

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 438 190**

51 Int. Cl.:

C07K 7/06 (2006.01)

C07K 7/08 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

C12N 1/00 (2006.01)

C12N 7/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.07.2004 E 04771321 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.09.2013 EP 1661910**

54 Título: **Péptido susceptible de unirse a titanio, plata y silicona**

30 Prioridad:

30.07.2003 JP 2003282509

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

16.01.2014

73 Titular/es:

**JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY AGENCY
(100.0%)
1-8, HONCHO 4-CHOME
KAWAGUCHI-SHI, SAITAMA 332-0012, JP**

72 Inventor/es:

**SHIBA, KIYOTAKA y
SANO, KENICHI**

74 Agente/Representante:

PÉREZ BARQUÍN, Eliana

ES 2 438 190 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

Péptido susceptible de unirse a titanio, plata y silicona

5 **Campo técnico**

La presente descripción se refiere a un método para seleccionar péptidos que se unen a titanio; a un péptido que tiene una capacidad de unión a titanio, plata y/o silicio; a un complejo de titanio, plata y/o silicio con un péptido, en el que el péptido que tiene una capacidad de unión a titanio, plata y/o silicio está unido a titanio, plata o silicio; a una proteína artificial en la que un péptido que tiene una capacidad de unión a titanio, plata y/o silicio se une a un péptido funcional o una proteína funcional; a un complejo de titanio, plata o silicio con la proteína artificial, en el que la proteína artificial está unida a titanio, plata o silicio; a una proteína quimérica en la que un conjugado de un péptido que tiene una capacidad de unión a titanio, plata y/o silicio se une con una sustancia marcada o una etiqueta peptídica, o con un compuesto no peptídico; a un complejo de titanio, plata o silicio con una proteína quimérica en el que la proteína quimérica está unida a titanio, plata o silicio; a un fago que expresa un péptido que tiene una capacidad de unión a titanio, plata y/o silicio sobre la superficie de una partícula; a un complejo de titanio, plata o silicio con un fago en el que el fago está unido a titanio, plata o silicio; a un método para el refinamiento de una superficie de titanio, una superficie de plata o una superficie de silicio o para alinear titanio, usando un péptido que tiene una capacidad de unión a titanio, plata y/o silicio, una proteína artificial con una capacidad de unión a titanio, plata y/o silicio, una proteína quimérica con una capacidad de unión a titanio, plata y/o silicio, un fago con una capacidad de unión a titanio, plata y/o silicio; a un método para formar una partícula de plata o una partícula de silicio; o a un material de implante que comprende un complejo de titanio-proteína artificial como principio activo.

25 **Técnica antecedente**

En 1952, Brånemark descubrió el fenómeno de la osteointegración, en el que se unen titanio y hueso sin la intermediación de tejidos de unión, y con esto como punto de inflexión, se aplicó clínicamente por primera vez un implante hecho de titanio puro en 1965. Se han aplicado hasta la fecha un montón de tratamientos de implante usando el fenómeno de osteointegración. Sin embargo, se requiere un periodo muy largo de 3 a 6 meses para que se unan el titanio y el hueso. Hasta ahora, para el fin de acortar este periodo potenciando la afinidad del hueso, se han hecho muchos enfoques tales como rediseñar materias duras que es principalmente una modificación mecánica del material, incluyendo modificación para el tratamiento de superficie final, evaporación a vacío de calcio o hidroxiapatita en la superficie de titanio o consideración de aleación de titanio como material, aunque no se ha obtenido ningún efecto significativo hasta la fecha. Por ejemplo, en el caso de cerámica tal como hidroxiapatita, hay problemas tales como reducción de la capa recubierta o debilidad a la carga debido a características físicas. En cuanto a la aleación, se han considerado muchos casos hasta la fecha, pero en la mayoría de los casos, se han producido reacciones tisulares perjudiciales y, por tanto, actualmente sólo se usa titanio y Ti₆Al₄V, que es una aleación del mismo.

Además, la relación entre el implante y la mucosa circundante se considera que es un tejido de cicatrización con pequeña resistencia a la infección, que es diferente de la de los dientes y las encías. Por tanto, con el fin de resolver este problema, se han considerado enfoques de materias duras tal como se describió anteriormente, incluyendo recubrimiento con agente antibacteriano de la superficie de titanio. Sin embargo, con tales enfoques de materias duras, no se considera la mejora de la relación anatómica/histológica entre el implante y la mucosa circundante.

El titanio se oxida fácilmente, y forma inmediatamente dióxido en la atmósfera y en agua. Puesto que es posible degradar/detoxificar casi todas las sustancias tóxicas usando la actividad fotocatalítica de los cristales de anatasa, que es uno de los cristales de dióxido de titanio, se usa titanio de forma muy diversa incluyendo degradación de malos olores tales como gas de casas enfermas o acetaldehído, o como agente antifúngico. Sin embargo, como la longitud de onda que los cristales de anatasa pueden usar se limita a la región ultravioleta, se espera el desarrollo de fotocatalizadores que puedan usarse en la región de radiación visible.

Además, se propone lo siguiente: un nuevo implante que contiene osteopontina que puede aumentar la velocidad de osteointegración y la razón de adhesión al hueso, que comprende un implante que contiene osteopontina en un estado formado, en el que se combina un material apropiado para su uso en el cuerpo de un sujeto *in vivo* con una osteopontina en una forma liberable (traducción japonesa publicada de la publicación internacional PCT n.º: 2002-500898); una tecnología que controla al nivel molecular la construcción del compuesto de metal que va a unirse, en la que con el fin de unir el compuesto de metal, y proporcionar una nueva proteína, un fragmento de proteína, un péptido o un derivado de un mutante del mismo que es posible que se una a compuestos de metal y controle la orientación o la secuencia, se inserta un grupo funcional que tiene una construcción de triacetato de nitrilo en una estereoestructura característica que tiene la proteína, el fragmento de proteína, el péptido o el mutante del mismo (solicitud de patente japonesa abierta a consulta por el público n.º: 10-338700); o un método para preparar nanocristales de semiconductores que tienen propiedades de cristal específicas tales como fase o configuración, usando una molécula biológica que se autoorganiza modificada para tener un oligómero de aminoácidos que se une específicamente a semiconductores (memoria descriptiva de la solicitud de patente estadounidense n.º 2003/0073104).

Tal como se mencionó anteriormente, cuando se pretende conferir una capacidad superior de los materiales de titanio en el campo de los implantes, sin modificar los materiales mediante materia dura, sino con polímero tal como proteína que es una materia blanda que puede unirse de manera flexible a la superficie de titanio, hay el problema de que el motivo de aminoácidos que reconoce/se une específicamente a la superficie de titanio no existe en la naturaleza. El objeto de la presente invención es proporcionar una secuencia peptídica, un fago, una proteína artificial o una molécula quimérica con una capacidad de unión a titanio necesaria para conferir una capacidad superior al material de titanio con el uso de materias blandas, o un complejo de un péptido, un fago, una proteína artificial o una molécula quimérica que tiene la secuencia peptídica y una secuencia peptídica funcional, con titanio. Específicamente, la presente invención proporciona un material de implante de titanio funcional en el que dicho péptido y un péptido o una proteína artificial/una proteína quimérica que promueve la calcificación o el crecimiento óseo/diferenciación se unen a su superficie, mediante lo cual la osteointegración se completa en un periodo corto; o un material de implante de titanio funcional en el que dicho péptido o un péptido o una proteína artificial/una proteína quimérica que tiene alta afinidad por las encías se unen a su superficie, teniendo una alta resistencia a la infección bacteriana, etc. Además, proporciona un complejo del péptido o la proteína artificial/la proteína quimérica con titanio oxidado, o un complejo del complejo con un compuesto de bajo peso molecular tal como un cromóforo, teniendo una capacidad fotocatalítica incluso en una región de radiación visible, y un pigmento de dióxido de titanio, en el que una proteína quimérica/una proteína artificial que comprende el péptido y colágeno suave para la piel, etc., se unen a su superficie.

Los presentes inventores realizaron un estudio entusiasta para solucionar los problemas anteriores. Pusieron en contacto una población de fago en la que dicho fago de dicha población expresa colectivamente una biblioteca de diferentes secuencias peptídicas con metal de titanio en una disolución acuosa, recuperaron titanio unido a partículas de fago a través de la secuencia peptídica mediante centrifugación, hicieron proliferar las partículas de fago obtenidas unidas a titanio en *E. coli* y repitieron una operación de cribado que comprende la puesta en contacto de titanio con el fago de unión a titanio proliferado que expresa una secuencia peptídica sobre partículas de fago y la concentración de los clones de fagos que se unen a titanio y obtuvieron una biblioteca de fagos que podría expresar un péptido de unión a titanio que reconoce específicamente titanio.

Se clonó la biblioteca de fagos obtenida para examinar la secuencia de aminoácidos expresada. Repitiendo la operación de cribado, puede estimarse que clones que expresaban secuencias que pueden unirse fuertemente a titanio especialmente tenían una mayor población en la biblioteca de fagos. Los presentes inventores descubrieron que entre los 43 clones de fagos habían 33 clones que expresaban RKLDPAGMHTW (péptido que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 3), y que la capacidad de unión a titanio de los clones de fagos que expresaban un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 3 era mucho más alta que la del clon de fago que expresa un péptido que comprende secuencias de aminoácidos mostradas en SEQ ID NO: 16 a 38.

Es necesario investigar si los clones obtenidos que expresan un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID No: 3 se unen a titanio a través de la secuencia que expresan. Es posible confirmar si la unión del clon de fago que expresa un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 3 a titanio se une específicamente a través de la secuencia de expresión con el uso de QCM-D300 (Q-sense AB, Gotemburgo), un dispositivo para la cuantificación de la interacción con una microbalanza de cristal de cuarzo que puede medir la disipación simultáneamente. Cuando una molécula alargada longitudinalmente como un fago se une perpendicularmente a un sensor de microbalanza de cristal, la viscoelasticidad medida mediante disipación aumenta significativamente, mientras que la frecuencia que muestra el nivel de unión disminuye. Además, incluso si es una molécula muy alargada, no se observa ningún aumento significativo de viscoelasticidad en contraposición a la disminución de frecuencia, cuando se une horizontalmente al lado en el que se montó un sensor de microbalanza de cristal. Realmente, se obtuvo un resultado que muestra que un clon de fago que presenta un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 3 se unía perpendicularmente a la superficie de titanio. Probablemente es el primer ejemplo en el mundo que ha examinado la forma de unión de un fago, usando un dispositivo para la cuantificación de la interacción con una microbalanza de cristal de cuarzo, y mostró que este método era muy útil para el análisis de un fago unido a la superficie sólida.

La superficie de titanio se oxida inmediatamente en agua, y se une un grupo hidroxilo a átomos de titanio. Se estima que el grupo hidroxilo unido se separa en un grupo hidroxilo que forma un puente entre dos átomos de titanio y un grupo hidroxilo terminal unido con un átomo de titanio. Como la polaridad del grupo hidroxilo puente y la del grupo hidroxilo terminal son diferentes, tienen una pK diferente. Se estima que el grupo hidroxilo puente actúa como un ácido, y que el grupo hidroxilo terminal actúa como una base. Sería posible controlar la unión de titanio y péptido investigando cómo se une específicamente un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 3 a una superficie de titanio.

Generalmente, la investigación de la especificidad de un motivo peptídico se realiza mediante la identificación de un residuo que desempeña un papel importante en la función debido a la introducción de una mutación puntual, o mediante el refinamiento de la región funcional mediante el análisis de un mutante de delección. En el primer caso, se

realiza a menudo un análisis funcional de una serie de mutaciones puntuales sustituidas por alanina denominado exploración de alaninas. La sustitución con alanina en la que el grupo metilo tiene sólo una cadena lateral pequeña, y que no tiene carga, se cree que confiere la función de la cadena lateral del residuo de aminoácido. Se realizó exploración de alaninas para el clon de fago que expresa un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 3. Se preparó una serie de clones de fagos mutados de manera puntual que expresaban un péptido que comprende secuencias de aminoácidos mostradas en SEQ ID NO: 4 a 14 y se examinó la capacidad de unión a titanio de cada clon. Como resultado, la capacidad de unión del mutante puntual en la 4ª prolina era la más significativamente alterada, entre las examinadas esta vez. La prolina desempeña un papel curvando ampliamente la cadena principal del péptido o la proteína, similar a la glicina. A partir de este resultado, se sugirió fuertemente que la curva de la cadena principal en la 4ª prolina desempeña un papel importante para la unión del péptido que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 3 a titanio. Además, puesto que la capacidad de unión del mutante puntual en la 1ª arginina y el 5º ácido aspártico entre los aminoácidos que están cargados en la cadena lateral se alteró significativamente, se sugirió que estos residuos actuaban mutuamente con la carga positiva y negativa de la superficie de titanio.

Como resultado de la exploración de alaninas, se obtuvo un resultado que apoya que la primera parte de SEQ ID NO: 2, la región de SEQ ID NO: 1, desempeña un papel importante en la unión a titanio. Por tanto, se preparó un mutante de delección en el que se delecionan los péptidos 7º a 12º que comprendía una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 3, que es un clon de fago que expresa un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 1, y se investigó la capacidad de unión a titanio. Puesto que la capacidad de unión a titanio no se vio afectada por la delección, se ha aclarado que la parte de la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 1 tenía una capacidad de unión a titanio suficiente.

Cuando la secuencia peptídica mostrada en SEQ ID NO: 3 se une a titanio, la importancia de la carga positiva de la cadena lateral de la 1ª arginina es tal como se describió anteriormente, mientras que hay todavía una posibilidad de que coopere con un grupo amino en el extremo amino terminal de la cadena principal para unirse a titanio. Por tanto, se preparó un mutante de inserción (SEQ ID NO: 15) en el que se inserta alanina en el extremo amino terminal de la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 3 y se investigó la capacidad de unión a titanio. Como resultado, se observó un aumento de la capacidad de unión a titanio. Como por el motivo del aumento de la capacidad de unión, puede considerarse que la repulsión entre la carga positiva de la cadena lateral de la 2ª lisina de SEQ ID NO: 3 y la carga positiva de un grupo amino en el extremo amino terminal de la cadena principal disminuye debido a la inserción de aminoácido de un residuo, y por tanto la estructura de un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 15 se volvió más estable. Además, este resultado muestra que no siempre es necesario que la arginina esté en el extremo amino terminal cuando un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 3 se une a titanio. Esto es un conocimiento importante que muestra que no hay limitación para la construcción primaria en cuanto a la colocación de SEQ ID NO: 1 ó 3, cuando se prepara una proteína quimérica, una proteína artificial o un péptido sintético que se une a titanio.

Se sabe que varios grupos hidroxilo se unen a una superficie de titanio mediante tratamiento con peróxido de hidrógeno. Tal como se mencionó anteriormente, se cree que la interacción entre un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 1, 3 y una superficie de titanio está dominada por la interacción electrostática entre las cadenas laterales de la 1ª arginina y el 5º ácido aspártico de SEQ ID NO: 1, 3 y la carga del grupo hidroxilo unido a titanio. Hay una posibilidad de que el nivel de unión de titanio y péptido pueda controlarse, si fuese posible controlar la cantidad de grupo hidroxilo que se une a titanio. De hecho, la capacidad de unión a titanio del clon de fago que expresa SEQ ID NO: 3, tratado con peróxido de hidrógeno, aumentaba. Esto muestra que añadiendo además grupo hidroxilo a la superficie de titanio mediante tratamiento con peróxido de hidrógeno, es posible aumentar el nivel de unión del clon de fago que expresa SEQ ID NO: 3, el péptido de SEQ ID NO: 3 y la proteína artificial/proteína quimérica que incluye el mismo. Además, eliminando el grupo hidroxilo de la superficie de titanio, se espera que sea posible disminuir el nivel de unión del clon de fago que expresa un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 3, el péptido de SEQ ID NO: 3 y la proteína artificial/proteína quimérica que incluye el mismo. En cuanto al método para eliminar el grupo hidroxilo de la superficie de titanio, puede mostrarse a modo de ejemplo el tratamiento con fluoruro de sodio. Combinando estos métodos, se espera que sea posible controlar el nivel de unión del clon de fago que expresa SEQ ID NO: 3, el péptido de SEQ ID NO: 3 o la proteína artificial/proteína quimérica que incluye el mismo, a titanio.

Además, investigando la especificidad de unión de péptidos con una capacidad de unión a titanio a materiales metálicos, se encontró que se unían selectivamente a plata, silicio, además de titanio, y que no se unían a oro, platino, cobre, hierro, estaño, zinc, cromo, etc. Usando esta especificidad de unión de materiales metálicos, podría ser posible desarrollar un determinado patrón con una base de oro de los compuestos funcionales a través del péptido de unión a titanio, realizando por ejemplo la obtención del patrón con una base de oro con titanio, y añadiendo compuestos funcionales, por ejemplo péptido de unión a titanio que conjuga nanopartículas semiconductoras, o proteína artificial/proteína quimérica que incluye las mismas.

Por tanto, los presentes inventores han completado la presente invención según del conocimiento anterior.

Exposición de la invención

La presente invención se detalla en los párrafos numerados a continuación.

- 5 1. Un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 1.
2. Un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 2.
3. Un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 3.
- 10 4. Un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos mostrada en una cualquiera de SEQ ID NO: 5 y 8 a 15.
5. El péptido según uno cualquiera de los párrafos 1 a 4, que está modificado químicamente.
- 15 6. Un complejo de titanio-péptido, en el que el péptido según uno cualquiera de los párrafos 1 a 5 está unido a titanio.
7. Una proteína artificial que es un conjugado del péptido según uno cualquiera de los párrafos 1 a 5, con un péptido funcional o una proteína funcional.
- 20 8. La proteína artificial según el párrafo 7, en la que el péptido funcional o la proteína funcional es un péptido o una proteína que coopera con el péptido según uno cualquiera de los párrafos 1 a 5 para formar una estructura cristalina bidimensional mediante autoensamblaje.
- 25 9. La proteína artificial según el párrafo 7, en la que el péptido funcional o la proteína funcional es un péptido o una proteína que comprende una secuencia peptídica que tiene una actividad de reconocimiento celular tal como actividad de adhesión celular.
- 30 10. Un complejo de titanio-proteína artificial, en el que la proteína artificial según uno cualquiera de los párrafos 7 a 9 está unido a titanio.
11. Una proteína quimérica que es un conjugado del péptido según uno cualquiera de los párrafos 1 a 5 con una sustancia marcada, una etiqueta peptídica o un compuesto no peptídico.
- 35 12. Un complejo de titanio-proteína quimérica, en el que la proteína quimérica según el párrafo 11 está unida a titanio.
13. Un fago que expresa el péptido según uno cualquiera de los párrafos 1 a 5 sobre la superficie de una partícula.
- 40 14. Un complejo de titanio-fago, en el que el fago según el párrafo 13 está unido a titanio.
15. Un método para el refinamiento de una superficie de titanio o para formar una partícula de titanio, en el que se usa el péptido según uno cualquiera de los párrafos 1 a 5.
- 45 16. Un método para el refinamiento de una superficie de titanio, para formar una partícula de titanio o para alinear partículas de titanio, en el que se usa la proteína artificial según uno cualquiera de los párrafos 7 a 9.
17. Un método para el refinamiento de una superficie de titanio o para formar una partícula de titanio, en el que se usa la proteína quimérica según el párrafo 11.
- 50 18. Un método para alinear titanio o para formar una partícula de titanio, en el que se usa el fago según el párrafo 13.
19. Un material de implante que comprende el complejo de titanio-proteína artificial según el párrafo 10 como principio activo.
- 55 20. Un complejo de plata-péptido, en el que el péptido según uno cualquiera de los párrafos 1 a 5 está unido a plata.
21. Un complejo de plata-proteína artificial, en el que la proteína artificial según uno cualquiera de los párrafos 7 a 9 está unida a plata.
- 60 22. Un complejo de plata-proteína quimérica, en el que la proteína quimérica según el párrafo 11 está unida a plata.
23. Un complejo de plata-fago, en el que el fago según el párrafo 13 está unido a plata.
- 65 24. Un método para el refinamiento de una superficie de plata o para formar una partícula de plata, en el que se usa

el péptido según uno cualquiera de los párrafos 1 a 5.

25. Un método para el refinamiento de una superficie de plata, para formar una partícula de plata o para alinear plata, en el que se usa la proteína artificial según uno cualquiera de los párrafos 7 a 9.

26. Un método para el refinamiento de una superficie de plata o formar una partícula de plata, en el que se usa la proteína quimérica según el párrafo 11.

27. Un método para formar una partícula de plata o para alinear plata, en el que se usa el fago según el párrafo 13.

28. Un complejo de silicio-péptido, en el que el péptido según uno cualquiera de los párrafos 1 a 5 está unido a silicio.

29. Un complejo de silicio-proteína artificial, en el que la proteína artificial según uno cualquiera de los párrafos 7 a 9 está unido a silicio.

30. Una complejo de silicio-proteína quimérica, en el que la proteína quimérica según el párrafo 11 está unida a silicio.

31. Un complejo de silicio-fago, en el que el fago según el párrafo 13 está unido a silicio.

32. Un método para el refinamiento de una superficie de silicio o para formar una partícula de silicio, en el que se usa el péptido según uno cualquiera de los párrafos 1 a 5.

33. Un método para el refinamiento de una superficie de silicio, para formar una partícula de silicio o para alinear silicio, en el que se usa la proteína artificial según uno cualquiera de los párrafos 7 a 9.

34. Un método para el refinamiento de una superficie de silicio o para formar una partícula de silicio, en el que se usa la proteína quimérica según el párrafo 11.

35. Un método para formar una partícula de silicio o para alinear silicio, en el que se usa el fago según el párrafo 13.

36. Un método para usar el péptido según uno cualquiera de los párrafos 1 a 5 como una sonda de microscopio de fuerza atómica (MFA).

En otras palabras, la presente invención se refiere a un método para seleccionar péptidos que se unen a titanio que comprende poner en contacto titanio con una población de fago en el que dicho fago de dicha población expresa colectivamente una biblioteca de diferentes secuencias peptídicas; recuperar titanio unido a partículas de fago a través de la secuencia peptídica de dicha población mediante centrifugación; hacer que proliferen las partículas de fago de unión a titanio obtenidas en bacterias; y repetir una operación de cribado que comprende el contacto del titanio con el fago de unión a titanio proliferado que expresa una secuencia peptídica sobre partículas de fago y concentrar los clones de fago de unión a titanio en proliferación ("1"); a un péptido de unión a titanio obtenido mediante el método para seleccionar según "1" ("2"); a un péptido de unión a titanio que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 1 ("3"); a un péptido de unión a titanio que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 1, en el que al menos un aminoácido se deletiona, se sustituye o se añade en la secuencia de aminoácidos ("4"); al péptido de unión a titanio según "4", en el que se conservan los residuos de aminoácido 1º, 4º y 5º de la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 1 ("5"); al péptido de unión a titanio según "5", que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 2 en el que la 2ª lisina se sustituye por alanina ("6"); a un péptido de unión a titanio que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 3 ("7"); a un péptido de unión a titanio que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 3, en el que al menos un aminoácido se deletiona, se sustituye o se añade en la secuencia de aminoácidos ("8"); al péptido de unión a titanio según "8", en el que se conservan los residuos de aminoácido 1º, 4º y 5º de la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 3 ("9"); al péptido de unión a titanio según "8", que comprende secuencias de aminoácidos mostradas en SEQ ID NO: 4 a 14, en el que los residuos de aminoácido 1º a 5º y 7º a 12º se sustituyen por alanina, respectivamente ("10"); al péptido de unión a titanio según "8" o "9", que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 15, en la que se añade/inserta alanina al extremo N-terminal de la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 3 ("11"); al péptido de unión a titanio que comprende secuencias de aminoácidos mostradas en SEQ ID NO: 16 a 24 ("12"); a un péptido de unión a titanio que comprende secuencias de aminoácidos mostradas en SEQ ID NO: 16 a 24, en el que al menos un aminoácido se deletiona, se sustituye o se añade en la secuencia de aminoácidos ("13"); a un péptido de unión a titanio que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 25 a 38 ("14"); a un péptido de unión a titanio que comprende secuencias de aminoácidos mostradas en SEQ ID NO: 25 a 38 en el que al menos un aminoácido se deletiona, se sustituye o se añade en la secuencia de aminoácidos ("15"); al péptido de unión a titanio según uno cualquiera de "2" a "15", que está modificado químicamente ("16"); al péptido de unión a titanio según uno cualquiera de "2" a "16", en el que el titanio es titanio metálico, aleación de titanio o dióxido de titanio ("17"); a un complejo de titanio-péptido, en el que el péptido de unión a titanio según uno cualquiera de "2" a "16" está unido a titanio ("18"); a

una proteína artificial de unión a titanio que es un conjugado del péptido de unión a titanio según uno cualquiera de “2” a “16”, con un péptido funcional o una proteína funcional (“19”); a la proteína artificial según “19”, en la que el péptido funcional o la proteína funcional es un péptido o una proteína que coopera con un péptido de unión a titanio para formar una estructura cristalina bidimensional mediante autoensamblaje (“20”); a la proteína artificial según “19”, en la que el péptido funcional o la proteína funcional es un péptido o una proteína que comprende una secuencia peptídica que tiene una capacidad de reconocimiento celular tal como capacidad de adhesión celular (“21”); a un complejo de titanio-proteína artificial, en el que la proteína artificial según uno cualquiera de “19” a “21” está unida a titanio (“22”); a una proteína quimérica de unión a titanio que es un conjugado del péptido de unión a titanio según uno cualquiera de “2” a “17”, con una sustancia marcada o una etiqueta peptídica, o con un conjugado con un compuesto no peptídico (“23”); a un complejo de titanio-proteína quimérica, en el que la proteína quimérica según “23” está unida a titanio (“24”); a un fago de unión a titanio que expresa el péptido de unión a titanio según uno cualquiera de “2” a “17” sobre la superficie de una partícula (“25”); a un complejo de titanio-fago, en el que el fago según “25” está unido a titanio (“26”); a un método para el refinamiento de una superficie de titanio o para formar una partícula de titanio, en el que se usa el péptido de unión a titanio según uno cualquiera de “2” a “17” (“27”); a un método para el refinamiento de una superficie de titanio, para formar una partícula de titanio o para alinear partículas de titanio, en el que se usa la proteína artificial de unión a titanio según uno cualquiera de “19” a “21” (“28”); a un método para el refinamiento de una superficie de titanio o para formar una partícula de titanio, en el que se usa la proteína quimérica de unión a titanio según “23” (“29”); a un método para alinear titanio o para formar una partícula de titanio, en el que se usa el fago de unión a titanio según “25” (“30”); a un material de implante que comprende el complejo de titanio-proteína artificial según “22” como principio activo (“31”).

Además, la presente descripción se refiere a un péptido de unión a plata, que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 1 (“32”); a un péptido de unión a plata que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 1, en el que al menos un aminoácido se deleciona, se sustituye o se añade en la secuencia de aminoácidos (“33”); al péptido de unión a plata según “33”, en el que se conservan los residuos de aminoácido 1^º, 4^º y 5^º de la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 1 (“34”); al péptido de unión a plata según “34”, que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 2, en el que la 2^a lisina se sustituye por alanina (“35”); a un péptido de unión a plata que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 3 (“36”); a un péptido de unión a plata que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 3, en el que al menos un aminoácido se deleciona, se sustituye o se añade en la secuencia de aminoácidos (“37”); al péptido de unión a plata según uno cualquiera de “32” a “37”, que está químicamente modificado (“38”); a un complejo de plata-péptido, en el que el péptido de unión a plata según uno cualquiera de “32” a “38” está unido a plata (“39”); a una proteína artificial de unión a plata que es un conjugado del péptido de unión a plata según uno cualquiera de “32” a “38”, con un péptido funcional o una proteína funcional (“40”); a un complejo de plata-proteína artificial, en el que la proteína artificial según “40” está unida a plata (“41”); a una proteína quimérica de unión a plata que es un conjugado del péptido de unión a plata según uno cualquiera de “32” a “38”, con una sustancia marcada o una etiqueta peptídica, o con un conjugado con un compuesto no peptídico (“42”); a un complejo de plata-proteína quimérica, en el que la proteína quimérica según “42” está unida a plata (“43”); a un fago de unión a plata que expresa el péptido de unión a plata según uno cualquiera de “32” a “38” sobre la superficie de una partícula (“44”); a un complejo de plata-fago, en el que el fago según “44” está unido a plata (“45”); a un método para el refinamiento de una superficie de plata o para formar una partícula de plata, en el que se usa el péptido de unión a plata según uno cualquiera de “32” a “38” (“46”); a un método para el refinamiento de una superficie de plata, para formar una partícula de plata o para alinear plata, en el que se usa la proteína artificial de unión a plata según “40” (“47”); a un método para el refinamiento de una superficie de plata o para formar una partícula de plata, en el que se usa la proteína quimérica de unión a plata según “42” (“48”); a un método para formar una partícula de plata o para alinear plata, en el que se usa el fago de unión a plata según “44” (“49”); a un péptido de unión a silicio que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 1 (“50”); a un péptido de unión a silicio que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 1, en el que al menos un aminoácido se deleciona, se sustituye o se añade en la secuencia de aminoácidos (“51”); al péptido de unión a silicio según “49”, en el que se conservan los residuos de aminoácido 1^º, 4^º y 5^º de la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 1 (“52”); al péptido de unión a silicio según “50”, que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 2, en el que la 2^a lisina se sustituye por alanina (“53”); a un péptido de unión a silicio que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 3 (“54”); a un péptido de unión a silicio que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 3, en el que al menos un aminoácido se deleciona, se sustituye o se añade en la secuencia de aminoácidos (“55”); al péptido de unión a silicio según uno cualquiera de “50” a “56”, que está químicamente modificado (“56”); a un complejo de silicio-péptido, en el que el péptido de unión a silicio según uno cualquiera de “50” a “56” está unido a silicio (“57”); a una proteína artificial de unión a silicio que es un conjugado del péptido de unión a silicio según uno cualquiera de “50” a “56”, con un péptido funcional o una proteína funcional (“58”); a un complejo de silicio-proteína artificial, en el que la proteína artificial según “58” está unida a silicio (“59”); a una proteína quimérica de unión a silicio, que es un conjugado del péptido de unión a silicio según uno cualquiera de “50” a “56”, con una sustancia marcada o una etiqueta peptídica, o que es un conjugado con un compuesto no peptídico (“60”); a un complejo de silicio-proteína quimérica en el que la proteína quimérica según “60” está unida a silicio (“61”); a un fago de unión a silicio que expresa el péptido de unión a silicio según uno cualquiera de “50” a “56” sobre la superficie de una partícula (“62”); a un complejo de silicio-fago, en el que el fago según “62” está unido a silicio (“63”); a un método para refinamiento de una superficie de silicio o para formar una partícula de silicio, en el que se usa el péptido de unión a silicio según uno cualquiera de “50” a “56” (“64”); a un método para el

refinamiento de una superficie de silicio, para formar una partícula de silicio o para alinear silicio, en el que se usa la proteína artificial de unión a silicio según "58" ("65"); a un método para el refinamiento de una superficie de silicio o para formar una partícula de silicio, en el que se usa la proteína química de unión a silicio según "60" ("66"); a un método para formar una partícula de silicio o para alinear silicio, en el que se usa el fago de unión a silicio según "62" ("67"); a un método que usa el péptido de unión a titanio según uno cualquiera de "2" a "17", el péptido de unión a plata según uno cualquiera de "32" a "38" o el péptido de unión a silicio según uno cualquiera de "50" a "56", como una sonda de microscopio de fuerza atómica (MFA) ("68").

Breve descripción de los dibujos

10 La figura 1 es una imagen que muestra el resultado de cribar partículas de titanio usando una biblioteca de fago D-12.

15 El eje vertical representa el valor del título de fago eluido dividido entre el título de fago y mostrado en escala logarítmica. El número del eje horizontal representa el número de veces de cribado.

La figura 2 es una imagen que muestra el resultado de cribar partículas de titanio usando una biblioteca de fago C7C.

20 El eje vertical representa el valor del título de fago eluido dividido entre el título de fago y mostrado en escala logarítmica. El número del eje horizontal representa el número de veces de cribado.

La figura 3 es una imagen que muestra una secuencia de aminoácidos de un péptido expresado por el clon obtenido tras repetir 3 veces el cribado de partículas de titanio usando una biblioteca de fago D-12.

25 La parte más a la izquierda muestra el nombre del clon, y la secuencia de expresión se muestra al lado mediante una notación de una única letra del aminoácido.

La figura 4 es una imagen que muestra una secuencia de aminoácidos de un péptido expresado por el clon obtenido tras repetir 3 veces el cribado de partículas de titanio usando una biblioteca de fago C7C.

30 La parte más a la izquierda muestra el nombre del clon, y la secuencia de expresión se muestra al lado mediante una notación de una única letra del aminoácido. La secuencia de aminoácidos mostrada en el presente documento comprende en ambos extremos un residuo de cisteína que tiene un grupo tiol necesario para que la secuencia de expresión de la biblioteca de C7C sea cíclica.

La figura 5 es una imagen que muestra el resultado del examen de la capacidad de unión del fago clonado a titanio.

40 El eje vertical representa el valor del título de fago eluido dividido entre el título de fago y mostrado en escala logarítmica. El eje horizontal representa cada clon de fago mostrado en las figuras 3 y 4.

La figura 6 es una imagen que muestra el resultado del análisis de la condición de unión del clon de fago que expresa el péptido mostrado en SEQ ID NO: 3 a una superficie de titanio usando un dispositivo para el análisis de la interacción de una biomolécula con una microbalanza de cristal de cuarzo, QCM-D300.

45 La figura 7 es una imagen que muestra un diagrama de patrón de la condición de unión del fago sobre el sensor de microbalanza de cristal de cuarzo-titanio.

50 Se muestra esquemáticamente la unión del clon de fago a una superficie de titanio usando QCM-D300. La imagen superior muestra la condición de unión cuando se bloquea el sensor con BSA, y la inferior muestra la condición de unión sin bloqueo.

La figura 8 es una imagen que muestra las secuencias de base del cebador usado en los ejemplos.

55 El "alfabeto-número-alfabeto" mostrado a la izquierda del primer párrafo de la figura representa el nombre del mutante preparado usando el cebador. El origen del nombre es tal como sigue: la secuencia e3-2-3 se representa mediante una notación de una única letra del aminoácido, la posición del residuo de aminoácido del extremo amino terminal se representa mediante un número y la última letra "A" muestra la sustitución por alanina. Por ejemplo, P4A representa un cebador usado para sustituir la 4ª prolina del extremo N terminal de SEQ ID NO: 3 por alanina.

60 A continuación, $\Delta 7$ -12F, Δ -12R y K2A $\Delta 7$ -12R son cebadores usados para preparar mutantes de delección explicados en el ejemplo 5. Se usaron para la PCR, con la combinación de $\Delta 7$ -12F y $\Delta A 7$ -12R; $\Delta 7$ -12F y K2A $\Delta 7$ -12R.

65 El inserto de Ala es un cebador usado para preparar el mutante de inserción explicado en el ejemplo 6.

La figura 9 es una imagen que muestra el resultado del examen de la influencia de la mutación puntual sobre la

capacidad de unión del clon de fago que expresa un péptido mostrado en SEQ ID NO: 4 a 14 a titanio.

5 El eje vertical representa el valor de la capacidad de unión del mutante puntual mostrado en escala logarítmica, fijando la capacidad de unión del fago que expresa un péptido mostrado en SEQ ID NO: 4 a 14 a titanio en 1; el eje horizontal representa cada mutante puntual.

La figura 10 es una imagen que muestra un diagrama de patrón del método para preparar un mutante de delección mediante un método de PCR.

10 La figura 11 es una imagen que muestra el resultado del examen de la influencia de la mutación de delección y la mutación de inserción sobre la capacidad de unión del clon de fago que expresa un péptido mostrado en SEQ ID NO: 2 a 15 a titanio.

15 El eje vertical representa el valor de la capacidad de unión del mutante puntual, fijando la capacidad de unión del clon de fago que expresa un péptido mostrado en SEQ ID NO: 1 en 1; el eje horizontal representa los mutantes de delección e inserción.

20 La figura 12 es una imagen que muestra el resultado de la influencia del tratamiento de partículas de titanio con peróxido de hidrógeno, sobre la capacidad de unión del fago.

La figura 13 es una imagen que muestra el resultado del examen de la capacidad de unión del fago que expresa un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID: 3 a diversos metales.

25 El eje vertical representa el valor del nivel de unión del fago que expresa un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 3 dividido entre el nivel de unión del fago sin expresar la secuencia, mostrando la contribución de la unión por un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 3. En cuanto a cobre y acero, el nivel de unión de ambos fagos estaba por debajo del límite de detección.

30 La figura 14 es una imagen que muestra el resultado del examen de la influencia de la mutación de sustitución por alanina en el péptido que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 3 sobre la unión a titanio, plata y silicio.

35 El eje vertical representa el valor normalizado fijando el nivel de unión del fago que expresa un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 3 en 1.

La figura 15 es una fotografía que muestra la imagen de microscopio electrónico y el patrón de difracción electrónica de una partícula de plata generada mediante biomineralización del péptido sintetizado que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 3.

40 La figura 16 es una imagen que muestra la relación entre la concentración de péptido y el nivel de sílice generado mediante biomineralización del péptido sintético que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 3.

45 En la condición de concentración de péptido mostrada con marcas de color blanco y la línea discontinua, se forma sílice en forma de gel. En la condición de concentración de péptido mostrada con las marcas de color negro y la línea continua, se forma sílice en forma de partículas.

50 La figura 17 es una fotografía que muestra una imagen de microscopio electrónico de transmisión y una imagen de microscopio electrónico de barrido de partículas de sílice generadas mediante biomineralización del péptido sintético que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 3.

La figura 18 es una imagen que muestra un diagrama de patrón de la construcción de un vector de expresión de ferritina que fusiona un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 1.

55 La figura 19 es una imagen que muestra el resultado de la unión de una ferritina recombinante que fusiona un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 1 a una superficie de titanio.

Mejor modo para llevar a cabo la invención

60 En cuanto al método para seleccionar un péptido de unión a titanio de la presente descripción, no hay ninguna limitación particular siempre que sea un método para seleccionar que comprenda las siguientes etapas:

65 - poner en contacto titanio con una población de fago (biblioteca de fago) en el que dicho fago de dicha población expresa colectivamente (presenta) una biblioteca de diferentes secuencias peptídicas, preferiblemente en una disolución acuosa;

- recuperar titanio unido a partículas de fago a través de la secuencia peptídica mediante centrifugación;

5 - hacer que proliferen las partículas de fago de unión a titanio obtenidas en bacterias tales como *E. coli*; y a continuación,

10 - repetir una operación de cribado que comprende la puesta en contacto de titanio con el fago de unión a titanio proliferado que expresa una secuencia peptídica sobre partículas de fago y concentrar los clones de fago de unión a titanio en proliferación. En cuanto al titanio anterior, puede usarse titanio tal como metal de titanio en forma de partículas, placas, etc., aleación de titanio, dióxido de titanio. Además, la biblioteca de fago mencionada anteriormente puede prepararse como un fago que expresa un residuo de aminoácido (-X_n, X= cualquier aminoácido) de la parte al azar en la capa de superficie, insertando un ADN al azar sintetizado químicamente en un ADN de fago (fagémido) y transfectándolo en *E. coli* huésped, se biosintetizan moléculas que forman virus de fago, y se expresan péptidos al azar en la cabeza del extremo N terminal de la proteína de recubrimiento pIII de partículas virales. Sin embargo, también pueden usarse bibliotecas de fagos que están disponibles comercialmente (7 meros al azar, 12 meros, 7 meros cíclicos).

20 En cuanto al péptido que tiene una capacidad de unión a titanio, plata y/o silicio de la presente descripción, pueden mostrarse a modo de ejemplo péptidos que tienen una capacidad de unión a titanio, plata y/o silicio obtenidos mediante el método para seleccionar un péptido de unión a titanio de la presente descripción mencionado anteriormente, o mutante del mismo. Específicamente, un péptido (Δ 7-12) que tiene una capacidad de unión a titanio, plata y silicio que comprende la secuencia de aminoácidos RKLPPDA mostrada en SEQ ID NO: 1, o un péptido (mutante de Δ 7-12) que tiene una capacidad de unión a titanio, plata y/o silicio, que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 1, en el que al menos un aminoácido se deleciona, se sustituye o se añade en la secuencia de aminoácidos, puede mostrarse a modo de ejemplo preferiblemente que tiene una excelente capacidad de unión a titanio, plata y/o silicio. Entre el mutante de Δ 7-12 anterior, es preferible un péptido en el que el 1^º (Arg), el 4^º (Pro), el 5^º (Asp) residuo de aminoácido de la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 1 se conserva, y un péptido (K2A- Δ 7-12) que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 2 en el que el 2^º (Lys) se sustituye por Ala es particularmente preferible, ya que tiene una excelente capacidad de unión a titanio, plata y silicio.

30 En cuanto al péptido que tiene una capacidad de unión a titanio, plata y/o silicio de la presente descripción, un péptido de unión a titanio (e3-2-3) que comprende la secuencia de aminoácidos RKLPPDAPGMHTW mostrada en SEQ ID NO: 3: o un péptido (mutante de e3-2-3) que tiene una capacidad de unión a titanio, plata y/o silicio, que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 3, en el que al menos un aminoácido se deleciona, se sustituye o se añade en la secuencia de aminoácidos puede mostrarse a modo de ejemplo preferiblemente que tiene una excelente capacidad de unión a titanio, plata y/o silicio. En cuanto al mutante de e3-2-3 anterior, pueden mostrarse a modo de ejemplo péptidos que comprenden una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 4 a 14, en los que los residuos de aminoácido 1^º a 5^º y 7^º a 12^º se sustituyen por Ala, respectivamente (R1A, K2A, L3A, P4A, D5A, P7A, G8A, M9A, H10A, T11A, W12A); o péptidos (inserción de Ala) que comprenden una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 15 en los que se añade/se inserta Ala en el extremo N terminal de e-3-2-3. La inserción de Ala es particularmente preferible ya que tiene una excelente capacidad de unión a titanio, plata y/o silicio.

45 Además, en cuanto al péptido de unión a titanio de la presente descripción, puede mostrarse a modo de ejemplo un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 16 a 24 derivado de la biblioteca de D12 (New England Biolabs, Beverly) que expresa un péptido al azar lineal de 12 residuos; o un péptido de unión a titanio que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 16 a 24, en el que al menos un aminoácido se deleciona, se sustituye o se añade en la secuencia de aminoácidos, de manera similar a e3-2-3.

50 Además, en cuanto al péptido de unión a titanio de la presente descripción, puede mostrarse a modo de ejemplo un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 25 a 38 derivado de una biblioteca de C7C (New England Biolabs) que expresa un péptido al azar cíclico de 7 residuos; o un péptido de unión a titanio, que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 25 a 38, en el que al menos un aminoácido se deleciona, se sustituye o se añade en la secuencia de aminoácidos.

60 En cuanto al nivel de "sustitución, delección o adición" de un aminoácido o sitios del mismo, se abarcan todos los péptidos modificados en la presente descripción siempre que tengan una capacidad de unión a titanio, plata y/o silicio, de manera similar a los péptidos que comprenden una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 1 ó 3.

Además, el titanio incluye titanio metálico, aleación de titanio, dióxido de titanio amorfo, cristal de anatasa de dióxido de titanio, cristal de rutilo de dióxido de titanio y cristal de brookita de dióxido de titanio.

65 El grupo de péptido de unión a titanio de la presente descripción (a continuación en el presente documento estos péptidos se denominarán "el presente péptido de unión a titanio"), el grupo de péptido de unión a plata (a

continuación en el presente documento estos péptidos se denominarán “el presente péptido de unión a plata”), el grupo de péptido de unión a silicio (a continuación en el presente documento estos péptidos se denominarán “el presente péptido de unión a silicio”) mencionados anteriormente pueden prepararse mediante un método de síntesis química general según su secuencia de aminoácidos. Además, el método de síntesis química incluye un método de síntesis peptídica común mediante un método de fase líquida y un método de fase sólida. El método de síntesis peptídica incluye, más específicamente, un método de alargamiento gradual en el que se une cada aminoácido uno por uno posteriormente para alargar la cadena según la información de la secuencia de aminoácidos, y un método de condensación de fragmentos en el que se sintetiza previamente un fragmento que comprende unos cuantos aminoácidos y cada fragmento se lleva a una reacción de acoplamiento. La síntesis peptídica puede realizarse mediante cualquiera de estos métodos.

El método de condensación aplicado a la síntesis peptídica anterior puede realizarse según diversos métodos conocidos. Los ejemplos conocidos incluyen el método de azida, el método de anhídrido de ácido mixto, el método de DCC, el método de éster activo, el método redox, el método de DPPA (azida de difenilfosforilo), DCC + aditivos (1-hidroxibenzotriazol, N-hidroxisuccinamida, N-hidroxi-5-norborneno-2,3-dicarboximida, etc.) y el método de Woodward. Pueden seleccionarse disolventes que pueden usarse para estos métodos de los comunes que se conocen bien para su uso en este tipo de método de condensación de péptidos. Los ejemplos incluyen dimetilformamida (DMF), dimetilsulfóxido (DMSO), hexafluoroamida, dioxano, tetrahidrofurano (THF), acetato de etilo, etc. y disolventes mixtos de los mismos.

En la reacción de síntesis peptídica anterior, puede protegerse el grupo carboxilo en un aminoácido o péptido que no está asociado con la reacción, en general mediante esterificación, por ejemplo mediante éster alquílico inferior tal como éster metílico, éster etílico, éster butílico terciario y similares, por ejemplo éster bencílico, éster p-metoxibencílico, éster p-nitro-bencílico, éster aralquílico y similares. Además, un aminoácido que tiene un grupo funcional en su cadena lateral, por ejemplo un grupo hidroxilo de Tyr puede protegerse mediante un grupo acetilo, grupo bencilo, grupo benciloxicarbonilo, grupo butilo terciario, etc. Sin embargo, tal protección no siempre es necesaria. Además, por ejemplo, puede protegerse el grupo guanidino de Arg mediante un grupo de protección apropiado tal como grupo nitro, grupo tosilo, grupo 2-metoxibencenosulfonilo, grupo metilen-2-sulfonilo, grupo benciloxicarbonilo, grupo isoborniloxicarbonilo, grupo adamantiloxicarbonilo, etc. La reacción de desprotección de estos grupos de protección en un aminoácido, péptido que tiene el grupo de protección anterior y el presente péptido de unión a titanio finalmente obtenido, puede realizarse mediante métodos comunes, por ejemplo un método de reducción catalítica, o un método que usa amoniaco líquido/sodio, ácido fluorhídrico, bromuro de hidrógeno, ácido clorhídrico, trifluoroacetato, ácido acético, ácido fórmico, ácido metanosulfónico, etc.

Además, el presente péptido de unión a titanio y similares pueden prepararse según métodos comunes con una técnica de ingeniería genética, con la información de secuencia básica de ADN que codifica para el presente péptido de unión a titanio y similares. La purificación del presente péptido de unión a titanio así obtenido puede realizarse apropiadamente según métodos generales, por ejemplo, métodos comúnmente usados en el campo de la química de péptidos, tal como resina de intercambio iónico, cromatografía de reparto, cromatografía en gel, cromatografía de afinidad, cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), método de reparto en contracorriente, etc.

Adicionalmente, pueden usarse péptidos químicamente modificados ventajosamente como el presente péptido de unión a titanio, el presente péptido de unión a plata y el péptido de unión a silicio. En cuanto a la modificación química, puede mostrarse a modo de ejemplo una modificación química que comprende la sustitución de un aminoácido que tiene un grupo funcional, o modificación química con el fin de formar fácilmente la unión con un ligador. Sin embargo, es preferible una modificación que no disminuye la capacidad de unión a titanio, plata y silicio. Por ejemplo, en cuanto a la modificación química mencionada anteriormente con el fin de formar fácilmente la unión con un ligador, puede mostrarse a modo de ejemplo la unión covalente de biotina al grupo amino del péptido usando un compuesto de éster de N-hidroxisuccinimida de biotina. Mediante la biotilación de péptidos, pueden prepararse fácilmente moléculas quiméricas descritas a continuación.

En cuanto a la proteína artificial que tiene una capacidad de unión a titanio, plata y silicio, no hay ninguna limitación específica siempre que comprenda un conjugado del presente péptido de unión a titanio, el presente péptido de unión a plata, el péptido de unión a silicio con un péptido funcional o una proteína funcional. En cuanto a la función de la proteína o el péptido funcional anterior, pueden mostrarse a modo de ejemplo las siguientes funciones: función para formar fácilmente una estructura secundaria tal como hélice α , función de promoción de la calcificación, función de inducción del crecimiento óseo/diferenciación, función de unión a cromóforo, función de unión a colágeno, función de adhesión celular, función para localizar una proteína extracelularmente, función para seleccionar como diana orgánulos intracelulares particulares (mitocondrias, cloroplastos, RE, etc.), función para incrustarse en la membrana celular, función para formar fibra de amiloide, función para formar proteína fibrosa, función para formar gel de proteína, función para forma película de proteína, función para formar una monocapa, función de autoensamblaje tal como formar cristales bidimensionales mediante autoensamblaje, función para formar partículas, función para ayudar en la formación conformacional de otras proteínas, función de antígeno que induce anticuerpos neutralizantes tales como virus y función de inmuoestimulación (Nature Medicine, 3: 1266-1270, 1997); función de promoción o supresión de la proliferación celular, función para reconocer específicamente células cancerosas, función de transducción de proteínas, función de inducción de muerte celular, función de expresión de residuos

determinantes antigénicos, función de unión a metales, función de unión a coenzimas, función de activación de catalizadores, función de activación-coloración de fluorescencia, función para unirse a un receptor particular y activar el receptor, función para unirse a un factor particular relacionado con la señalización y modulación de la función, y función para reconocer específicamente biopolímeros tales como proteína, ADN, ARN, azúcar, etc. Estas proteínas artificiales pueden prepararse uniendo directa o indirectamente un péptido funcional o una proteína funcional a un péptido que tiene una capacidad de unión a titanio al nivel de aminoácidos o al nivel del ADN. Cuando se preparan al nivel del ADN, tecnología de diseño por ingeniería genética para obtener proteínas artificiales dada a conocer en "Method for preparing high molecular microgene polymer" (patente japonesa n.º 3415995) o "Multifunctional base sequence and artificial gene including thereof" (solicitud de patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 2001-352990), dada a conocer por los presentes inventores.

Entre los péptidos funcionales o proteínas funcionales anteriores, usando un péptido o una proteína que puede formar un cristal bidimensional mediante autoensamblaje cooperando con un péptido que tiene una capacidad de unión a titanio, plata o silicio, por ejemplo, es posible construir una proteína artificial que puede alinear titanio, plata o silicio a lo largo del cristal bidimensional ordenadamente a nanoescala. En cuando a un péptido o una proteína que puede formar un cristal bidimensional mediante autoensamblaje cooperando con un péptido que tiene una capacidad de unión a titanio, plata o silicio, los ejemplos incluyen virus (por ejemplo, adenovirus, rotavirus, poliovirus, HK97, CCMV, etc.), la familia de la ferritina tal como ferritina o apoferritina, proteína DpsA o proteína MrgA. En cuanto a otros péptidos o proteínas que pueden formar un cristal bidimensional mediante autoensamblaje, pueden mostrarse a modo de ejemplo proteínas artificiales con repetibilidad potenciada, diseñadas artificialmente. Además, en cuanto a un método para preparar un cristal bidimensional de proteína, puede mostrarse a modo de ejemplo un método que comprende las etapas de desarrollar la disolución de proteína sobre una superficie de agua con monocapa, y adsorber sobre una placa sólida.

Además, entre el péptido funcional o la proteína funcional anterior, por ejemplo usando un péptido o una proteína que comprende una secuencia peptídica que tiene una actividad de reconocimiento celular tal como actividad de adhesión celular, puede obtenerse una proteína artificial con actividad conjugada para reconocer titanio, plata o silicio, y células simultáneamente. En cuanto al péptido o proteína que comprende una secuencia peptídica que tiene una actividad de reconocimiento celular tal como actividad de adhesión celular, los ejemplos incluyen diversos ligandos, anticuerpos monoclonales o región variable de los mismos, anticuerpo de cadena sencilla etc., y además, proteínas artificiales que comprenden un péptido que tiene actividad de adhesión celular, no limitada a proteínas naturales, tal como se mencionó anteriormente.

En cuanto a la proteína quimérica que tiene una capacidad de unión a titanio, plata o silicio, pueden mostrarse a modo de ejemplo moléculas quiméricas que comprenden un conjugado del presente péptido de unión a titanio, el presente péptido de unión a plata o el presente péptido de unión a silicio, con una sustancia marcada que puede proporcionar una señal detectable por separado o mediante reacción con otros materiales, o una etiqueta peptídica. En cuanto a la sustancia marcada anterior, puede mostrarse a modo de ejemplo una enzima, sustancia fluorescente, sustancia química luminiscente, radioisótopo, región Fc de anticuerpos, etc. Específicamente, los ejemplos incluyen: enzima incluyendo peroxidasa (por ejemplo, peroxidasa del rábano), fosfatasa alcalina, β -D-galactosidasa, glucosa oxidasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, alcohol deshidrogenasa, malato deshidrogenasa, penicilinas, catalasa, apoglucoasa oxidasa, ureasa, luciferasa o acetilcolina esterasa; sustancias fluorescentes incluyendo isotiocianato de fluoresceína, fibobiliproteína, quelato de metales de tierras raras, cloruro de dansilo o isotiocianato de tetrametilrodamina, etc.; radioisótopos incluyendo ^3H , ^{14}C , ^{125}I , etc.; y sustancia química luminiscente. Además, en cuanto a las etiquetas peptídicas, pueden mostrarse a modo de ejemplo específicamente etiquetas peptídicas convencionalmente conocidas incluyendo etiqueta de epitopo tal como HA, FLAG, Myc; o etiqueta de afinidad tal como GST, proteína de unión a maltosa, péptido biotinilado, oligohistidina (His). Por ejemplo, usando la afinidad de la etiqueta de His y Ni-NTA, puede purificarse fácilmente un complejo de titanio/péptido o proteína.

En cuanto a la proteína quimérica que tiene una capacidad de unión a titanio, plata o silicio, pueden mostrarse a modo de ejemplo moléculas quiméricas que comprenden un conjugado del presente péptido de unión a titanio, el presente péptido de unión a plata o el presente péptido de unión a silicio, con compuestos no peptídicos. Entre los compuestos no peptídicos anteriores, en cuanto a compuestos no peptídicos de bajo peso molecular, pueden mostrarse a modo de ejemplo específicamente fluorocromo tal como fluoresceína y rodamina, antibióticos tales como cloranfenicol y ampicilina. Además, en cuanto a compuestos no peptídicos de alto peso molecular, pueden mostrarse a modo de ejemplo específicamente poliestireno, polipropileno, polietileno, perla de vidrio, gel de sílice, polisacáridos (incluyendo derivados), polialquilenglicol tal como polietilenglicol.

En cuanto al fago que tiene una capacidad de unión a titanio, plata o silicio, no hay ninguna limitación particular siempre que sea un fago que expresa el presente péptido de unión a titanio, el presente péptido de unión a plata o el presente péptido de unión a silicio sobre la superficie de una partícula. Además, en cuanto a los fagos que tienen una capacidad de unión a titanio, plata o silicio, pueden obtenerse como clones de fago que se unen a titanio, plata o silicio, separando el fago que expresa el péptido fuertemente unido a una molécula de titanio, molécula de plata o molécula de silicio de otros grupos de fago durante el procedimiento de selección mencionado anteriormente. Además, pueden obtenerse también integrando ADN que codifica para el presente péptido de unión a titanio, el presente péptido de unión a plata o el presente péptido de unión a silicio en un vector de fagémido para transfectar

células huésped tales como *E. coli* e infectar un fago auxiliar. En general, fagos filamentosos tales como M13 o fd adoptan un estado de cristal líquido en un estado de alta concentración, y adoptan una construcción de alineación regular. Por tanto, preparando un estado de cristal líquido del fago de péptido que reconoce titanio, puede obtenerse una condición en la que se alinean regularmente péptidos que reconocen titanio en una nanoescala. Poniendo en
5 contacto titanio, es posible alinear titanio con la capacidad de reconocimiento de titanio de los péptidos.

En cuanto al complejo de titanio, plata o silicio con un péptido, el complejo de titanio, plata o silicio con una proteína artificial, el complejo de titanio, plata o silicio con una proteína quimérica, el complejo de titanio, plata o silicio con un fago, los ejemplos incluyen un complejo en el que en el que el péptido mencionado anteriormente que tiene una
10 capacidad de unión a titanio, plata o/y silicio, la proteína artificial mencionada anteriormente que tiene una capacidad de unión a titanio, plata y/o silicio, la proteína quimérica mencionada anteriormente que tiene una capacidad de unión a titanio, plata y/o silicio, o el fago mencionado anteriormente que tiene una capacidad de unión a titanio, plata y/o silicio se une con titanio, plata o silicio mediante cualquier unión débil tal como unión iónica, unión electrónica π , unión de van der Waals, unión hidrófoba, etc. o combinación de las mismas. Particularmente, el complejo de titanio-
15 proteína artificial puede usarse ventajosamente como material de implante, fotocatalizador, pigmento, etc.

Mediante el uso de citocinas que promueven la diferenciación ósea fusionándose a un péptido de unión a titanio, por ejemplo las que unen BMP a material de implante de titanio mediante un péptido de unión a titanio, se produce una formación de hueso agresiva en las proximidades del implante de titanio. Por tanto, puede esperarse que la duración de la osteointegración pueda acortarse. Además, usando como péptido o proteína que promueve la biomineralización de hidroxapatita fusionándose artificialmente a un péptido de unión a titanio los que se unen a material de implante de titanio mediante un péptido de unión a titanio, se promueve la calcificación de la superficie del implante de titanio y, por tanto, puede esperarse que la duración de la osteointegración pueda acortarse. Alternativamente, usando como péptido o proteína o compuesto que tiene una actividad antibacteriana fusionándose artificialmente a un péptido de unión a titanio los que se unen a material de implante de titanio mediante un péptido de unión a titanio, pueden disminuirse enfermedades infecciosas durante la osteointegración. Además, mediante la unión de colágeno fusionando un péptido de unión a titanio a material de implante de titanio mediante un péptido de unión a titanio, es posible construir una construcción que podría no observarse en una raíz dental artificial convencional, justo como si se uniese fibra de colágeno perpendicularmente a la raíz dental artificial. Esto imita a un mecanismo que dispersa la fuerza que tienen los dientes originalmente cuando se aplica una fuerza intensa, y por tanto, cuando se aplica una fuerza intensa a una raíz dental artificial, puede obtenerse una estabilidad superior en comparación con la raíz dental artificial convencional.
20
25
30

Puesto que el péptido de unión a titanio puede unirse a plata simultáneamente, por ejemplo, productos cosméticos en los que colágeno que se fusiona a un péptido de unión a titanio se une a plata y pigmento de titanio oxidado, pueden tener una alta actividad antibacteriana.
35

Según el método para el refinamiento de una superficie de titanio usando el presente péptido de unión a titanio, el método para el refinamiento de una superficie de titanio para formar una partícula de titanio o para alinear titanio, usando la proteína artificial unida al presente péptido de unión a titanio, el método para el refinamiento de una superficie de titanio o para formar una partícula de titanio usando la proteína quimérica unida al presente péptido de unión a titanio, o el método para alinear titanio o para formar una partícula de titanio usando el fago que expresa el presente péptido de unión a titanio sobre la superficie de una partícula, es posible mejorar la característica de una superficie de titanio o la propiedad física del titanio, y particularmente, sería posible el desarrollo de un dispositivo a nanoescala con el modelado del titanio oxidado usando la capacidad de autoensamblaje de la proteína.
40
45

Además, según el método para el refinamiento de una superficie de silicio o una superficie de plata, o para formar una partícula de plata o una partícula de silicio, usando el presente péptido de unión a plata o el presente péptido de unión a silicio, o el método para el refinamiento de una superficie de silicio o una superficie de plata, o para formar una partícula de plata o una partícula de silicio, o para alinear plata o silicio, usando la proteína artificial unida con el presente péptido de unión a plata o el presente péptido de unión a silicio, o el método para el refinamiento de una superficie de plata o una superficie de silicio, o para formar una partícula de plata o una partícula de silicio, usando la proteína quimérica unida con el presente péptido de unión a plata o el presente péptido de unión a silicio, o el método para formar una partícula de plata o una partícula de silicio o para alinear plata o silicio, usando el fago que expresa el presente péptido de unión a plata o el presente péptido de unión a silicio sobre la superficie de una partícula, es posible mejorar las características de una superficie de plata o una superficie de silicio o las propiedades físicas de plata/silicio.
50
55

En particular, mediante el refinamiento de una superficie de titanio, una superficie de plata o una superficie de silicio, es posible conferir capacidad de biomineralización que forma minerales (compuestos inorgánicos) dentro y fuera del propio organismo vivo.
60

Además, usando el presente péptido de unión a titanio, el presente péptido de unión a plata o el presente péptido de unión a silicio como sonda de microscopio de fuerza atómica (MFA), es posible realizar el análisis de una superficie de material sólido en una disolución acuosa. Por ejemplo, el presente péptido de unión a titanio, o una proteína artificial/proteína quimérica que se fusiona a un péptido de unión a titanio se fija a la sonda del microscopio de fuerza
65

atómica mediante por ejemplo unión a oro/tiol. Aproximando la sonda al sustrato de titanio/plata/silicio, se genera una interacción entre el péptido de unión a titanio y el sustrato y se interrumpe la interacción separando la sonda. La tensión así generada puede medirse. Además, explorando la sonda bidimensionalmente, puede realizarse el mapa de fuerzas que tiene la fuerza de unión de la superficie del sustrato y el péptido de unión a titanio como un índice.

5 Según el mapa de fuerzas realizado, es posible seleccionar una amplia variedad de materiales y superficie de cristal que son apropiados para el modelado.

A continuación, la presente invención se explicará en detalle, con referencia a los ejemplos, pero el alcance técnico de la presente invención no se limita a estos ejemplos.

10 (Ejemplo 1)

Se pusieron 10 mg de partícula de titanio con un diámetro de partícula de 150 μ M (Sumitomo Titanium Corporation, Hyogo) en un tubo Eppendorf de 1,5 ml, y se lavaron dos veces con una disolución de 500 μ l de tampón tris(hidroxiometil)aminometano 50 mM (a continuación en el presente documento denominado tris (Kishida Chemical (Osaka)) HCl pH 7,5; 150 mM de disolución de cloruro de sodio (Wako Pure Chemicals, Osaka) (a continuación en el presente documento denominada TBS) complementada con albúmina sérica bovina al 0,1% (a continuación en el presente documento denominada BSA), monolaurato de polioxietilensorbitano al 0,1% (a continuación en el presente documento denominado Tween-20 (Sigma, St. Louis)). Se realizó el lavado de las partículas de titanio mediante centrifugación con una centrífuga de sobremesa H1300 (Kokusan) a 13.000 rpm, 5 s, para precipitar las partículas de titanio y eliminar el sobrenadante. Tras lavar, con el fin de bloquear la adsorción no específica del fago, se agitó la mezcla mediante rotación con 1 ml de la misma disolución durante 30 min. a temperatura ambiente usando un agitador rotatorio RT-50 (Taitec).

25 Centrifugando con una centrífuga de sobremesa H1300 (Kokusan) a 13.000 rpm, 5 s, se precipitaron las partículas de titanio, se eliminó el sobrenadante y entonces se añadieron 1 ml de TBS que contenía la biblioteca de fago de expresión de péptido, la biblioteca D12 que expresaba péptido al azar lineal de 12 residuos (New England Biolabs, Beverly), 17×10^{11} unidades formadoras de placa (a continuación en el presente documento denominadas ufp) o la biblioteca C7C que expresaba péptido al azar cíclico de 7 residuos (New Engand Biolabs) $2,0 \times 10^{11}$ ufp, BSA al 0,1% y disolución de Tween-20 al 0,1%, y se agitaron mediante rotación durante 2 horas, a temperatura ambiente con un agitador rotatorio RT-50.

35 Centrifugando con una centrífuga de sobremesa H1300 (Kokusan) a 13.000 rpm, 5 s, se eliminó el sobrenadante, y se lavó el resultado 10 veces con 1 ml de TBS, disolución de Tween-20 al 0,1%. Se realizó el lavado centrifugando a 8000 X g, 5 s, precipitando las partículas de titanio. Tras eliminar la disolución de lavado, se añadió 1 ml de tampón glicina 0,2 M (Wako Pure Chemicals), HCl pH 2,2 y se agitó mediante rotación durante 10 min. a temperatura ambiente con un agitador rotatorio RT-50 (Taitec) para eluir el fago unido a titanio. Se precipitó el titanio mediante centrifugación, y se transfirió el sobrenadante a un tubo Eppendorf de 1,5 ml separado. Entonces, se añadieron 150 μ l de tampón tris/HCl 1 M pH 9,1 para neutralizar, y se midió el título de fagos en la disolución (capacidad de formación de placas por disolución unitaria) según un procedimiento común (Molecular Cloning tercera edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press).

45 Se infectó el eluato de fago obtenido mediante la operación anterior en la cepa ER2738 de *E. coli* [F'lacl^q Δ (lacZ) M15proA⁺B⁺z'zf : : Tn10 (TetT) fhuA2 supE thi Δ (lac- proAB) Δ (hsdMS- mcrB) 5 (r_k m_k McrBC)] en fase de crecimiento logarítmica en 20 ml de medio LB, se agitó agresivamente a 37°C con un incubador con agitación (BR-40 LF, Taitec) y se incubó durante 6 horas. Se transfirió la disolución de cultivo infectado con fago a un tubo de centrífuga (50 ml, Beckman, California) y, con una centrífuga Beckman (Beckman, rotor JA-12), se centrifugó el resultado dos veces a 4°C, 10 min., a 10.000 rpm, y se realizó dos veces la operación para eliminar la cepa ER2738. Entonces, se transfirió la disolución de fagos del sobrenadante a otro tubo. A la disolución de fagos, se le añadieron 50 3,5 ml (1/6 de la cantidad) de disolución de polietilenglicol 6000 al 20% (a continuación en el presente documento denominado PEG6000, Fluka, Bucks), NaCl 2,5 M. Se agitó la mezcla bien con una mezcladora de tubos de ensayo TM252 (Iwaki), y se incubó a 4°C durante 12 horas, para precipitar los fagos.

55 Se centrifugaron los fagos precipitados con una centrífuga Beckman a 4°C, durante 10 min., a 10.000 rpm y se recuperaron. Se centrifugaron adicionalmente los precipitados de fagos a 4000 rpm durante 1 min., y se eliminó completamente el poco sobrenadante restante. Se añadió 1 ml de TBS a los precipitados de fagos obtenidos, se enfriaron sobre hielo y se suspendieron suavemente los fagos. Se transfirió la suspensión de fagos a un tubo Eppendorf de 1,5 ml, se centrifugó con una microcentrífuga de alta velocidad (AT2018M Roter, Kubota) durante 5 min., a 15.000 rpm. Se transfirió el sobrenadante a un tubo separado y se eliminaron los residuos no suspendidos.

60 Se añadieron de nuevo 200 μ l de disolución de PEG6000 al 20%, NaCl 2,5 M a la disolución de fagos, y se agitó bien la mezcla con una mezcladora y se incubó sobre hielo durante 1 hora, para precipitar los fagos. A continuación, se centrifugó el resultado con una microcentrífuga de alta velocidad durante 10 min., 15.000 rpm y se recogieron los precipitados de fagos. A los precipitados de fagos obtenidos, se le añadieron 200 μ l de azida de sodio al 0,02% (Wako Pure Chemicals, Osaka), TBS para lograr una suspensión completa. Se eliminaron los residuos no suspendidos mediante centrifugación con una microcentrífuga de alta velocidad durante 5 min., a 15.000 rpm. Se

calculó el título de la disolución de fagos concentrada obtenida.

Una serie de operaciones que comprenden la unión de un fago a una molécula diana (para este caso, titanio), el lavado, la recogida, la proliferación mediante *E. coli*, tal como se mencionó anteriormente, se denominan operación de cribado. Repitiendo la operación de cribado, es posible concentrar un clon de fago que se une fuertemente de manera específica a una molécula diana. En este caso, tras la primera operación de cribado, se repitieron las operaciones de cribado segunda y siguientes que incluían la unión a titanio, el lavado, la recogida y la proliferación usando fagos una vez proliferados con *E. coli*. Lo siguiente era diferente para la condición experimental para la operación de cribado tras la segunda vez, en comparación con la 1ª operación. En otras palabras, el título de fago que va a añadirse en la operación de cribado segunda y siguientes se preparó para que fuese de: $2,0 \times 10^{11}$ para ambas biblioteca D12/biblioteca C7 para la 2ª vez; $2,0 \times 10^{10}$ para ambas biblioteca D12/biblioteca C7C para la 3ª vez; $4,3 \times 10^9$ para la biblioteca D12 y $2,0 \times 10^{10}$ para la biblioteca C7C para la 4ª vez. Se preparó la concentración de la disolución en la que se suspende el fago concentrado, la disolución de reacción de titanio y Tween-20 en la disolución de lavado para que fuese del 0,1%, el 0,3% y el 0,5% para la operación de cribado 2ª, 3ª, 4ª, respectivamente.

Se muestra el cambio de la razón de título de entrada (título de fago añadido a una molécula diana) y el título de salida (título de fago eluido de la molécula diana tras lavar) del experimento de cribado usando la biblioteca D12 en la figura 1. Además, se muestra la razón de cambio del título de entrada y el título de salida del experimento de cribado en la biblioteca C7C en la figura 2.

Se clonaron los fagos obtenidos en la 3ª ronda en la biblioteca D12 y la biblioteca C7C según un procedimiento común (Fago Display A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001) y se determinó la secuencia de bases del parte peptídica expresada. Se realizó la determinación de la secuencia de bases mediante el método de terminación de didesoxi (kit CEC DTCS Quick start, Beckman, California) usando un cebador correspondiente a una cadena complementaria de una secuencia de bases ubicada 96 bases en el sentido de 3' de la región peptídica expresada [cebador de secuenciación -96gIII (5'-HOCCCTCATAGTTAGCGTAACG-3')] (SEQ ID NO: 39), NEB, Beverly]. Para la electroforesis de los productos de reacción y el análisis de datos, se usó un autosecuenciador capilar (CEQ2000, Beckman).

Se muestra la secuencia peptídica expresada estimada a partir de las secuencias de ADN determinadas en la figura 3 para la biblioteca D12 (SEQ ID NO: 3, 16 a 24) y en la figura 4 para la biblioteca C7C (SEQ ID NO: 25 a 38), respectivamente.

En cuanto a la secuencia peptídica que expresa el fago e3-2-3 obtenido a partir de la biblioteca D12, RKLDPAPGMHTW (SEQ ID NO: 3), entre los 43 clones examinados, había 33 que tenían la misma secuencia. Uno de los motivos por los que un clon de fago particular se convierte en mayoritario en el grupo es que el clon de fago tiene una fuerte capacidad de unión a la molécula diana.

Se clonaron los péptidos de expresión de fagos mostrados en la figura 3 (SEQ ID NO: 3, 16 a 24) y la figura 4 (SEQ ID NO: 25 a 38) y se evaluó la capacidad de unión a titanio en una condición clonada tal como sigue.

(Ejemplo 2)

Usando el clon de fago obtenido en el ejemplo 1, se evaluó la capacidad de unión a titanio mediante el siguiente experimento. Se realizó el mismo método que para la operación de cribado mostrada en el ejemplo 1. La diferencia con el ejemplo 1 es que el tiempo de agitación del titanio y el clon de fago era de 1 hora; la concentración de Tween 20 y la concentración de BSA en cada disolución era del 0,5% y el 1%, respectivamente, y que el título del fago añadido era de 10^9 ufp para el clon de D12 y de 10^{11} ufp para el clon de C7C. Se muestra la capacidad de unión de titanio de cada clon de fago en la figura 5.

(Ejemplo 3)

En cuanto al clon fuertemente unido particularmente con titanio (que expresa el péptido de SEQ ID NO: 3), se examinó la forma de unión de la superficie de titanio y el fago, midiendo con QCM-D300 (Q-sense AB, Gotemburgo), que es un dispositivo para la cuantificación de la interacción con una microbalanza de cristal de cuarzo.

Para una microbalanza de cristal de cuarzo, se usó un sensor de titanio que es una parte genuina de QCM-D300. Se fijó la temperatura a 24,99°C, y el valor de medición real era de aproximadamente 24,68°C a 24,70°C. Se midió en una condición de bloqueo del sensor con BSA, y en una condición sin bloqueo. Cuando no se realiza el bloqueo con BSA, tras medir el valor patrón con TBS, se midió de manera continua la disolución de fago ajustada de modo que el título de fago es de 10^{10} ufp/ml. Cuando se realiza el bloqueo con BSA, tras medir el valor patrón con TBS, se realizó el bloqueo incubando durante aproximadamente 10 min. con TBS, BSA al 0,1%, y tras lavar de nuevo migró BSA con TBS, se midió de manera continua la disolución de fago de modo que el título de fago es de 10^{11} ufp/ml. Se muestran los resultados en la figura 6.

A partir de los resultados mostrados en la figura 6, queda claro que el clon de fago se une al sensor a partir del cambio de frecuencia, en ausencia de BSA. Sin embargo, y ya que la viscoelasticidad no aumentaba significativamente, se estima que el fago se une fuertemente a la superficie de titanio horizontalmente, tal como se muestra en la figura 7 (parte inferior). Por otro lado, cuando se bloquea el sensor con BSA, puede observarse que la cantidad de fago que se une al sensor es pequeña a partir del pequeño cambio de la frecuencia, mientras que la viscoelasticidad aumenta significativamente. Estos resultados sugieren que, tal como se muestra en la figura 7 (parte superior), el fago se une a la superficie de titanio en su mayor parte en la región de péptido de expresión, y que existen otras partículas de fago en la disolución, que no están unidas a titanio. Sin embargo, en cuanto al fago control, se observa adsorción no específica a la superficie de titanio en ausencia de BSA de la misma manera, mientras que no se observa el aumento de la viscoelasticidad cuando se bloquea con BSA.

(Ejemplo 4)

Para el clon fuertemente unido particularmente con titanio (SEQ ID NO: 3) en el ejemplo 2, se prepararon mutantes puntuales sustituyendo con alanina que tiene sólo un grupo metilo en la cadena lateral y se examinó el cambio de la capacidad de unión a titanio para cada fago mutante. Puesto que el mutante puntual comprende alanina en la 6ª posición en la secuencia expresada, se prepararon mutantes para todos los residuos excepto para el 6º residuo. Se realizó la preparación de mutantes puntuales mediante el método de Kunkel (Molecular Cloning tercera edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press). Se muestran los ADN sintéticos usados para preparar mutantes puntuales en la figura 8 (SEQ ID NO: 40 a 50). Se confirmó la introducción de la mutación puntual determinando la secuencia de ADN del ADN del fago. Se realizó la secuenciación del ADN de la misma manera que en el ejemplo 1. Se midió la capacidad de unión a titanio de los mutantes puntuales obtenidos mediante el método mostrado en el ejemplo 2, ajustando la cantidad de fago añadida a 10^{10} ufp. Se mostró la capacidad de unión a titanio de cada mutante puntual en la figura 9.

A partir de los resultados mostrados en la figura 9, puede suponerse que la carga de la cadena lateral de la 1ª arginina y el 5º ácido aspártico desempeñan un papel importante para la unión con titanio. Además, a partir de los resultados del mutante de la 4ª prolina, se sugiere que la curvatura de la cadena principal del péptido en la 4ª prolina es muy importante.

(Ejemplo 5)

A partir de los resultados del ejemplo 4, los importantes para la unión al titanio se concentran en la parte amino-terminal de SEQ ID NO: 3. Por tanto, se prepararon mutantes en los que se delecionan del 7º al 12º del lado carboxilo-terminal y se examinó el cambio de la capacidad de unión a titanio. Además, se preparó un mutante de delección similar para un mutante cuya capacidad de unión aumentaba en el ejemplo 4, en el que la 2ª lisina se sustituye por alanina y se examinó el cambio de la capacidad de unión a titanio.

Se prepararon los mutantes de delección mediante el método mostrado esquemáticamente en la figura 10. Se preparó ADN bicatenario de cada clon de fago (a continuación en el presente documento denominado RF) usando el kit QIAGEN. Se realizó PCR preparando el RF obtenido como una matriz. Al cebador usado (figura 8, SEQ ID NO: 51 a 53), se le añadió una secuencia de poli G de 3 residuos al lado 5'-terminal de modo que es posible la escisión con BamHI y el sitio de escisión de BamHI de la enzima de restricción en el lado 5'-terminal. En cuanto al reactivo, se usó el sistema de PCR Expand™ Long Template (Boehringer), y se realizó la reacción con 100 µl de disolución que comprende 1 µl de polimerasa, 10 µl de 10 X disolución tampón 2 unida, 8 µl de dNTP 2,5 mM, 1 µl de cada uno de cada cebador 100 pmol/µl y 0,5 µl de RF. Se realizó la reacción de PCR durante 30 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a 60°C, 6 min. a 72°C. Además, antes del ciclo, se realizó un precalentamiento de 5 min. a 94°C, y después del ciclo, se incubó la mezcla durante 7 min. a 72°C. Tras la reacción de PCR, se separó el producto mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, y se cortó bajo UV la banda de alrededor de 7 kb que es del tamaño previsto y, usando el kit GeneClean II (Funakoshi), se purificó la banda según el protocolo adjunto. Se incubó el ADN purificado a 30°C durante 2 horas con la enzima de restricción BamHI (Boehringer). Entonces, se inactivó BamHI mediante precipitación con etanol para dar ADN seco. Se disolvió el ADN secado en 4 µl de agua estéril y 5 µl de 2x tampón de ligamiento (Promega). Entonces, se añadió 1 µl de ADN ligasa de T4 (Roche), se realizó la reacción de ligamiento a temperatura ambiente durante 30 min. para lograr el cierre del anillo. A la disolución de reacción, se le añadieron 100 µl de células competentes de la cepa ER2738 de *E. coli* descrita en el ejemplo 1, se dejó reposar la mezcla sobre hielo durante 30 min., y tras añadir un choque térmico de 42°C durante 40 s, se puso inmediatamente sobre hielo durante 3 min. Entonces, se añadieron 800 µl de medio SOC, se cultivó agitando agresivamente durante 3 horas a 37°C. Entonces, se mezclaron 1, 10, 100 µl con 200 µl de la cepa ER2738 en fase de crecimiento logarítmica, y se dejó reposar durante 5 min. Después de eso, se clonó el resultado según un procedimiento común (Molecular Cloning tercera edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press). Se confirmó la introducción de la delección secuenciando la secuencia de ADN del fago. Se realizó la secuenciación del ADN de la misma manera que en el ejemplo 1. Se midió la capacidad de unión a titanio de los mutantes puntuales obtenidos mediante el método mostrado en el ejemplo 2, ajustando la cantidad de fago añadida a 10^{10} ufp. Se muestra la capacidad de unión a titanio de ambos mutantes de delección en la figura 11. A partir de la figura 11, se ha revelado que el clon de fago que expresa un péptido mostrado en SEQ ID NO: 1 que se une a titanio se une con la misma fuerza para la 1ª a la 6ª en

la primera parte.

(Ejemplo 6)

5 A partir del resultado del ejemplo 4, se ha revelado que la carga positiva de la cadena lateral de la primera arginina de SEQ ID NO: 1 desempeña un papel importante en la unión a titanio. Sin embargo, ya que la arginina está ubicada en el extremo amino-terminal, tiene un grupo amino cargado positivamente en el extremo de la cadena principal. Con el fin de investigar la posibilidad de que la carga positiva funcione cooperando con la carga positiva de la cadena lateral, se preparó un mutante de inserción en el que se introduce alanina antes de la arginina y se examinó la influencia en la capacidad de unión a titanio.

15 Se realizó la preparación del mutante de inserción mediante el mismo método que en el ejemplo 4, excepto por la condición de apareamiento. Se realizó el apareamiento a 85°C durante 10 min., a 48°C durante 15 min., y entonces se apagó el interruptor del bloque de calor (ALB121, IWAKI) y se dejó hasta que se enfrió hasta temperatura ambiente. Se muestra la secuencia del cebador usado (SEQ ID NO: 54) en la figura 8. Se confirmó la introducción de la mutación de inserción secuenciando la secuencia de ADN del fago. Se realizó la secuenciación del ADN de la misma manera que en el ejemplo 1. Se midió la capacidad de unión a titanio del mutante de inserción obtenido según el método mostrado en el ejemplo 2 ajustando el nivel de fago añadido a 10^{10} ufp. Se muestra la capacidad de unión a titanio del mutante de inserción en la figura 11.

20 Los resultados del ejemplo 6 muestran que no siempre es necesario que la arginina esté en la cabeza para la unión de SEQ ID NO: 15 a titanio. Esto es un importante conocimiento que muestra que cuando se prepara una proteína química, proteína artificial o péptido sintético que se une a titanio, no hay ninguna limitación para la colocación de SEQ ID NO: 1 ó 3.

(Ejemplo 7)

30 A partir de los resultados de los ejemplos 3 a 6, puede estimarse que el clon de fago que expresa un péptido mostrado en SEQ ID NO: 3 se une a un grupo hidroxilo unido a un átomo de titanio, que está cargado. Por tanto, para aumentar los grupos hidroxilo que se unen a la superficie de titanio, se examina la capacidad de unión de un clon de fago que expresa un péptido mostrado en SEQ ID NO: 3, a partículas de titanio tratadas con peróxido de hidrógeno.

35 Se pusieron 10 mg de partículas de titanio (diámetro de partícula por debajo de 150 nm; Sumitomo titanium) en un tubo Eppendorf, se añadió 1 ml de peróxido de hidrógeno al 3% (Wako Pure Chemical). Se incubó la mezcla a 120°C, 80°C, temperatura ambiente (TA) durante 1 hora, respectivamente y se lavó dos veces con TBS. Se midió la capacidad de unión del clon de fago que expresa un péptido mostrado en SEQ ID NO: 3 mediante el método mostrado en el ejemplo 2, ajustando la cantidad de fago añadida a 10^{10} ufp. Se muestra la influencia del tratamiento con peróxido de hidrógeno sobre la capacidad de unión del fago en la figura 12.

40 A partir de los resultados del ejemplo 7, se revela que mediante el tratamiento con peróxido de hidrógeno, puede aumentarse el nivel de unión del clon de fago que expresa un péptido mostrado en SEQ ID NO: 3. Por tanto, cambiando la condición de la superficie de titanio, se sugiere la posibilidad de controlar el nivel de unión de fago.

(Ejemplo 8)

45 Para investigar la especificidad de unión del clon de fago que expresa un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 3 a material metálico, en 10 mg de cada uno de oro (pureza > 99,9%, diámetro de partícula < 150 μ m)/plata (pureza > 99,9%, diámetro de partícula < 75 μ m)/cobre (pureza > 99%, diámetro de partícula 75 - 150 μ m)/platino (pureza > 99,9%, diámetro de partícula < 75 μ m)/hierro (pureza > 99,9%, diámetro de partícula < 150 μ m)/estaño (pureza > 99,9%, diámetro de partícula < 150 μ m)/zinc (pureza > 99,9%, diámetro de partícula < 150 μ m)/cromo (pureza > 98%, diámetro de partícula > 10 μ m)/cobalto (pureza > 99%, diámetro de partícula < 75 μ m)/silicio (pureza > 99%, diámetro de partícula < 150 μ m) (Kojundo Chemical Lab., Saitama), se examinó la capacidad de unión a cada metal mediante el mismo método del ejemplo 2, usando 10^{10} ufp/ml de clon de fago que expresa un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 3. Se muestran los resultados en la figura 13. A partir de los resultados mostrados en la figura 13, se ha revelado que el clon de fago que expresa un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 2 se une no solo a titanio, sino también a plata o silicio.

(Ejemplo 9)

60 Con el fin de confirmar si la forma de unión a plata o silicio, y la especificidad de secuencia del clon de fago que expresa un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 3 son similares que en el caso de la unión a titanio, se examinó la capacidad de unión del fago mutante sustituido con alanina de SEQ ID NO: 4, 5, 7, 8 usado en el ejemplo 4 a plata/silicio mediante el método mostrado en el ejemplo 2. Se muestran los

65

resultados en la figura 14. A partir de los resultados mostrados en la figura 14, la influencia de cada sustitución con alanina sobre la capacidad de unión a plata/silicio mostraba la misma tendencia que para el titanio. A partir de este resultado, se sugirió que el clon de fago que expresa SEQ ID NO: 3 se une a plata/silicona con el mismo mecanismo molecular y especificidad de secuencia que cuando se une a titanio.

5

(Ejemplo 10)

Con el fin de confirmar si el péptido sintético que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 3 se une a una superficie de titanio, se examinó la capacidad de unión de los péptidos sintéticos que comprenden una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 3 a partículas de titanio. Se pusieron 10 mg de partículas de titanio usadas en el ejemplo 1 en un tubo Eppendorf, se lavaron dos veces con HEPES-NaOH 50 mM, NaCl 150 mM. Entonces, se añadieron 100 μ l de 5 a 40 μ M de los péptidos sintéticos de SEQ ID NO: 3, y se agitó la mezcla mediante rotación usando un agitador rotatorio RT-50 (Taitec) a temperatura ambiente durante 2 horas. Centrifugando con una centrífuga de sobremesa H-1300 (Kokusai, Tokio), a 13.000 rpm, durante 5 s., se eliminó el sobrenadante, se mezcló con fluoroaldehído (Pias Rockford, Illinois), y usando un espectrofluorómetro (Nippon Bunko, Tokio), a una longitud de onda de excitación de 342 nm, una longitud de onda de fluorescencia de 437 nm, se calculó el nivel de unión a titanio a partir de la concentración de péptido del sobrenadante. Se calculó el área superficial relativa del titanio a partir de la densidad y el diámetro de partícula medio. Además, se examinó la capacidad de unión del péptido sintético que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 2 a silicona/estaño usado en el ejemplo 13 mediante el mismo método. Se realizó un ajuste con la isoterma de adsorción de Langmuir en los resultados obtenidos, y se muestran en la tabla 1 el nivel de adsorción máximo/constante de disociación obtenidos.

10
15
20

(Tabla 1)

	Kd (μ M)	qm (mol/m ²)
Ti	11,1 \pm 2,8	2,5 \pm 0,3 X 10 ⁻⁶
Si	13,2 \pm 4,0	2,1 \pm 0,3 X 10 ⁻⁷
Sn	ND	ND

25

(Ejemplo 11)

La mayoría de las veces, los péptidos que se unen a materiales inorgánicos tienen una capacidad de biomineralización del material diana. Por tanto, se examinó la capacidad de biomineralización de plata del péptido sintético que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 3 mediante el siguiente método. A de 0,1 a 0,4 mM de péptido sintético que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 3 disuelto en TBS, se le añadió disolución de nitrato de plata acuosa de modo que la concentración final era de 0,1 mM. Entonces se incubó la mezcla durante 48 horas a 25°C, y se recuperó la plata generada mediante centrifugación. Se lavó bien la plata recuperada con agua destilada, y se observó con microscopía electrónica de transmisión. Se muestran los resultados en la figura 15. A partir de los resultados mostrados en la figura 15, puede observarse que se generaban partículas cristalinas con un tamaño de aproximadamente 500 nm a partir del péptido sintético que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 3.

30
35(Ejemplo 12)

40

Se examinó la capacidad de biomineralización de silicio del péptido sintético que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 3 mediante el siguiente método. A de 2 a 12 mg/ml de péptido sintético que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 3 disuelto en TBS o PBS, se le añadió 1/10 de volumen de tetrametoxisilano (Shin-Etsu Chemical, Tokio) diluido con HCl 1 mM de modo que la concentración final era de 0,1 M, se dejó reposar durante 5 min. a temperatura ambiente. Entonces, se recuperó la sílice generada mediante centrifugación. Se lavó bien la sílice recuperada con agua destilada, y se disolvió mediante incubación con 20 μ l de NaOH 0,5 N, a 98°C durante 30 min. A 250 μ l de disolución diluida hasta de 100 a 500 veces con agua destilada, se le añadieron 10 μ l de ácido sulfúrico diluido 10 veces para medir el metal tóxico, 10 μ l de disolución de molibdato de amonio al 10%. Se incubó la mezcla a 25°C durante 10 min., y se determinó el nivel de sílice generado a partir de una densidad óptica a 385 nm. Se muestran los resultados en la figura 16. Se muestra la morfología de la sílice generada observada mediante microscopía electrónica de transmisión y microscopía electrónica de barrido en la figura 17. A partir de estos resultados, se ha revelado que el péptido sintético que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 3 tiene una capacidad de biomineralización de partículas de sílice.

45
50(Ejemplo 13)

55

Con el fin de mostrar que la proteína de fusión que tiene una secuencia peptídica que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 1 adquiere una capacidad de unión a titanio, se preparó una proteína de

<400> 2
Arg Ala Leu Pro Asp Ala
 1 5
 <210> 3
 <211> 12
 5 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> e3-2-3
 <400> 3
Arg Lys Leu Pro Asp Ala Pro Gly Met His Thr Trp
 10 1 5 10
 <210> 4
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial
 15 <220>
 <223> R1A
 <400> 4
Ala Lys Leu Pro Asp Ala Pro Gly Met His Thr Trp
 1 5 10
 <210> 5
 20 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> K2A
 25 <400> 5
Arg Ala Leu Pro Asp Ala Pro Gly Met His Thr Trp
 1 5 10
 <210> 6
 <211> 12
 <212> PRT
 30 <213> Artificial
 <220>
 <223> L3A
 <400> 6
Arg Lys Leu Pro Asp Ala Pro Gly Met His Thr Trp
 1 5 10
 <210> 7
 35 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> P4A
 40 <400> 7
Arg Lys Leu Ala Asp Ala Pro Gly Met His Thr Trp
 1 5 10
 <210> 8
 <211> 12
 45 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> D5A
 <400> 8
Arg Lys Leu Pro Ala Ala Pro Gly Met His Thr Trp
 50 1 5 10
 <210> 9
 <211> 12

<212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> P7A
 5 <400> 9
Arg Lys Leu Pro Asp Ala Ala Gly Met His Thr Trp
 1 5 10
 <210> 10
 <211> 12
 <212> PRT
 10 <213> Artificial
 <220>
 <223> G8A
 <400> 10
Arg Lys Leu Pro Asp Ala Pro Ala Met His Thr Trp
 1 5 10
 15 <210> 11
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 20 <223> M9A
 <400> 11
Arg Lys Leu Pro Asp Ala Pro Gly Ala His Thr Trp
 1 5 10
 <210> 12
 <211> 12
 25 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> H10A
 <400> 12
 30 **Arg Lys Leu Pro Asp Ala Pro Gly Met Ala Thr Trp**
 1 5 10
 <210> 13
 <211> 12
 <212> PRT
 35 <213> Artificial
 <220>
 <223> T11A
 <400> 13

Arg Lys Leu Pro Asp Ala Pro Gly Met His Ala Trp
 1 5 10
 40 <210> 14
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 45 <223> W12A
 <400> 14
Arg Lys Leu Pro Asp Ala Pro Gly Met His Thr Ala
 1 5 10
 <210> 15
 <211> 13
 50 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Inserto de Ala
 <400> 15

Ala Arg Lys Leu Pro Asp Ala Pro Gly Met His Thr Trp
 1 5 10
 <210> 16
 <211> 12
 <212> PRT
 5 <213> Artificial
 <220>
 <223> e3-2-2
 <400> 16
 -
 Leu Asp Thr Thr Gln Val Ser Gly Pro Met Ser Ser
 1 5 10
 10 <210> 17
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 15 <223> e3-2-5
 <400> 17
 Ser Tyr Arg Leu Pro Val Tyr Leu His Ala Leu Leu
 1 5 10
 <210> 18
 <211> 12
 20 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> e3-2-8
 <400> 18
 Ser Asp Pro Gln Gln Asp Trp Arg Arg Thr Thr Pro
 1 5 10
 25
 <210> 19
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial
 30 <220>
 <223> e3-2-12
 <400> 19
 Leu Pro Ser Gln Leu Leu Ser Gln Val Gln Leu Thr
 1 5 10
 <210> 20
 <211> 12
 35 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> e3-2-19
 40 <400> 20
 Leu Cys Ala Gln Gln Thr Thr Ser Val His Pro Pro
 1 5 10
 <210> 21
 <211> 12
 <212> PRT
 45 <213> Artificial
 <220>
 <223> e3-2-21
 <400> 21
 Met Gln Met Glu Gly Lys Pro Thr Leu Thr Leu Arg
 1 5 10
 50 <210> 22

<211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 5 <223> e3-2-29
 <400> 22
Ser Thr Leu Lys Gln Pro Ile Gln Leu Leu Ala Gln
1 5 10
 <210> 23
 <211> 12
 10 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> e3-2-43
 <400> 23
Ser Cys His Val Trp Tyr Asp Ser Cys Ser Ser Pro
1 5 10
 15 <210> 24
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial
 20 <220>
 <223> e3-2-55
 <400> 24
Gln Asp Met Ile Arg Thr Ser Ala Leu Met Leu Gln
1 5 10
 25 <210> 25
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 30 <223> e3-4-2
 <400> 25
Cys Thr Ser Pro Thr Ser Val Asp Cys
1 5
 35 <210> 26
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> e3-4-3
 <400> 26
Cys Thr Pro Ser Pro His Gln Gly Cys
1 5
 40 <210> 27
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 45 <223> e3-4-4
 <400> 27
Cys His Thr Ala Pro Leu Pro Arg Cys
1 5
 50 <210> 28
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> e3-4-6

<400> 28

Cys His Gly Ala Thr Pro Gln Asn Cys

1 5

<210> 29

<211> 9

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> e3-4-7

<400> 29

Cys Ser Gly His Asn Pro Thr His Cys

10 1 5

<210> 30

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

15 <220>

<223> e3-4-11

<400> 30

Cys Pro Met Trp Gln Ala Gln Gln Cys

1 5

20 <210> 31

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

25 <223> e3-4-12

<400> 31

Cys Gly Tyr Tyr Ser Met Ser His Cys

1 5

<210> 32

<211> 9

30 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> e3-4-13

<400> 32

Cys Asp Met Leu Thr Pro Arg Ser Cys

35 1 5

<210> 33

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

40 <220>

<223> e3-4-16

<400> 33

Cys Leu Arg Leu Gln Ser Gln Asp Cys

1 5

<210> 34

<211> 9

45 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> e3-4-17

50 <400> 34

Cys Gln Ile Thr Trp His His Thr Cys

1 5

<210> 35

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial
 <220>
 <223> e3-4-21
 <400> 35
Cys Ser Ala His His His Asp Lys Cys
 5 1 5
 <210> 36
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial
 10 <220>
 <223> e3-4-23
 <400> 36
Cys Met Thr Lys Asn Pro Leu Asn Cys
 1 5
 <210> 37
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> e3-4-29
 20 <400> 37
Cys Lys Thr Ser Leu Pro Thr Thr Cys
 1 5
 <210> 38
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> e3-4-30
 25 <400> 38
Cys Val Ser Thr Tyr Trp Lys Thr Cys
 1 5
 <210> 39
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 35 <223> cebador de secuenciación 96gIII
 <400> 39
 ccctcatagt tagcgtaacg 20
 <210> 40
 <211> 25
 40 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador mutante R1A
 <400> 40
 45 aggcagctc gcagagtgag aatag 25
 <210> 41
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 50 <223> cebador mutante K2A
 <400> 41
 catcaggcag cgccccgagag tgag 24
 <210> 42
 55 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador mutante L3A

<400> 42
 ggagcatcag ggccttccg agag 24
 <210> 43
 <211> 25
 5 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador mutante P4A
 <400> 43
 10 ccgggagcat cagccagctt ccgag 25
 <210> 44
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Artificial
 15 <220>
 <223> cebador mutante D5A
 <400> 44
 atccgggag cagcaggcag cttc 24
 <210> 45
 20 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador mutante P7A
 25 <400> 45
 gtatgcatcc cggcagcatc aggca 25
 <210> 46
 <211> 24
 <212> ADN
 30 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador mutante G8A
 <400> 46
 agtatgcatc gcgggagcat cagg 24
 35 <210> 47
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 40 <223> cebador mutante M9A
 <400> 47
 cccaagtat gcgcccggg agcatc 26
 <210> 48
 <211> 25
 45 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador mutante H10A
 <400> 48
 50 tccaccccaa gtagccatcc cggga 25
 <210> 49
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial
 55 <220>
 <223> cebador mutante T11A
 <400> 49
 tccaccccaa gcatgcatcc cgg 23
 <210> 50
 60 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador mutante W12A
 65 <400> 50
 aacctcacc cgcagtatgc atc 23

<210> 51
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Artificial
 5 <220>
 <223> cebador mutante delta7-12 F
 <400> 51
 ggaggatccg ccgaaactgt tgaaagttg 29
 <210> 52
 10 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador mutante delta7-12 R
 15 <400> 52
 gggggatcct ccaccagcat caggcagctt ccgag 35
 <210> 53
 <211> 35
 <212> ADN
 20 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador mutante K2Adelta7-12R
 <400> 53
 gggggatcct ccaccagcat caggcagcgc ccgag 35
 25 <210> 54
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 30 <223> Cebador mutante de inserción de Ala
 <400> 54
 agcatcaggc agctccgtg cagagtgaga atagaaagg 39
 <210> 55
 <211> 21
 35 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador
 <400> 55
 40 tatgcgcaa cttccgatg c 21
 <210> 56
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial
 45 <220>
 <223> cebador
 <400> 56
 tagcatccgg aagttgcg c a 21

REIVINDICACIONES

1. Péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 1.
- 5 2. Péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 2.
3. Péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 3.
- 10 4. Péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos mostrada en una cualquiera de SEQ ID NO: 5 y 8 a 15.
5. Péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 que 4, que está químicamente modificado.
- 15 6. Complejo de titanio-péptido, en el que el péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 está unido a titanio.
7. Proteína artificial que es un conjugado del péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, con un péptido funcional o una proteína funcional.
- 20 8. Proteína artificial según la reivindicación 7, en la que el péptido funcional o la proteína funcional es un péptido o una proteína que coopera con el péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 para formar una estructura cristalina bidimensional mediante autoensamblaje.
- 25 9. Proteína artificial según la reivindicación 7, en la que el péptido funcional o la proteína funcional es un péptido o una proteína que comprende una secuencia peptídica que tiene una actividad de reconocimiento celular tal como actividad de adhesión celular.
10. Complejo de titanio-proteína artificial, en el que la proteína artificial según una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9 está unida a titanio.
- 30 11. Proteína quimérica que es un conjugado del péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, con una sustancia marcada, una etiqueta peptídica, o un compuesto no peptídico.
- 35 12. Complejo de titanio-proteína quimérica, en el que la proteína quimérica según la reivindicación 11 está unida a titanio.
13. Fago que expresa el péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 sobre la superficie de una partícula.
- 40 14. Complejo de titanio-fago, en el que el fago según la reivindicación 13 está unido a titanio.
15. Método para el refinamiento de una superficie de titanio o para formar una partícula de titanio, en el que se usa el péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
- 45 16. Método para el refinamiento de una superficie de titanio, para formar una partícula de titanio, o para alinear partículas de titanio, en el que se usa la proteína artificial según una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9.
17. Método para el refinamiento de una superficie de titanio o para formar una partícula de titanio, en el que se usa la proteína quimérica según la reivindicación 11.
- 50 18. Método para alinear titanio o para formar una partícula de titanio, en el que se usa el fago según la reivindicación 13.
- 55 19. Material de implante que comprende el complejo de titanio-proteína artificial según la reivindicación 10 como principio activo.
20. Complejo de plata-péptido, en el que el péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 está unido a plata.
- 60 21. Complejo de plata-proteína artificial, en el que la proteína artificial según una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9 está unida a plata.
22. Complejo de plata-proteína quimérica, en el que la proteína quimérica según la reivindicación 11 está unida a plata.
- 65 23. Complejo de plata-fago, en el que el fago según la reivindicación 13 está unido a plata.

24. Método para el refinamiento de una superficie de plata o para formar una partícula de plata, en el que se usa el péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
- 5 25. Método para el refinamiento de una superficie de plata, para formar una partícula de plata o para alinear plata, en el que se usa la proteína artificial según una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9.
26. Método para el refinamiento de una superficie de plata o formar una partícula de plata, en el que se usa la proteína quimérica según la reivindicación 11.
- 10 27. Método para formar una partícula de plata o para alinear plata, en el que se usa el fago según la reivindicación 13.
28. Complejo de silicio-péptido, en el que el péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 está unido a silicio.
- 15 29. Complejo de silicio-proteína artificial, en el que la proteína artificial según una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9 está unida a silicio.
- 20 30. Complejo de silicio-proteína quimérica, en el que la proteína quimérica según la reivindicación 11 está unida a silicio.
31. Complejo de silicio-fago, en el que el fago según la reivindicación 13 está unido a silicio.
- 25 32. Método para el refinamiento de una superficie de silicio o para formar una partícula de silicio, en el que se usa el péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
33. Método para el refinamiento de una superficie de silicio, para formar una partícula de silicio, o para alinear silicio, en el que se usa la proteína artificial según una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9.
- 30 34. Método para el refinamiento de una superficie de silicio o para formar una partícula de silicio, en el que se usa la proteína quimérica según la reivindicación 11.
- 35 35. Método para formar una partícula de silicio o para alinear silicio, en el que se usa el fago según la reivindicación 13.
36. Método para usar el péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 como una sonda de microscopio de fuerza atómica (MFA).

Fig. 1

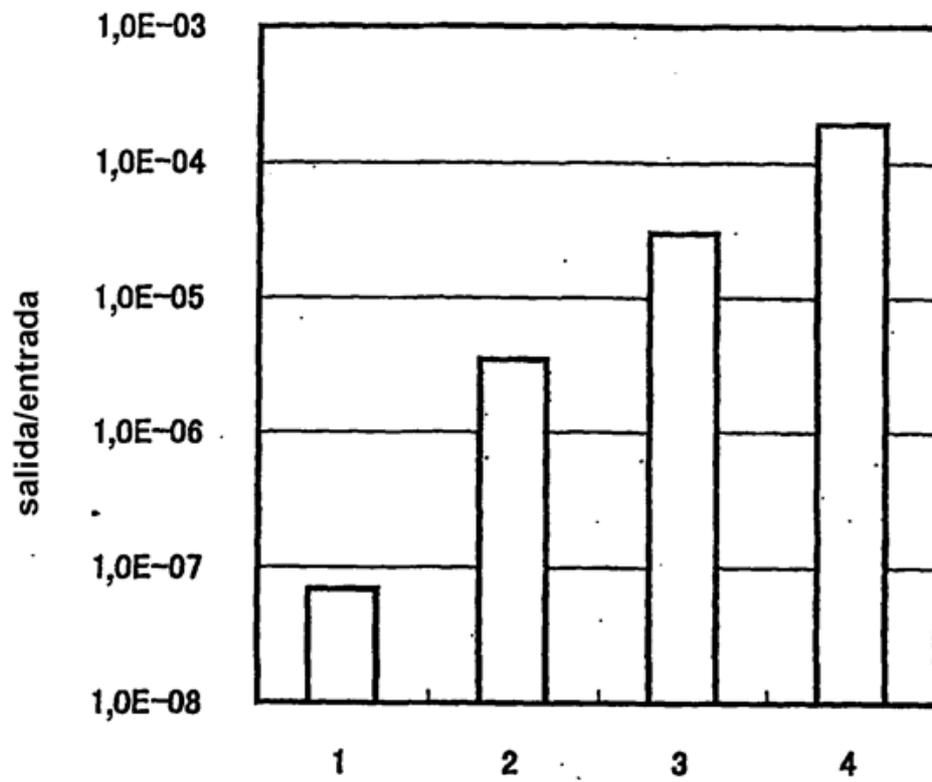


Fig. 2

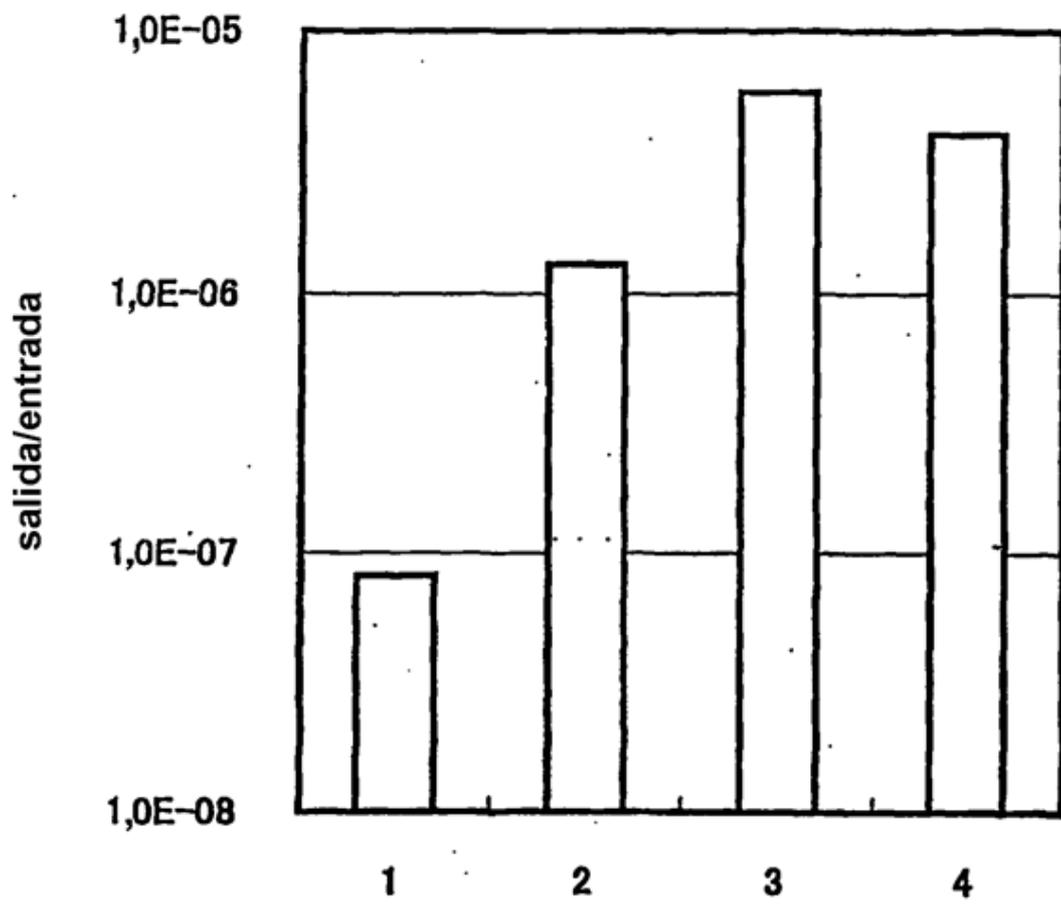


Fig. 3

e3-2-2 LDTTNVSGPMSS
e3-2-3 RKLPDAPGMHTW
e3-2-4 RKLPDAPGMHTW
e3-2-5 SYRLPVYLLHALL
e3-2-6 RKLPDAPGMHTW
e3-2-7 RKLPDAPGMHTW
e3-2-8 SDPNQDWRRTTP
e3-2-9 RKLPDAPGMHTW
e3-2-10 RKLPDAPGMHTW
e3-2-12 LPSQLLSQVNL
e3-2-13 RKLPDAPGMHTW
e3-2-14 RKLPDAPGMHTW
e3-2-15 RKLPDAPGMHTW
e3-2-16 RKLPDAPGMHTW
e3-2-17 RKLPDAPGMHTW
e3-2-18 RKLPDAPGMHTW
e3-2-19 LCANNTTSVHPP
e3-2-20 RKLPDAPGMHTW
e3-2-21 MQMEGKPTLTLR
e3-2-22 RKLPDAPGMHTW
e3-2-23 RKLPDAPGMHTW
e3-2-25 RKLPDAPGMHTW
e3-2-29 STLKNPINLLAN
e3-2-30 RKLPDAPGMHTW
e3-2-31 RKLPDAPGMHTW
e3-2-33 RKLPDAPGMHTW
e3-2-34 RKLPDAPGMHTW
e3-2-36 RKLPDAPGMHTW
e3-2-39 RKLPDAPGMHTW
e3-2-40 RKLPDAPGMHTW
e3-2-41 RKLPDAPGMHTW
e3-2-42 RKLPDAPGMHTW
e3-2-43 SCHVWYDSCSSP
e3-2-45 RKLPDAPGMHTW
e3-2-46 RKLPDAPGMHTW
e3-2-47 RKLPDAPGMHTW
e3-2-48 RKLPDAPGMHTW
e3-2-49 RKLPDAPGMHTW
e3-2-50 STLKNPINLLAN
e3-2-51 RKLPDAPGMHTW
e3-2-52 RKLPDAPGMHTW
e3-2-55 QDMIRTSALMLQ
e3-2-56 RKLPDAPGMHTW

Fig. 4

e3-4-2 CTSPTSVDK
e3-4-3 CTPSPHQGC
e3-4-4 CHTAPLPRC
e3-4-5 CTPSPHQGC
e3-4-6 CHGATPQNC
e3-4-7 CSGHNPTHK
e3-4-8 CTSPTSVDK
e3-4-9 CTPSPHQGC
e3-4-11 CPMWQAQQK
e3-4-12 CGYYSMSHK
e3-4-13 CDMLTPRSC
e3-4-15 CTSPTSVDK
e3-4-16 CLRLQSQDK
e3-4-17 CQITWHHTK
e3-4-19 CTPSPHQGC
e3-4-21 CSAHHHDKK
e3-4-22 CTPSPHQGC
e3-4-23 CMTKNPLNK
e3-4-24 CTPSPHQGC
e3-4-25 CTPSPHQGC
e3-4-26 CTPSPHQGC
e3-4-27 CTSPTSVDK
e3-4-28 CMTKNPLNK
e3-4-29 CKTSLPTTK
e3-4-30 CVSTYWKTG
e3-4-31 CTSPTSVDK
e3-4-32 CTSPTSVDK

Fig. 5

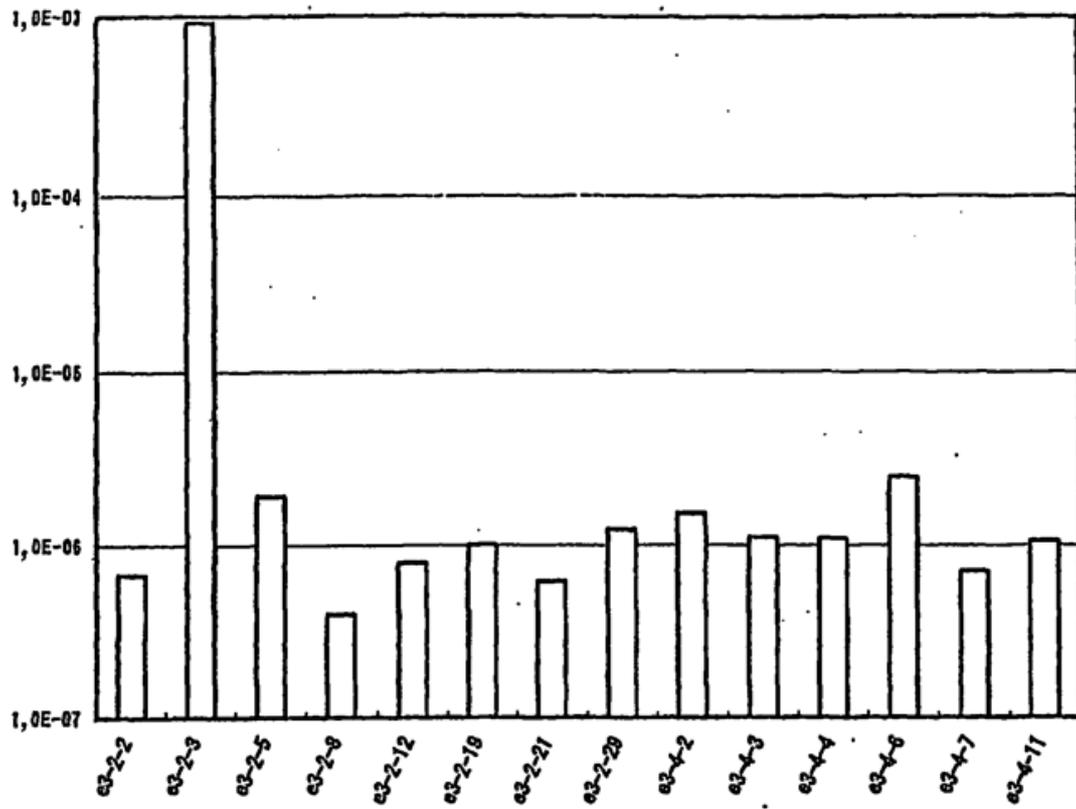
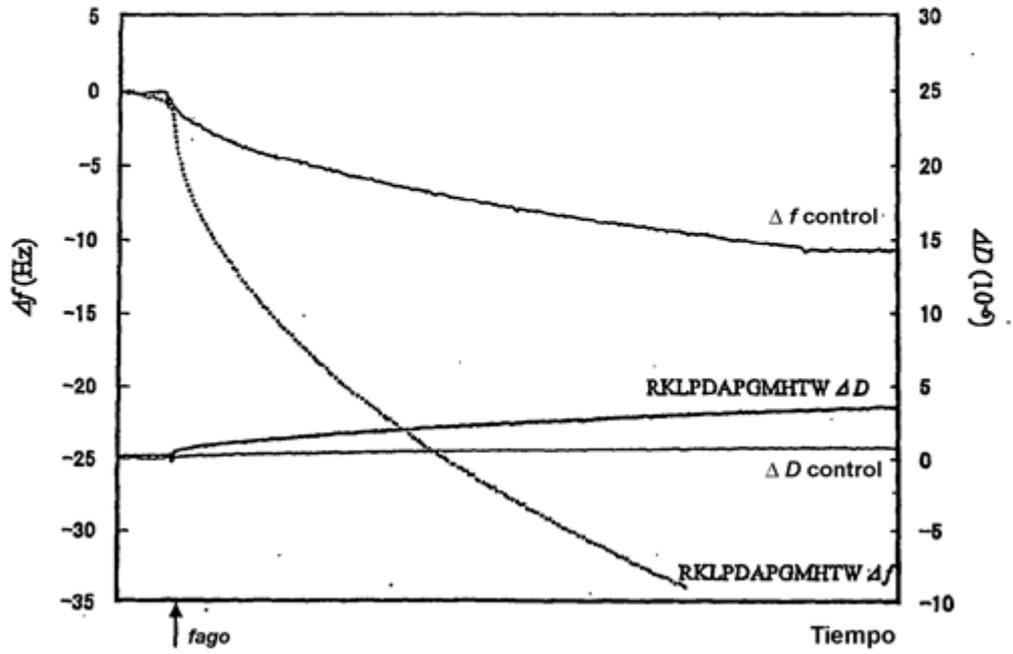


Fig. 6

A: Sin bloqueo



B: Bloqueo con BSA

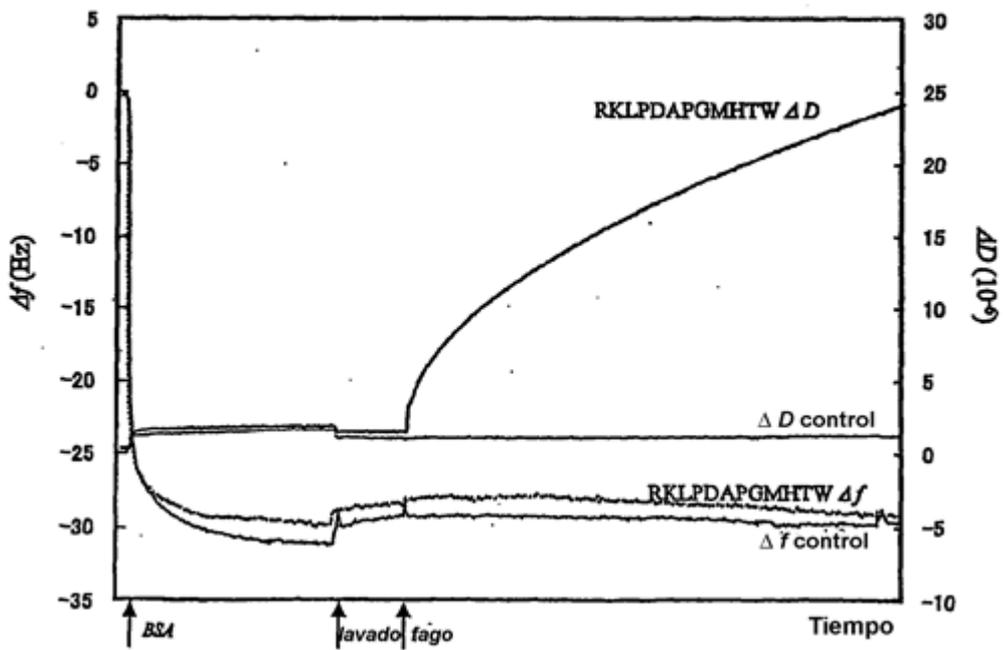


Fig. 7

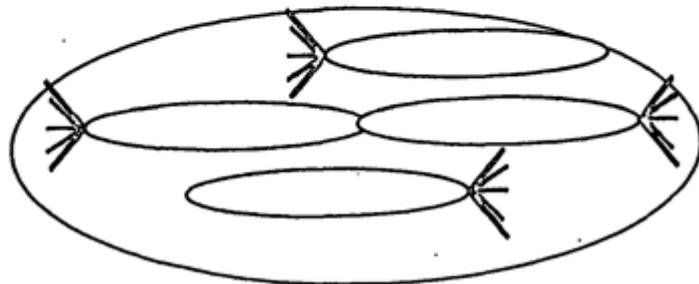
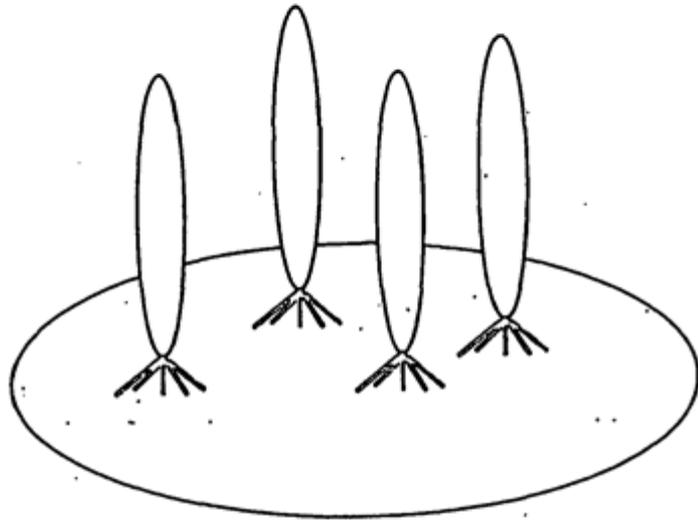


Fig. 8

R1A: AGGCAGCTTCGCAGAGTGAGAATAG

K2A: CATCAGGCAGCGCCCGAGAGTGAG

L3A: GGAGCATCAGGCGCCTTCCGAGAG

P4A: CCGGGAGCATCAGCCAGCTTCCGAG

D5A: ATCCCGGGAGCAGCAGGCAGCTTC

P7A: GTATGCATCCCGGCAGCATCAGGCA

G8A: AGTATGCATCGCGGGAGCATCAGG

M9A: CCCCAAGTATGCGCCCCGGGAGCATC

H10A: TCCACCCCAAGTAGCCATCCCGGGA

T11A: TCCACCCCAAGCATGCATCCCGG

W12A: AACCTCCACCCGCAGTATGCATC

Δ 7-12F; GGAGGATCCGCCGAAACTGTTGAAAGTTG

Δ 7-12R; GGGGGATCCTCCACCAGCATCAGGCAGCTTCCGAG

K2A Δ 7-12R; GGGGGATCCTCCACCAGCATCAGGCAGCGCCCGAG

Inserto de Ala; AGCATCAGGCAGCTTCCGTGCAGAGTGAGAATAGAAAGG

Fig. 9

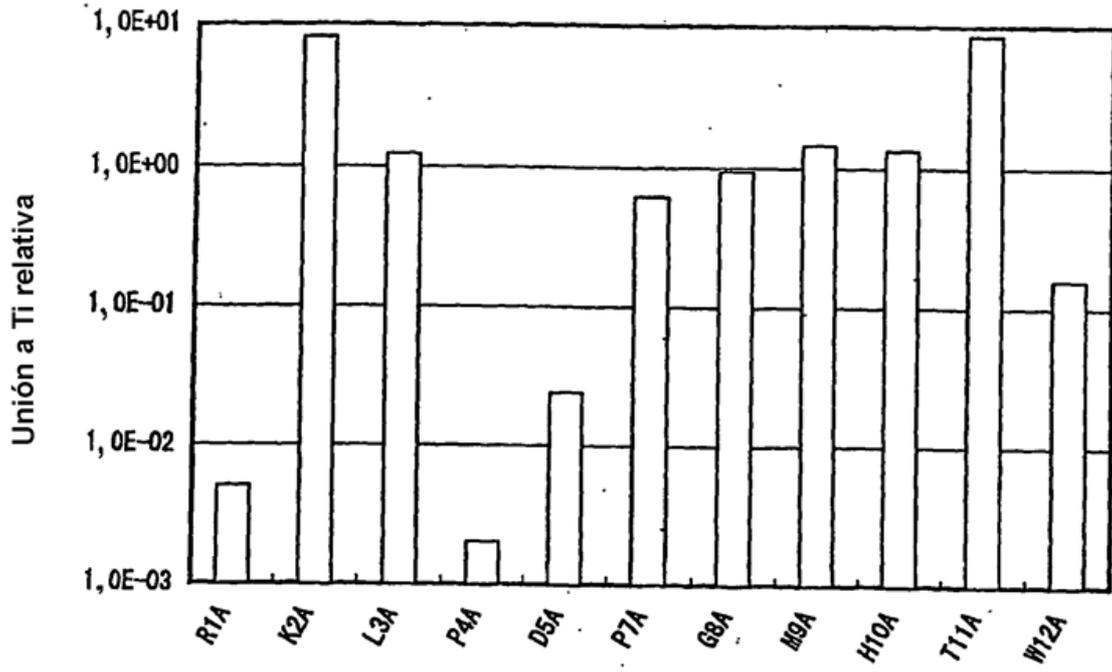


Fig. 10

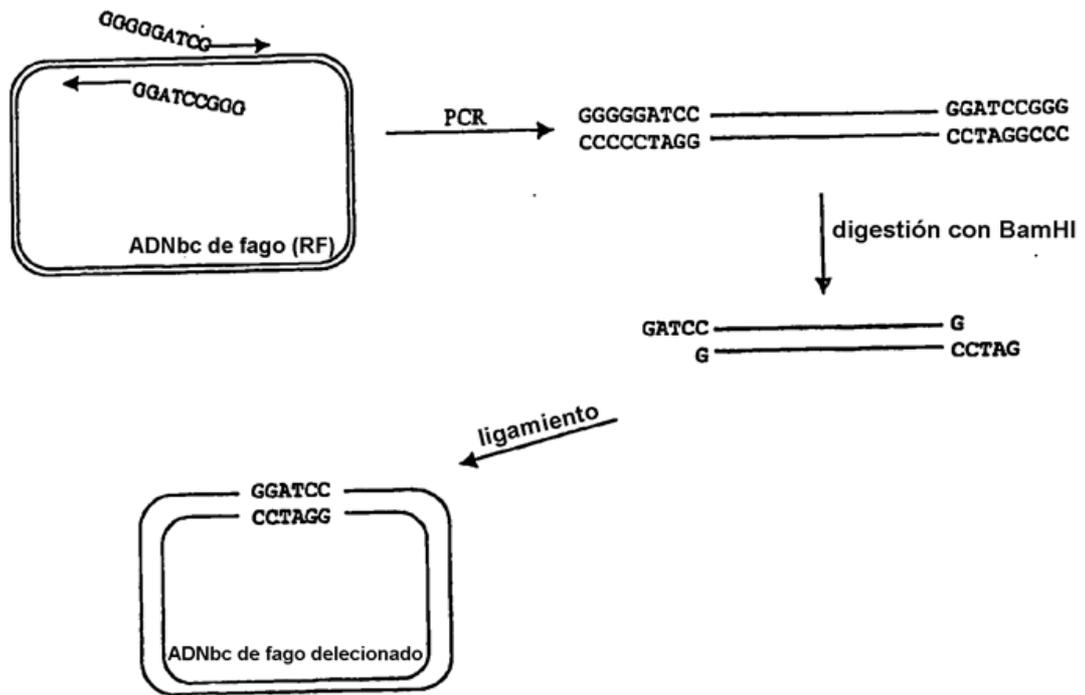


Fig. 11

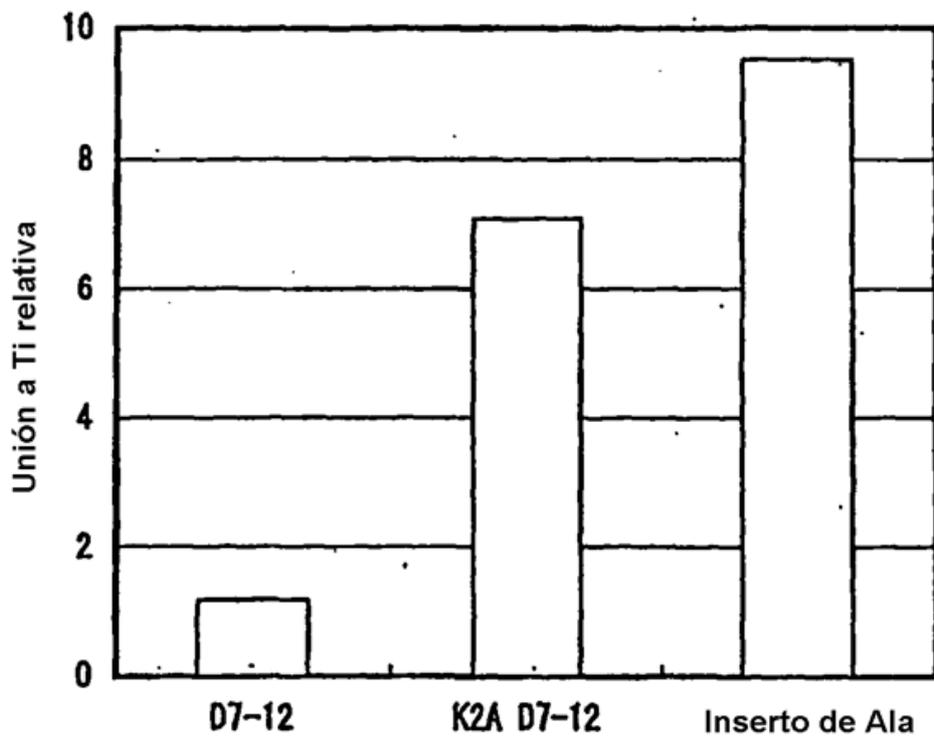


Fig. 12

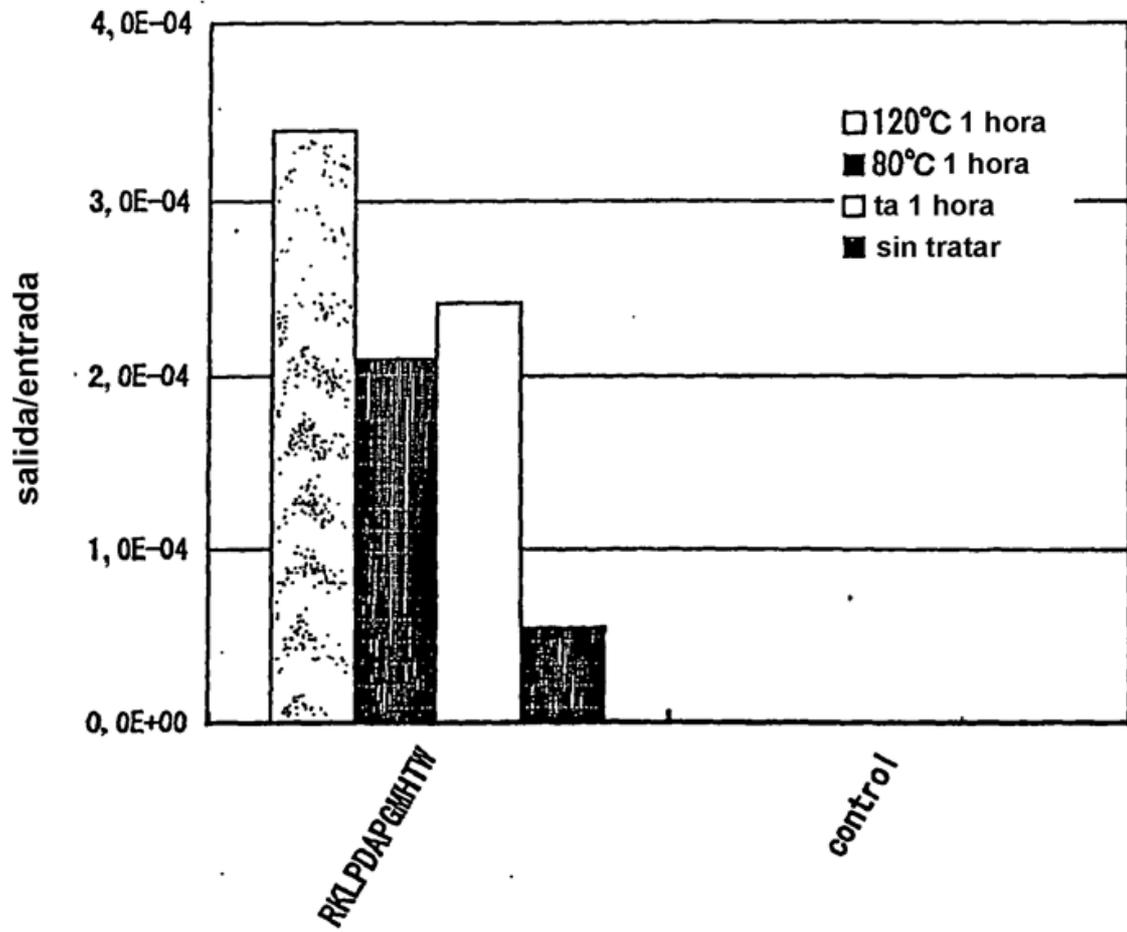


Fig. 13

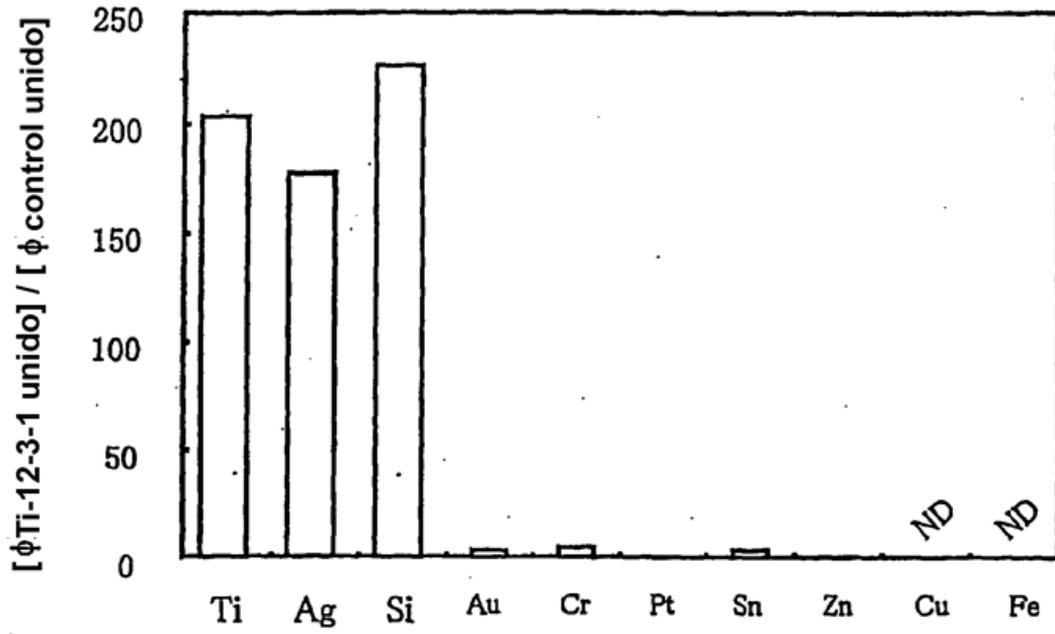


Fig. 14

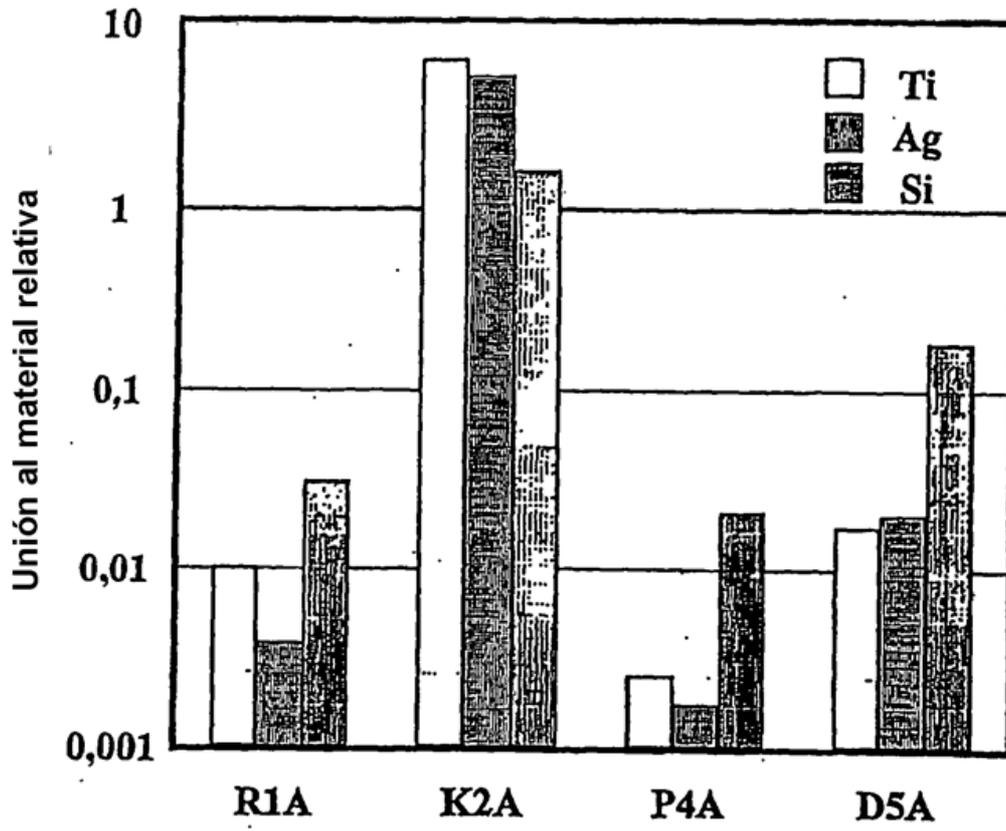


Fig. 15

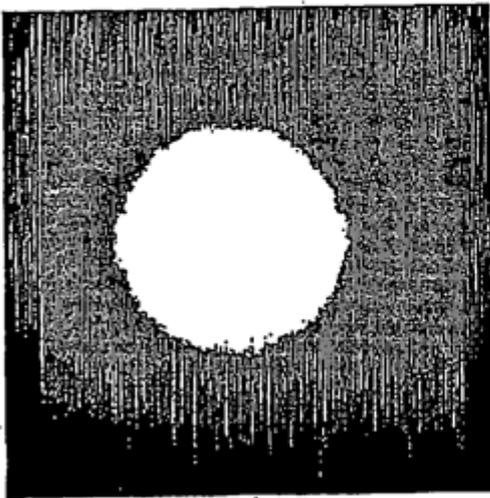
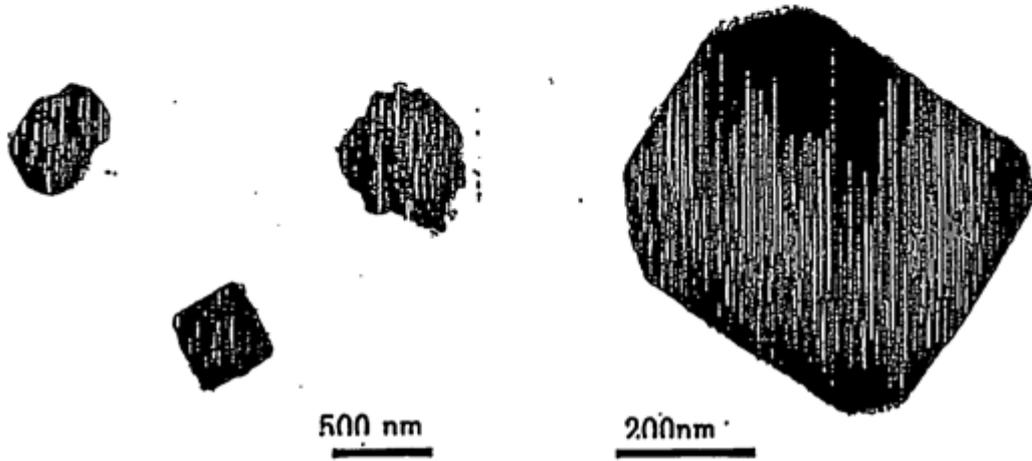


Fig. 16

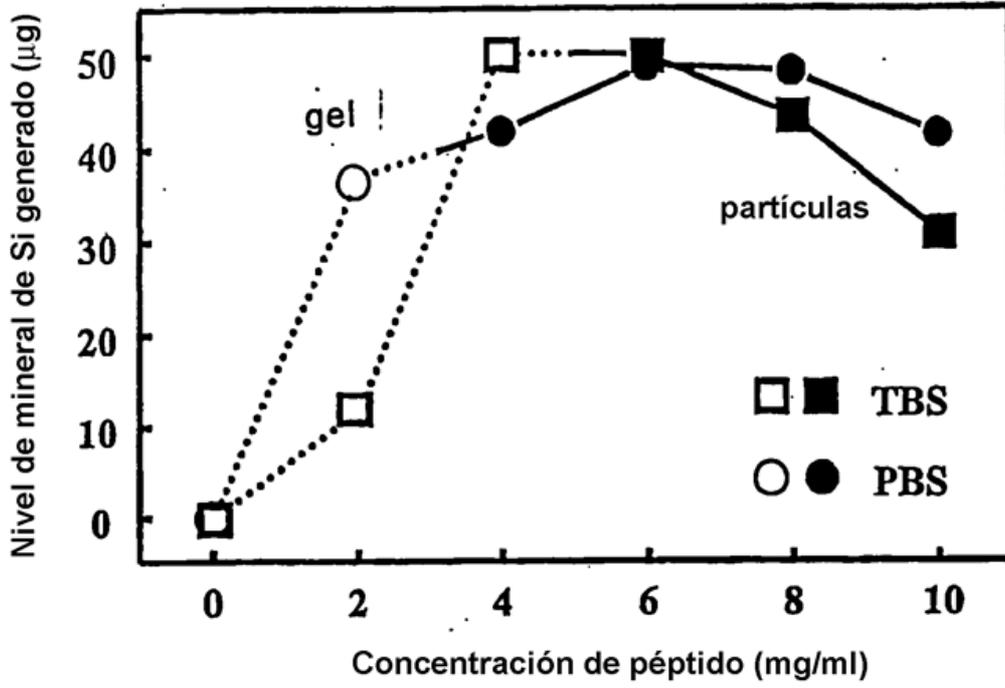


Fig. 17

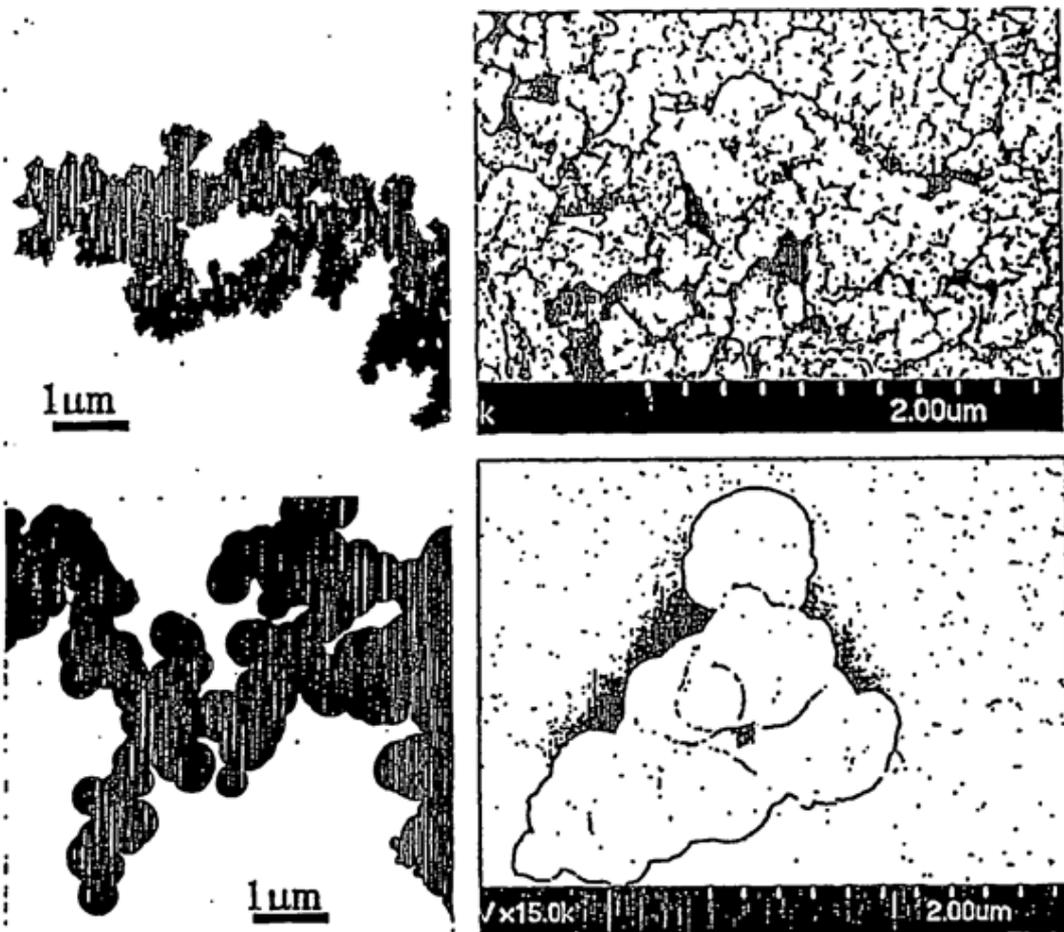


Fig. 18

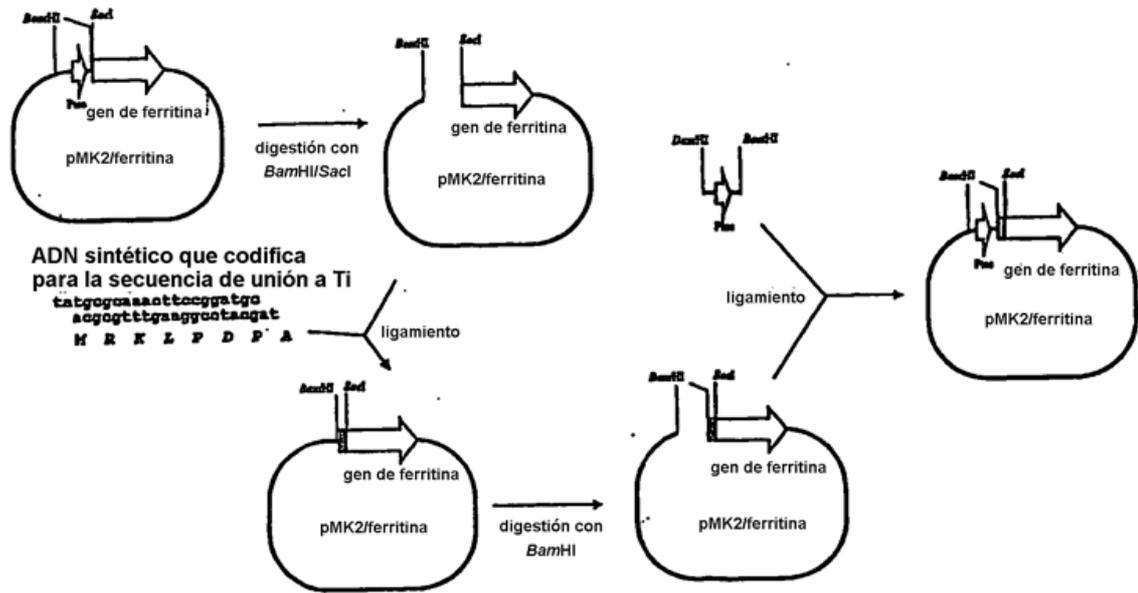


Fig. 19

