que atraviesan la membrana, en especial de cuatro a ocho estructuras helicoides (ante todo α -helicoides). En especial son apropiadas para proteínas de la membrana las proteínas de canal, proteínas portadoras, receptoras y proteínas G y otras.

El procedimiento de la invención puede ser utilizado en especial para reticular de forma covalente dos materiales de bacteriorrodopsina iguales o diferentes, tal como se ha descrito anteriormente. En otra forma de realización preferente se utiliza el procedimiento según la invención para unir de forma covalente un material de bacteriorrodopsina a otro material. Un ejemplo preferente para ello es la unión covalente de materiales de bacteriorrodopsina, en especial materiales de bacteriorrodopsina en forma de membrana púrpura sobre una superficie, con un polímero y/o en un compuesto de molécula pequeña (designada también como material auxiliar).

Para la unión covalente a una superficie se utiliza la bacteriorrodopsina, por ejemplo, como sustrato de la transglutaminasa, de manera que como segundo sustrato se utiliza una molécula que además del grupo de unión para la transglutaminasa presenta otro grupo funcional, por ejemplo, un grupo tiol de terminación. El aducto formado por la reacción con transglutaminasa puede ser inmovilizado entonces con intermedio del grupo funcional introducido, sobre una superficie. Por ejemplo, mediante la introducción de un grupo tiol, la bacteriorrodopsina, por ejemplo, puede ser inmovilizada de forma covalente sobre una superficie de oro. De esta manera es posible conseguir una inmovilización controlada de bacteriorrodopsina, en especial en forma de membrana púrpura, puesto que la bacteriorrodopsina solamente se puede unir lateralmente de forma covalente a la superficie en la que se ha introducido el grupo tiol.

Además, es también posible la unión de bacteriorrodopsina de manera directa a superficies mediante transglutaminasa, de forma covalente, siempre que la superficie presente grupos que puedan actuar como sustrato de la transglutaminasa.

Además, con el procedimiento de la invención es posible unir bacteriorrodopsina a un polímero de forma covalente. En este caso, un oligómero o un polímero, que puede tener origen natural o sintético, puede ser enlazado con el procedimiento de la invención con bacteriorrodopsina. Un ejemplo de polímero natural es la gelatina y un ejemplo para un polímero sintético preferente es alcohol polivinílico. Es una condición previa para una reacción satisfactoria que el oligómero o bien el polímero contenga un grupo lateral, que es sustrato de la transglutaminasa, es decir, que contiene glutamina (Gln) o un residuo de lisina (Lys) o un análogo de glutamina o un análogo de lisina o bien una zona parcial de glutamina o una zona parcial de lisina, que son reconocidos como sustrato por transglutaminasa, en especial una zona parcial, que comprende como mínimo tres átomos de C y un grupo amino.

Un grupo correspondiente puede encontrarse ya en el polímero, igual que en la gelatina, o puede ser introducido por vía química.

Con el procedimiento objeto de la invención se consigue un material en el que se encuentra unida de forma covalente la bacteriorrodopsina, en especial en forma de membrana púrpura, sobre un polímero de forma estequiométrica. En la preparación de un material se consiguen, por lo tanto, ventajas sustanciales. En especial no puede tener lugar mezcla alguna, tal como ocurre frecuentemente en polímeros mezclados físicamente, que no son solubles entre sí. Además se presenta la posibilidad de llevar a cabo la preparación de materiales que contienen bacteriorrodopsina en medios de disolución orgánicos cuando la bacteriorrodopsina está unida con un oligómero/polímero que tiene la posibilidad de disolución tanto en agua como en un tampón (para la reticulación enzimática) y también en medios disolventes orgánicos.

En otra forma de realización preferente, la bacteriorrodopsina es reticulada con un oligómero/polímero, que por su parte puede soportar todavía otras reacciones de polimerización o reacciones de reticulación. Estas otras reacciones de reticulación o bien de polimerización pueden ser iniciadas, por ejemplo, con luz UV o mediante un iniciador radical. De esta manera se consigue la posibilidad de fabricar materiales en masa que contienen bacteriorrodopsina distribuida de forma homogénea. Estos materiales pueden ser utilizados ventajosamente para la fabricación de cubos de bacteriorrodopsina, tal como se pueden utilizar para un almacenamiento de datos de tipo tridimensional. Estos materiales han sido fabricados hasta el momento por mezcla de bacteriorrodopsina en la polimerización, por

- ejemplo, de polímeros basados en ácido acrílico o acrilamida en medios de solución acuosa, de manera que no se constituye ninguna reticulación covalente entre la bacteriorrodopsina y el polímero. Cuando tiene lugar la eliminación del agua se producen frecuentemente grandes pérdidas. Además, en estos materiales del estado de la técnica se observan fenómenos de separación de la mezcla, que conducen a una distribución no homogénea de la bacteriorrodopsina en el material. En otra forma de realización ventajosa el material de bacteriorrodopsina es unido de forma covalente a un componente de bajo peso molecular. El componente de bajo peso molecular se caracteriza por ser un sustrato de la transglutaminasa, es decir, en especial un análogo de glutamina o un análogo de lisina. El compuesto de bajo peso molecular, que en esta descripción se designa también como material auxiliar, se puede escoger del grupo que comprende colorantes, fluorocromos, lípidos, péptidos, oligómeros y polímeros, ácidos nucleicos tales como, por ejemplo, DNA/RNA/PNA y otros, oligómero y polímeros sintéticos, proteínas (avidina-biotina, etc.), lectinas, polisacáridos, polímeros conductores y otros. Con el procedimiento según la invención es posible un acoplamiento controlado, estequiométrico, selectivo de lugar de los componentes en la bacteriorrodopsina, especialmente en bacteriorrodopsina en forma de membrana púrpura.
- 15 Los colorantes y fluorocromos serán acoplados en especial de forma covalente para conseguir una modificación del estado de color inicial de la bacteriorrodopsina o bien de la membrana púrpura. Es ventajoso, en este caso, que no se produzca ninguna separación de mezcla entre bacteriorrodopsina y colorante o bien fluorocromo y que la preparación no se vea influida de manera desfavorable por las diferentes solubilidades de los materiales.
- 20 Los lípidos pueden ser acoplados de forma covalente para conseguir un anclaje de la bacteriorrodopsina, en especial en forma de membrana, sobre otra membrana de lípido, de manera que la otra membrana sea preferentemente y de manera correspondiente una membrana púrpura y de modo especialmente preferente muestre bacteriorrodopsina-membrana púrpura. Los materiales de bacteriorrodopsina acoplados por lípidos pueden ser utilizados de manera adicionalmente ventajosa en la técnica Langmuir-Blodgett.
- 25 Mediante el acoplamiento de bacteriorrodopsina con péptidos se pueden preparar etiquetas inmunológicas y materiales con capacidad de unión selectiva, de alta afinidad (por ejemplo, efecto de cambio antígeno-anticuerpo).
- 30 Mediante el acoplamiento de bacteriorrodopsina con oligómeros en especial oligómeros o polímeros de ácidos nucleicos tales como DNA, RNA, PNA y otros, es posible la constitución de estructuras tridimensionales.
- Mediante el acoplamiento covalente de bacteriorrodopsina con oligómeros o polímeros sintéticos se pueden conseguir materiales reticulados que son estables contra la separación de mezclas.
- 35 Mediante el acoplamiento covalente de proteínas tales como avidina, biotina, u otras similares, que son en especial un miembro de un par de asociación de alta afinidad, selectivo, se pueden conseguir materiales con elevadas constantes de constitución compleja.
- 40 Como materiales conductores se acoplarán preferentemente materiales conductores de protones tales como, por ejemplo, polímeros conductores de protones o membranas con bacteriorrodopsina.
- Otro objeto de la presente invención es una bacteriorrodopsina reticulada de forma covalente, sin enlazadores, que se puede conseguir mediante los procedimientos anteriormente descritos. Este material que se puede constituir exclusivamente a base de bacteriorrodopsina o a base de bacteriorrodopsina y además materiales o sustancias unidas de forma covalente presenta, con respecto a los materiales conocidos de bacteriorrodopsina, diferencias estructurales que aportan sustanciales ventajas. Por el acoplamiento directo según la invención no se introduce de forma intermedia ningún enlazador de manera que también en el material conseguido los materiales de bacteriorrodopsina están unidos de manera directa y no con intermedio de enlazadores. De esta manera, se pueden eliminar los inconvenientes asociados a la utilización de enlazadores, tal como se han descrito anteriormente. En el acoplamiento de bacteriorrodopsina a otros materiales se consigue además, mediante uniones covalentes, al contrario de lo que ocurre en las mezclas físicas conocidas en el estado de la técnica, que se puedan lograr materiales homogéneos y estables. Estos materiales son apropiados para su utilización especialmente en el almacenamiento de datos. Mediante la disposición direccionada de varias capas de membranas púrpuras BR con una elevada orientación previa se pueden conseguir materiales que en utilizaciones fotoeléctricas tal como, por ejemplo, se describe en la publicación F. Hong, Progress in Surface Science 62 (1999), 1-237, muestran un comportamiento mejorado. Estos materiales consiguen tensiones mas elevadas por acción de la iluminación en comparación con materiales BR conocidos, menos favorablemente controlados y pueden ser utilizados, en especial como, conmutadores o elementos de control.
- 55
- 60 La invención se explicara mediante los siguientes ejemplos y figuras de modo adicional, de manera que la figura 1 muestra una representación esquemática de los resultados de una centrifugación de gradiente de densidad de azúcar. La figura 1A muestra bacteriorrodopsina de tipo salvaje (BR-WT), la figura 1B la variante de bacteriorrodopsina BRD2N y la figura 1C, BR-WT y BR-D2N reticuladas entre sí después de 24 horas de incubación con gases BT (transglutaminasa bacteriana).
- 65 La figura 2 muestra una representación esquemática de SDS-PAGE. A) BR-WT; B) BR-WT + BTGase incubado 0

horas a 37°C; C) BR-WT + BTGase incubado 10 minutos a 37°C; D) BR-WT + BTGase incubado 20 minutos a 37°C; E) BR-WT + BTGase incubado 120 minutos a 37°C.

5 La figura 3 muestra la constitución de productos de reticulación de BR-WT y BR-D2N en presencia de transglutaminasa bacteriana, con dependencia del tiempo.

10 La figura 4 muestra la secuencia de bacteriorrodopsina con la disposición transmembrana, modificada según R. R. Birge, *Photophysics and Molecular Electronic Applications of the Rhodopsins*, *Annu. Rev. Phys. Chem.* 41 (1990), 683-733.

15 La figura 5 muestra un ejemplo para una separación controlada de bacteriorrodopsina en forma de membrana sobre superficies. Sobre una oblea -1- se aplica una capa -2- que contiene oro. Esta superficie se lleva a establecer contacto con bacteriorrodopsina-membrana púrpura -3- suspendida en un medio de solución, que han sido modificada con el procedimiento de la invención mediante tiol. Tiene lugar una autoorganización -4- de las membranas púrpura de forma controlada sobre la superficie de oro. Las membranas púrpura con una falsa orientación -5- no se unen a la superficie.

20 La figura 6 muestra un ejemplo de una estructuración tridimensional de bacteriorrodopsina-membranas púrpura. Sobre una superficie o un sustrato -6- se aplica una capa adherente -7-, por ejemplo, ácidos nucleicos-oligómeros. Las membranas púrpura -8- son modificadas con grupos funcionales de forma tal que los grupos funcionales aplicados en una cara de la forma de membrana púrpura, pueden actuar de forma intercambiable con los grupos funcionales aplicados en la otra cara de otra membrana púrpura. Por ejemplo, la membrana púrpura será modificada con ácido nucleico-oligómeros de forma tal que los oligómeros pueden hibridizar en ambas caras entre sí, es decir la membrana púrpura puede hibridizar de forma extracelular con la membrana púrpura citoplasmática. De esta manera tiene lugar una unión controlada -9- de membranas púrpura sobre sustrato y una auto organización controlada de las membranas púrpura en la tercera dimensión. De esta manera se puede conseguir una estructura de capa anisotrópica fuertemente orientada. Las fototensiones generadas por las formas individuales de membrana púrpura ya no se compensan, tal como ocurre en una disposición convencional, sino que se suman. De esta manera se pueden conseguir elementos con una fototensión ajustable que alcanza teóricamente 300 mV x número de capas, aproximadamente.

30 La figura 7 muestra membranas púrpura (representadas en forma de trazos) con bacteriorrodopsina-aminoácidos incorporados (mostrado esquemáticamente como casillas transversales). La lisina (Lys) y glutamina (Gln) que serán aceptadas por transglutaminasa (TGA) se han mostrado como círculos llenos (Lys) o bien cuadrados llenos (Gln).

35 En el tipo salvaje de bacteriorrodopsina los lugares de unión que son accesibles para la transglutaminasa, es decir Gln3 y K129, se encuentran en el mismo lado de la membrana (figura 7A). En una forma de realización preferente se utiliza una variante de bacteriorrodopsina que presenta un lugar de unión en la cara interna y un lugar de unión sobre la cara externa de la membrana, es decir un lugar de unión en el lado citoplasmático de la membrana y un lugar de unión en el lado extracelular de la membrana. Esta variante se consigue de manera preferente, de manera que Lys129 se deja sin modificación y Gln3 es objeto de delección y en vez del mismo, se introduce Gln en un bucle en el otro lado de la membrana (figura 7B). En otra forma de realización preferente se utiliza una variante de bacteriorrodopsina que presenta exactamente un lugar de unión (interno o externo) que se puede conseguir, por ejemplo, por eliminación de los otros lugares de unión posibles (figura 7C).

45 **EJEMPLOS**

Ejemplo 1)

50 5 ml de una solución de azúcar a 42,5% y 37,5% fueron utilizadas para generar con un mezclador de gradiente de tipo conocido un gradiente lineal de azúcar. Este gradiente sirve para análisis de bacteriorrodopsina reticulada y no reticulada.

55 Ejemplo 2)

Una solución de bacteriorrodopsina tipo salvaje (WT) (20 mg/ml) y una solución de una variante de bacteriorrodopsina BR-DZN (20 mg/ml) se mezclaron con tampón (pH 7,0, 100 nM, tampón fosfato) y una solución de BTGase (9,3 U/ml) de manera que, BTGase se encontraba en relación con la bacteriorrodopsina en proporción cuádruple. La incubación tubo lugar durante 24 horas a 40°C. Entonces, en la mezcla de reacción se encuentra prácticamente solo bacteriorrodopsina reticulada (figura 1C).

60 Ejemplo 3)

65 Inicio de la reacción tal como en 2). La reacción es interrumpida, no obstante, en un momento determinado mediante calentamiento momentáneo a 80°C. En la mezcla de reacción se encuentra entonces bacteriorrodopsina reticulada y no reticulada. Mediante elección del momento de interrupción se pueden ajustar las proporciones deseadas entre

ES 2 420 905 T3

bacteriorrodopsina reticulada y no reticulada (figuras 2 y 3). Cuanto mayor es el grado de reticulación más rígida será la bacteriorrodopsina reticulada.

5 La banda roja de la figura 3 muestra BR-WT, la banda azul BR-D2N. Mediante reticulación se consigue el producto de reticulación de color lila BR-WT_x-BR-D2N_y.

Ejemplo 4)

10 Se mezcla una solución de gelatina (gelatina de corteza de tocino de cerdo), al 10% (peso/volumen) con igual volumen de una solución BR (concentración PM 39,1 mg/ml) y con una solución de BTGase (12 U/ml) de manera que las cantidades de BTGase y las cantidades de BR eran comparables. La solución de reacción fue incubada a continuación a 37°C durante una noche. En la mezcla de reacción se encuentra entonces BR unida a gelatina.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento para la fabricación de bacteriorrodopsina reticulada de forma covalente, caracterizado porque la bacteriorrodopsina se hace reaccionar en forma unida a membrana como sustrato de una transglutaminasa y de este modo es reticulada de forma covalente.
2. Procedimiento, según la reivindicación 1, caracterizado porque la bacteriorrodopsina se hace reaccionar en forma de membrana púrpura como sustrato de una transglutaminasa y de esta manera es reticulada de forma covalente.
- 10 3. Procedimiento, según la reivindicación 1 ó 2, caracterizado porque la bacteriorrodopsina es una proteína de membrana en forma unida a membrana que está estructuralmente relacionada con la bacteriorrodopsina de tipo salvaje y tiene como mínimo 90% de homología con respecto a la bacteriorrodopsina de tipo salvaje.
- 15 4. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque la bacteriorrodopsina es seleccionada entre bacteriorrodopsina de tipo salvaje y/o variantes de bacteriorrodopsina.
- 20 5. Procedimiento, según cualquiera de la reivindicaciones anteriores, caracterizado porque las variantes de bacteriorrodopsina son seleccionadas entre variantes de bacteriorrodopsina que difieren de la bacteriorrodopsina de tipo salvaje por adición, sustitución, deleción y/o inserción de aminoácidos, en particular como mínimo un aminoácido; moléculas de bacteriorrodopsina en las que el retinal es sustituido por moléculas similares a retinal; y moléculas de bacteriorrodopsina que son químicamente modificadas por introducción de grupos protectores y/o grupos funcionales laterales.
- 25 6. Procedimiento, según cualquiera de la reivindicaciones anteriores, caracterizado porque se delecionan Gln o Lys o se sustituyen por otros aminoácidos en las variantes de la bacteriorrodopsina.
7. Procedimiento, según cualquiera de la reivindicaciones anteriores, caracterizado porque se reticulan entre sí bacteriorrodopsinas o variantes de bacteriorrodopsina idénticas o distintas.
- 30 8. Procedimiento, según cualquiera de la reivindicaciones anteriores, caracterizado porque se hace reaccionar como mínimo una variante de bacteriorrodopsina que es halorrodopsina y/o sensorrodopsina en una forma unida a membrana.
- 35 9. Procedimiento, según cualquiera de la reivindicaciones anteriores, caracterizado porque se hace reaccionar como mínimo una variante de bacteriorrodopsina que tiene una secuencia de aminoácidos modificada en comparación con la bacteriorrodopsina de tipo salvaje y/o en la que el retinal, está sustituido por una molécula similar a retinal y/o que es químicamente modificada y/o que es modificada por tratamiento enzimático.
- 40 10. Procedimiento, según la reivindicación 9, caracterizado porque se hace reaccionar como mínimo una variante de bacteriorrodopsina que contiene solamente un lugar de unión único para transglutaminasa.
- 45 11. Procedimiento, según la reivindicación 9, caracterizado porque se hace reaccionar como mínimo una variante de bacteriorrodopsina que contiene dos lugares de unión para transglutaminasa que no se encuentran en el mismo lado de la membrana.
- 50 12. Procedimiento, según cualquiera de la reivindicaciones anteriores, caracterizado porque la reacción de reticulación es interrumpida por calentamiento breve a 80°C o superior.
13. Procedimiento, según cualquiera de la reivindicaciones anteriores, caracterizado porque se utiliza una transglutaminasa bacteriana.
- 55 14. Procedimiento, según cualquiera de la reivindicaciones anteriores, caracterizado porque se utiliza una transglutaminasa bacteriana que es activa sin cofactor.
- 60 15. Procedimiento, según cualquiera de la reivindicaciones anteriores, caracterizado porque la bacteriorrodopsina es reticulada con un polímero, una sustancia de superficie y/o una sustancia auxiliar, caracterizado porque la sustancia auxiliar es seleccionada entre grupos que consisten en colorantes, fluorocromos, lípidos, péptidos, ácidos nucleicos, oligómeros y polímeros sintéticos, proteínas, lectinas, polisacáridos y moléculas conductoras.
- 65 16. Bacteriorrodopsina reticulada de forma covalente, sin enlazadores, que se puede obtener por el procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
- 17 Utilización de la bacteriorrodopsina reticulada de forma covalente sin enlazadores, según la reivindicación 16, para aplicaciones fotoeléctricas.

18. Utilización de la bacteriorrodopsina reticulada de forma covalente sin enlazadores, según la reivindicación 16, para almacenamiento tridimensional de datos.

Fig. 1

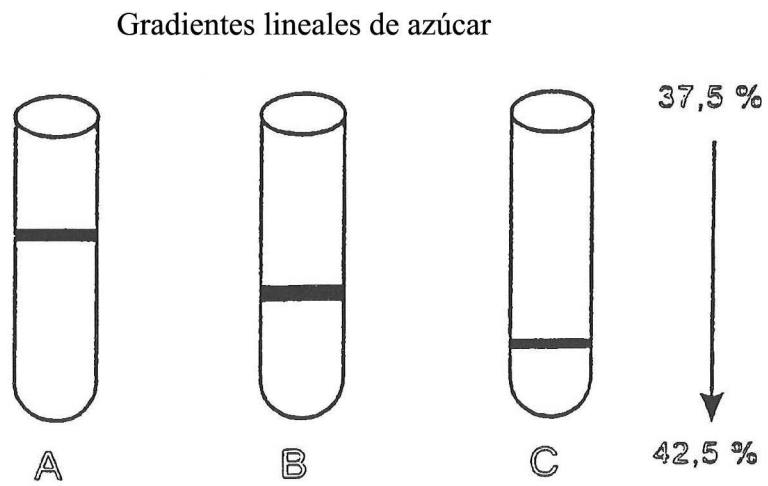


Fig. 2

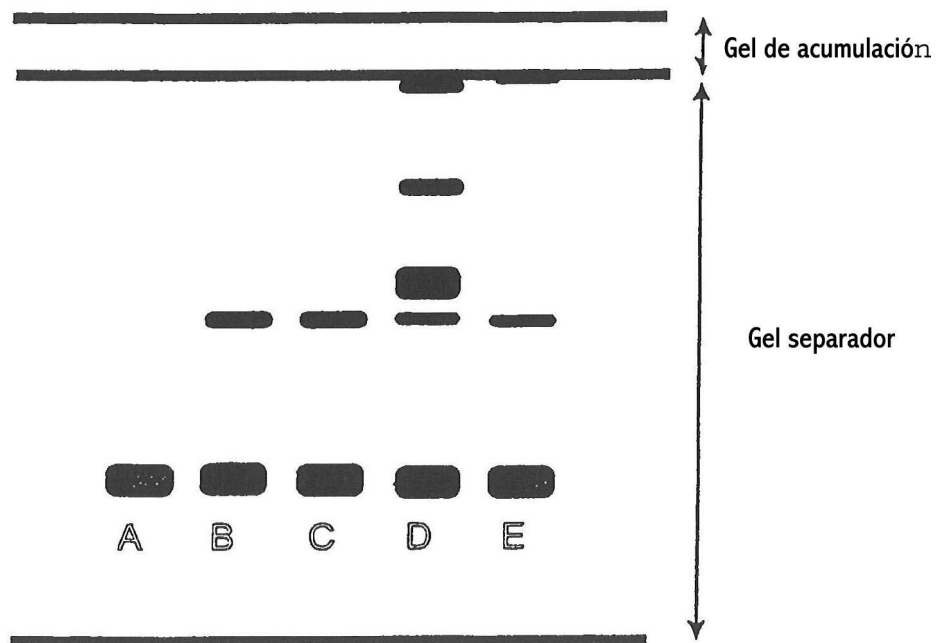


Fig. 3

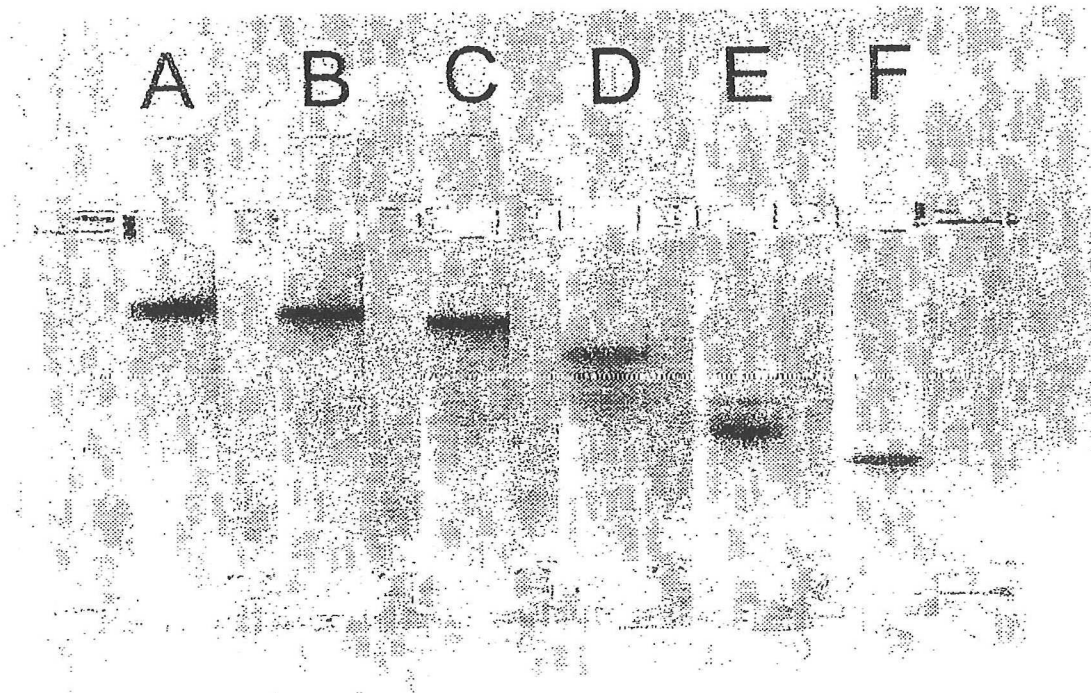


Fig. 5

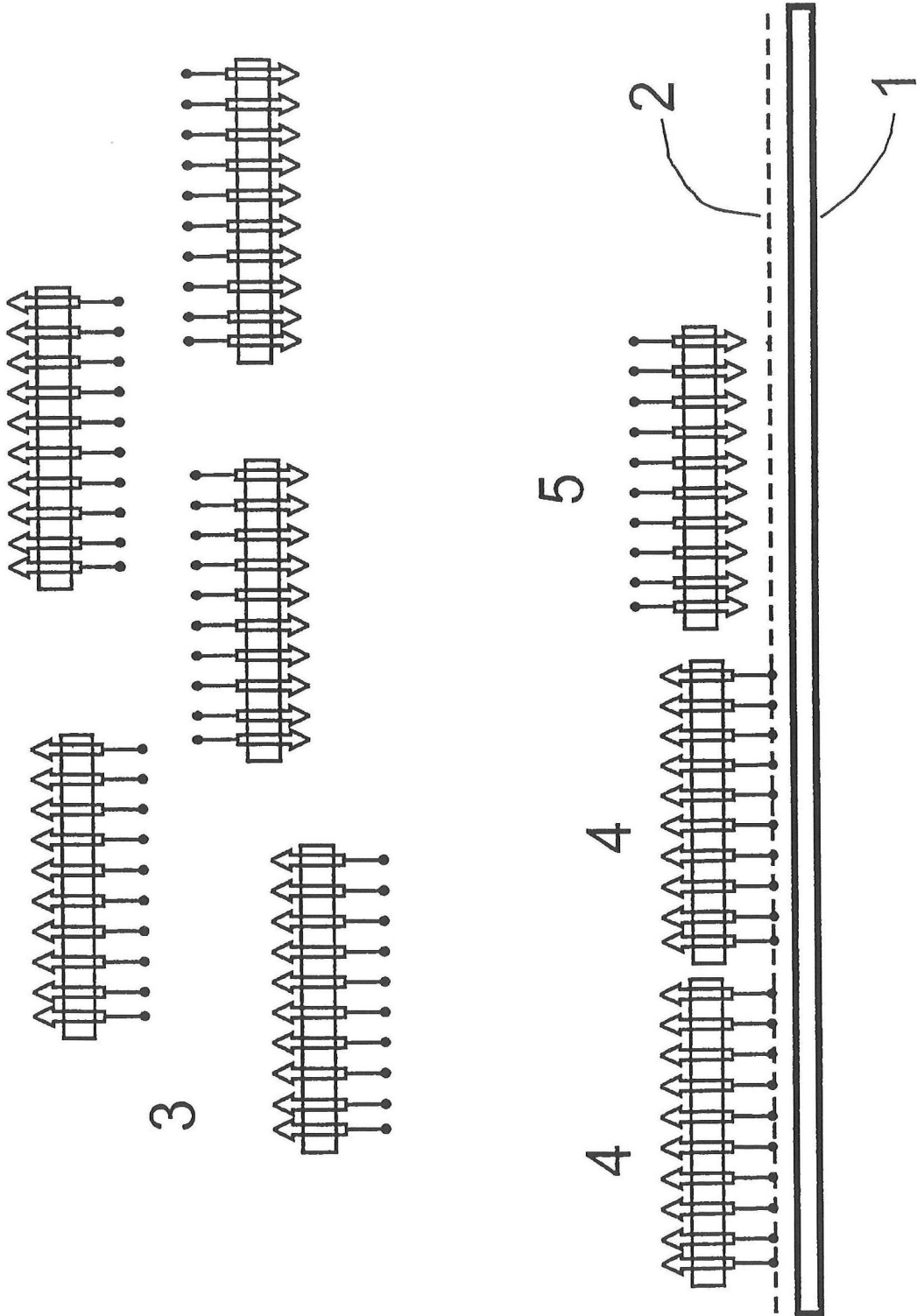


Fig. 6

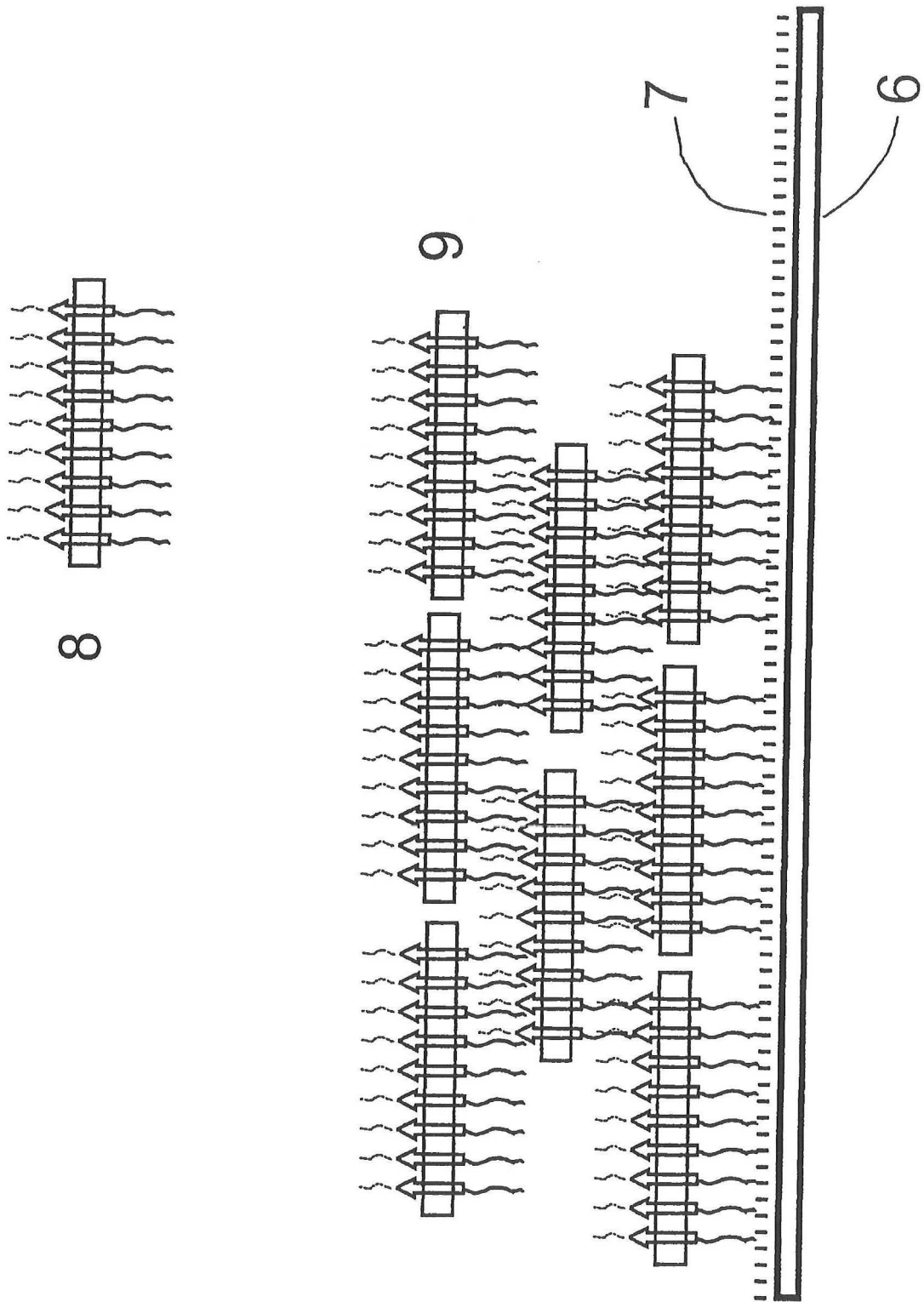


Fig. 7

