

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



Т3

1 Número de publicación: 2 543 162

51 Int. CI.:	
C07K 14/14	(2006.01)
C07K 14/47	(2006.01)
C12N 15/62	(2006.01)
C12N 5/10	(2006.01)
C07K 16/18	(2006.01)

(12)	TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA			
96 Fecha de presentación y núme	ro de la solicitud europea:	01.07.2004	E 04767541 (8)	
(97) Fecha y número de publicación	n de la concesión europea:	27.05.2015	EP 1641815	

54 Título: Péptidos quelantes del uranio y sus aplicaciones

30 Prioridad:	Titular/es:		
04.07.2003 FR 0308211	COMMISSARIAT À L'ÉNERGIE ATOMIQUE ET		
(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente: 17.08.2015	Bâtiment "Le Ponant D" 25, rue Leblanc 75015 Paris, FR		
	72 Inventor/es:		
	VITA, CLAUDIO; LE CLAINCHE, LOÏC y MONJARDET, VÉRONIQUE		
	74) Agente/Representante:		
	DURÁN MOYA, Carlos		

ES 2 543 162 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

Péptidos quelantes del uranio y sus aplicaciones

- 5 La presente invención se refiere a péptidos quelantes del uranio, así como a sus aplicaciones para la descontaminación de suelo y aguas, y también para la detección y tratamiento de personas contaminadas por uranio.
- El uranio se encuentra normalmente presente en el medio ambiente en concentraciones muy reducidas, en forma de isótopos 238 (99,27%) y 235 (0,72%) que se descomponen por emisión de partículas alfa de baja toxicidad radiológica; la forma uranilo (UO2²⁺) representa la forma más común del uranio en una atmósfera que contiene oxígeno.
- No obstante, en ciertos sitios específicos, tales como cerca de las minas de minerales de uranio, de sitios de almacenamiento (control nuclear o almacenamiento de municiones con uranio empobrecido) o bien en el caso de accidente nuclear, la concentración de este metal puede ser mucho más elevada y representa un peligro para el hombre, por el hecho de su acumulación en los riñones y en los huesos, toxicidad para los tejidos renales y desarrollo de cánceres de tejidos óseos.
- La descontaminación de los lugares y de las personas contaminadas requiere disponer, por una parte, medios para neutralizar la toxicidad del uranio en el medio ambiente y en los organismos de los individuos contaminados y, por otra parte, reactivos de detección, eficaces y específicos para este metal. No obstante, no existen en la actualidad medios eficaces de detección y de descontaminación del uranio, en especial por la ausencia de ligandos específicos del uranio, capaces de detectar el uranio (sensor) y de quelar este metal tóxico que podría encontrarse presente en un entorno y/o en un medio biológico contaminado, con la finalidad de realizar su descontaminación.
- un entorno y/o en un medio biologico contaminado, con la finalidad de realizar su descontaminación.

El tratamiento actual de descontaminación de suelo se realiza principalmente por excavación, recogida y almacenamiento en lugares apropiados o por extracción del uranio con ayuda de agentes quelantes; estos tratamientos físico-químicos son caros, poco específicos o no específicos y poco adaptados al tratamiento de

- 30 superficies contaminadas muy extensas y presentan además un riesgo de contaminación elevado para los operarios, por el hecho de una exposición repetida al uranio. De modo alternativo, se ha propuesto utilizar organismos vivos (microorganismos o vegetales superiores) para descontaminar los suelos y las aguas contaminadas por uranio. Este procedimiento se basa en la absorción de los metales y, por lo tanto, en su secuestro por estos organismos. Por ejemplo, ciertos vegetales son capaces de absorber los metales tóxicos por las raíces y acumularlos en las hojas,
- 35 que son recogidas a continuación y almacenadas en lugares apropiados; los organismos actualmente disponibles no permiten una descontaminación eficaz de suelos y aguas contaminadas por su débil capacidad de extracción, de tolerancia y de acumulación de concentraciones elevadas de metales tóxicos.

La detección del uranio en las personas susceptibles de haber sido contaminadas por uranio se realiza ex situ por 40 espectrometría de masas de plasma (ICP-MS); esta técnica es pesada de realizar y onerosa.

El tratamiento de las personas contaminadas por uranio se efectúa por administración de agentes quelantes que ligan el uranio, favoreciendo de esta manera su excreción y reduciendo, como consecuencia, su depósito en los riñones y los huesos. Entre los principales agentes quelantes del uranio se pueden citar: el acido dietilen triamina pentacético (DTPA), el ácido 5-aminosalicílico (5-AS), el ácido gálico, el sulfocatecol, el carboxicatecol y la hidroxipiridinona; presentando estos agentes quelantes el inconveniente de no ser específicos del uranio.

Se han desarrollado diferentes enfoques para detectar de manera específica algunos metales, en especial en medio acuoso o en muestras biológicas:

50

45

- sensores químicos fluorescentes (Tsien, 1993: Fluorescent chemosensors for ión and molecule recognition, páginas 130-146, Czarnik AW (ed), American Chemical Society, Washington DC); estos sensores fluorescentes son específicos del sodio, el potasio, el calcio y del magnesio; por el contrario, ningún sensor químico específico del uranio ha sido descrito.

55

60

- sensores peptídicos fluorescentes (biosensores) constituidos por un péptido de 26 aminoácidos, aproximadamente derivado de un dominio en dedo de zinc o "Zinc finger domain", marcado, como mínimo, por un grupo fluorescente (Walkup y otros, 1996, J. Am. Soc., 119, 3443-3450; Godwin y otros, 1998, J. Am. Soc., 118, 6514-6515; Walkup y otros, 1997, J. Am. Soc., 119, 3443-3540). En presencia de iones de zinc, estos biosensores peptídicos se estructuran alrededor del metal y exponen el grupo fluorescente a cambios de entorno que se traducen por una variación de emisión de fluorescencia que es función de la concentración del metal. De manera alternativa, cuando los péptidos están conjugados a dos grupos fluorescentes apropiados, el enlace del zinc al péptido comporta una modificación de conformación favorable a una transferencia eficaz de energía entre los dos fluoréscente (Fluorescencia Resonance Energy Transfer ou FRET), resultando en la emisión de una señal fluorescente

65 proporcional a la concentración del metal (Walkup y otros, 1996, cita anterior). Por el hecho de la estructura del dominio en "dedo de zinc" que está adaptada a la quelación de iones con geometría tetraédrica, como el zinc, estos

biosensores no permiten la quelación del uranio, que en su forma de uranilo (UO₂²⁺), la más corriente en medio oxigenado, presenta una geometría bipiramidal de base pentagonal o hexagonal con un número de coordinación de 7-8 (uranio VI).

- 5 sensores proteicos fluorescentes, denominados ("camaleones"), constituidos por una proteína de fusión que comprende sucesivamente desde su extremo NH₂ hacia su extremo COOH: un mutante azul o ciánico (EBFP o ECFP, donante de fluorescencia) de la proteína fluorescente GFP derivada de la medusa Aequorea victoria, la calmodulina (CaM), que comprende los dominios terminales N y C y los sitios I y II de fijación del ión calcio, un péptido de 26 residuos que se enlaza a la calmodulina y que es derivado del dominio que enlaza la calmodulina de
- 10 una quinasa de la cadena ligera de la miosina (MLCK), y otro mutante verde o amarillo de la misma proteína fluorescente (EGFP o EYFP, aceptador de fluorescencia), (Miyawaki y otros, Nature, 1997, 388, 882-887). El enlace del calcio a la calmodulina provoca un cambio de conformación en la proteína de fusión, que forma un nuevo sitio al cual se fija el péptido y que produce una asociación entre las dos proteínas fluorescentes y un posicionamiento en el espacio favorable a una transferencia eficaz de energía del donante (EBFP o ECFP) hacia el aceptador de
- 15 fluorescencia (EGFP o EYFP), produciendo de esta manera un aumento de la fluorescencia emitida por el aceptador de fluorescencia (EGFP o EYFP). Otros indicadores fluorescentes "camaleones" más sensibles y específicos para una gama de concentraciones de calcio más amplia han sido igualmente obtenidos (Truong y otros, Nature Struct. Biol., 2001, 8, 1069-1073). Este sistema de indicador fluorescente que se basa en las variaciones de conformación inducidas por el enlace del calcio al complejo calmodulina-MLCKp es específico del calcio y no permite, por lo tanto, detectar otros iones metálicos, tal como, por ejemplo, el uranilo.
- ligando peptídicos selectivos de metales pesados, derivados de motivos hélice-bucle-hélice (Borin y otros, Biopolymer, 1989, 28, 353-369; Dadlez y otros, FEBS Lett., 1991, 282, 143, 146; Marsden y otros, Biochem. Cell. Biol., 1990, 68, 587-601; Shaw y otros, Science, 1990, 249, 280-283; Reid y otros, Arch. Biochem. Biophys., 1995, 323, 115-119; Procyshyn y otros, J. Biol. Chem., 1994, 269, 1641-1647); estos péptidos presentan una débil estructuración de sus hélices en medios acuosos, así como reducidas afinidades para los metales bivalentes (Kd del orden milimolar).
- bacterias que contienen un promotor que puede traducir la presencia de un metal tóxico en una señal luminosa
 (Bechor y otros Biotechnol., 2002, 94, 125-132; Lee y otros, Biosen. Bioelectron., 2003, 18, 571-577); en estos sistemas, el tóxico actúa como factor de estrés celular e induce por esta razón una expresión alterada de una proteína bioluminiscente, que representa la señal detectada; estos sistemas no son, por lo tanto, específicos del uranio y de los metales tóxicos en general.
- 35 Se han sintetizados péptidos correspondientes al sitio I de la calmodulina. La mutación del residuo de ácido glutámico del bucle de coordinación del calcio (E31D) suprime la afinidad por el calcio pero conserva la afinidad para los lantánidos que muestran que la selectividad para los metales puede ser modulada por mutaciones específicas (Le Clainche y otros, J. Biol. Inorg. Chem., 2003, 8, 334-340).
- 40 Resulta de lo anterior que no existen actualmente ligandos específicos del uranio, capaces de detectar (sensor) y quelar este metal tóxico que podría encontrarse presente en un entorno y/o un medio biológico contaminado, con la finalidad de realizar su descontaminación. El quelado específico del uranio en el entorno (suelo, agua...) y en el organismo vivo es, no obstante, difícil de realizar, a causa de la presencia de un gran exceso de otros metales, tales como los metales alcalinotérreos o los lantánidos, que son competidores para la fijación del uranio.
 - Como consecuencia, los inventores se han puesto como meta proporcionar un agente capaz de quelar específicamente el uranio (VI), en forma de uranilo (UO₂²⁺).
- Con una masa de 16,7 kDa, la calmodulina es ubiquitaria en las células eucariotas y juega un papel importante en la traducción de la señal entre diferentes compartimientos celulares mediado por variaciones de la concentración de calcio. Como respuesta a un aumento de la concentración intracelular del calcio, sufre un cambio de conformación que le permite ligar y activar diversas dianas proteicas celulares. Este cambio estructural es similar al que se observa para la troponina C y es esencial en la contracción muscular. La estructura, según rayos X, se ha resuelto y muestra que la proteína presenta dos dominios terminales N- y C-, comprendiendo cada uno dos sitios de fijación del
- 55 ión calcio del tipo hélice-bucle-hélice, motivo estructural más común para la quelación del calcio, presente en otras numerosas proteínas que ligan el calcio, tal como, por ejemplo, la proteína C y la parvalbúmina. La estructura de este motivo se conserva notablemente en todas las proteínas: un bucle de 12 aminoácidos está enmarcado por dos hélices alfa; el bucle coordina el metal a través de los residuos de ácido aspártico y glutámico y también por un grupo carbonilo del esqueleto peptídico y por una molécula de agua. La estructura detallada del sitio I de la
- 60 calmodulina de Paramecium tetraurelia (figura 1) muestra que el calcio se encuentra en una geometría de bipirámide de base pentagonal; las distancias Ca-O se sitúan entre 2,1 y 2,3 Å y las constantes de disociación son del orden de 10 mM para los sitios I y II de baja afinidad, y de 1 mM para los sitios III y IV de alta afinidad. La cooperación entre estos sitios ha sido demostrada: el enlace del calcio en los sitios I y II aumenta fuertemente la afinidad en los sitios III y IV. La secuencia del bucle quelante está muy conservada en la calmodulina. De hecho, el hombre y la mayor parte
- 65 de los vertebrados tienen la misma secuencia en este bucle.

A partir de la secuencia del motivo hélice-bucle-hélice de los sitios de fijación del calcio de la calmodulina de Paramecium tetraurelia, los inventores han preparado péptidos mutantes que poseen las propiedades siguientes:

presenta, en forma de péptido aislado y en presencia de filtros metales, una conformación ordenada compatible
 con una estructura hélice-bucle-hélice, y

 ligan, en forma de péptido aislado o de proteína, que incluye, como mínimo, una secuencia de dicho péptido, de manera selectiva el uranio en su forma de uranilo con una afinidad elevada (Kd del orden de mM), y lo mismo en presencia de otros metales, de tampones variados o de otros iones fisiológicos o naturales, que poseen características de coordinación próximas a las del uranio.

Dichos péptidos y las proteínas que incluyen una o varias de estas secuencias peptídicas tienen aplicaciones en:

la producción de nuevas bacterias y de nuevas especies vegetales modificadas que expresan proteínas
 enriquecidas en esta secuencia peptídica dotadas de capacidad aumentada de fijación, de absorción y de acumulación de este metal tóxico, útiles para la descontaminación biológica de suelos y fluidos contaminados por uranio,

- fabricación de nuevos sensores fluorescentes peptídicos y proteicos de uranio, útiles para la detección específica del uranio especialmente en individuos susceptibles de estar contaminados,

- producción de nuevos microorganismos modificados que utilizan el péptido específico del uranio o la proteína calmodulina, incluyendo de uno a cuatros lugares selectivos del uranio como elemento sensible para traducir la presencia del uranio en una señal luminosa, y

25

20

10

- la formulación de nuevos medicamentos para el tratamiento de las personas contaminadas por el uranio.

Como consecuencia, la presente invención tiene por objeto un péptido mutante del sitio I de fijación del calcio de la calmodulina definido por una de las secuencias siguientes: SEQ ID NO: 4, 5, 6, 7, 9, 10 y 12.

30

El péptido de la invención se caracteriza porque posee una estructura del tipo hélice-bucle-hélice que comprende, como mínimo, una mutación a nivel del bucle del motivo hélice-bucle-hélice. Las mutaciones de los péptidos de la invención se muestran en la tabla I:

- 35 D24T (péptido CaM-M10c; SEQ ID NO: 12)
 - D20T y D24T (péptido CaM-M3c; SEQ ID NO: 4)
 - D20S y D24S (péptido CaM-M7c; SEQ ID NO: 9)
 - D20T y D22T (péptido CaM-M6c; SEQ ID NO: 7)
 - D22T y D24T (péptido CaM-M5c; SEQ ID NO: 6)
- 40 D20N, D22N y D24N (péptido CaM-M4c; SEQ ID NO: 5)
- D20T, D22T y D24T (péptido CaM-M8c; SEQ ID NO: 10).
- De acuerdo con la invención, para obtener un complejo de coordinación en el que el uranilo tiene un número de coordinación de 7 (geométrica bipiramidal de base pentagonal o hexagonal), de modo que se facilite al uranilo, además de dos átomos de oxígeno en posición apical, 5 ó 6 átomos coordinantes situados en las cuatro vértices de la "base cuadrada" de la bipirámide, siendo modificado el péptido según la invención con respecto al péptido natural correspondiente para que el número natural de residuos de ácidos carboxílicos presentes en el bucle (D20, D22 y D24, E31) disminuya de manera tal que sea inferior a 4, sustituyendo, como mínimo, el residuo 24 o dos de los otros residuos por uno o dos residuos neutros.
- 50

Salvo indicación de lo contrario, las posiciones de las mutaciones se han indicado haciendo referencia a la secuencia de la calmodulina humana (SWISSPROT P02593).

De acuerdo con la presente invención, dicho bucle es el del sitio I de fijación del calcio de la calmodulina definido por la secuencia de 12 aminoácidos, situada en las posiciones 20 a 31, con referencia a la secuencia humana (SWISSPROT P02593).

Dicho péptido deriva totalmente de la calmodulina, comprendiendo las secuencias de las hélices adyacentes a dicho bucle que se encuentran presentes al sitio I de enlace del calcio, a saber, las secuencias correspondientes a las situadas en las posiciones 7 a 19 y 29 a 38, con referencia a la secuencia humana (SWISSPROT P02593).

Dicho péptido deriva totalmente del sitio I de la calmodulina y posee las mutaciones F19C y V35C; poseyendo ciertos péptidos cíclicos, tales mutaciones y después de fijación de ciertos metales presentan, de manera ventajosa, una estructura ordenada del tipo hélice-bucle-hélice cuando adoptan forma de péptidos aislados.

65

60

Dicho péptido incluye igualmente la mutación T26Y, una mutación del residuo T26 en un residuo de aminoácido

fluorescente, sensible a las variaciones del entorno químico inducidas por la fijación del uranilo, estando situados dicho residuo por las hélices por una distancia inferior a 20 Å del sitio de fijación del uranilo.

- Según otra forma de realización ventajosa de dicho péptido, es conjugado con, como mínimo, un fluoróforo apropiado, tal como el dansilo, la cumarina, la fluoresceína y los derivados Alexa a nivel de un residuo de aminoácido apropiado, por ejemplo, a nivel de las posiciones 15 y 16 sensibles a las variaciones de conformación y de entorno químico inducidas por la fijación del uranilo a dicho péptido marcado por un fluoróforo.
- Según otra forma de realización ventajosa de dicho péptido, este está acoplado a dos fluoróforos diferentes, respectivamente, un donante de fluorescencia y un aceptador de fluorescencia, en posiciones que inducen variaciones de conformaciones favorables a una transferencia de energía del donante hacia el aceptador de fluorescencia (aproximación de los fluoróforos), cuando tiene lugar la fijación del uranilo a dicho péptido marcado por dos fluoróforos.
- 15 Entre los fluoróforos se pueden utilizar proteínas fluorescentes, en especial GFP y sus mutantes (EBFP, ECFP, EYFP, EGFP), así como otras moléculas fluorescentes derivadas de organismos marinos como, por ejemplo, el DsRed, proteína fluorescente roja del coral tropical Dixosoma (Bowen B. y otros, Photochem. Photobiol., 2003, 77, 4, 362-369), el CopGFP una proteína fluorescente verde (green monomeric GFP-like protein) (proteína monomérica verde similar a GFP), distribuida especialmente por Evrogen (www.evrogen.com) o el PhiYFP una proteína fluorescente protein) distribuida especialmente por Evrogen (www.evrogen.com).

Según otro modo adicional de realización ventajoso de dicho péptido, está asociado por cualquier medio apropiado a moléculas que permiten establecer diana en el riñón y/o en los huesos, por ejemplo, de las moléculas scFv específicas de los factores de crecimiento específicos o de los péptidos específicos.

25

30

Según otra forma de realización ventajosa de dicho péptido, este está asociado, por cualquier medio apropiado, a moléculas que favorecen su excreción in vivo, por ejemplo, a moléculas de polietilen glicol.

La presente invención tiene igualmente por objetivo un polipéptido caracterizado por comprender la concatenación de, como mínimo, dos péptidos idénticos o diferentes, tal como los que se han definido anteriormente.

Estos polipéptidos aumentan la afinidad para el uranio, por la cooperación entre los diferentes sitios de enlace.

- La presente invención tiene igualmente por objeto una composición peptídica, caracterizada por comprender un polipéptido, tal como se ha definido anteriormente, que comprende la concatenación de, como mínimo, dos péptidos idénticos o diferentes, tal como los definidos anteriormente, asociados entre sí por cualquier medio apropiado y, como mínimo, un vehículo conveniente.
- La presente invención tiene igualmente por objeto una proteína de fusión caracterizada por que está constituida por 40 la fusión en fase de la secuencia de, como mínimo, un péptido, tal como el definido anteriormente con la secuencia de una proteína apropiada.

De acuerdo con la invención, dicho péptido es fusionado a nivel de un sitio permisivo de dicha proteína, es decir, a nivel de una región de esta proteína que, cuando es fusionada en la secuencia de, como mínimo, un péptido según la invención, confiere a dicha proteína de fusión una afinidad y una especificidad por el uranio VI, del orden de la del péptido aislado.

Entre las proteínas apropiadas, se pueden citar las proteínas que poseen un motivo hélice-bucle-hélice, capaces de fijar el calcio, en especial la calmodulina y las proteínas procedentes de las anteriores, en especial los sensores "camaleones" según el principio descrito en las obras anteriormente citadas de Miyaki y otros y Truong y otros.

Por ejemplo, cuando dicha proteína es la calmodulina o una proteína camaleón derivada ella, la secuencia de dicho péptido es insertada en sustitución y en el sitio de la secuencia correspondiente en la calmodulina, a saber, en el sitio del bucle o del motivo hélice-bucle-hélice nativos (sin mutar).

55

60

65

45

50

Según una forma de realización ventajosa de dicha proteína de fusión, está conjugada, por cualquier medio apropiado a, como mínimo, a un fluoróforo, tal como se ha definido anteriormente. Preferentemente, uno de los extremos de dicha proteína está acoplado a un donante de fluorescencia y el otro extremo está acoplado a un aceptador de fluorescencia. De manera preferente, dicha proteína comprende en uno de sus extremos, la secuencia EBFP o ECFP y en el otro extremo la secuencia de EGFP o de EYFP.

Los péptidos, polipéptidos y las proteínas fluorescentes, tal como se han definido anteriormente, que presentan actividad elevada y especificidad para el uranio, representan sensores fluorescentes específicos del uranio VI útiles para la detección y la osificación del uranio en suelos y aguas contaminadas, así como en una muestra biológica apropiada, en especial una muestra de fluido corporal procedente de un individuo susceptible de estar contaminado por uranio.

Como consecuencia, la presente invención tiene igualmente por objeto la utilización de un péptido, de un polipéptido o de una proteína de fusión, tales como los que se han definido anteriormente, para la preparación de un reactivo destinado a la detección de los suelos y aguas contaminadas por uranio, así como para el diagnóstico de individuos contaminados por uranio. Preferentemente, dichos péptidos y dichas proteínas de fusión están conjugados, como mínimo, a un fluoróforo, tal como se ha definido anteriormente.

La presente invención tiene igualmente por objeto la utilización de un péptido, de un polipéptido o una proteína de fusión, tales como los definidos anteriormente, para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de los individuos contaminados por uranio.

De acuerdo con dichas utilizaciones, dichas proteínas capaces de ligar el calcio son en especial la troponina C o la parvalbúmina. En estos casos, el péptido utilizado corresponde o bien a la proteína completa, o bien contiene mutaciones de, como mínimo, un residuo de cada hélice en un residuo de cisteína, de manera que se obtenga un péptido cíclico que presenta una estructura ordenada de tipo hélice-bucle-hélice.

Los péptidos, según la invención, son preparados por las técnicas clásicas de síntesis en fase solida o líquida, conocidas por los técnicos en la materia. Las proteínas según la invención son preparadas por las técnicas de ADN recombinante, conocidas por el técnico en la materia.

- Como consecuencia, la presente invención tiene igualmente por objeto una molécula de ácido nucléico aislada, caracterizada por comprender una secuencia que codifica para un péptido, un polipéptido o una proteína de fusión, tales como los que se han definido anteriormente.
- 25 Las moléculas de ácido nucléico según la invención, son obtenidas por métodos clásicos, conocidos en sí mismos, siguiendo los protocolos estándar, tales como los descritos en Current Protocols in Molecular Biology (Frederick M. AUSUBEL, 2000, Wiley and son Inc, Library of Congress, USA).
- Las secuencias que codifican para un péptido, un polipéptido o una proteína según la invención pueden ser 30 obtenidas por amplificación de una secuencia nucleica por PCR o RT-PCR o bien por cribado de bancos de ADN genómico por hibridación con una sonda homóloga. Por ejemplo, se amplifican por PCR con ayuda de un par de cebos apropiados tales como se han definido anteriormente.
- La presente invención tiene igualmente por objeto un vector recombinante eucariota o procariota, caracterizado 35 porque comprende un inserto constituido por una molécula de ácido nucléico que modifica para un péptido, un polipéptido o una proteína de fusión, tales como los que se han definido anteriormente. Se conocen numerosos vectores en los que se puede insertar una molécula de ácido nucléico de interés con la finalidad de introducirla y mantenerla en una célula huésped eucariota o procariota, dependiendo la elección de un vector apropiado de la utilización prevista para este vector (por ejemplo, replicación de la secuencia de interés, expresión de esta secuencia, mantenimiento de la secuencia bajo una forma extracromosómica o bien integración en el material
- cromosómico del huésped), así como la naturaleza de la célula huésped. Por ejemplo, se pueden utilizar vectores virales o no virales como plásmidos.
- Preferentemente, dicho vector recombinante es un vector de expresión, en el que dicha molécula de ácido nucléico o uno de sus fragmentos son situados bajo el control de elementos reguladores de la transcripción y de la traducción apropiados. Además, dicho vector puede comprender secuencias (etiquetas o tag) fusionadas en fase con el extremo 5' y/o 3' de dicho inserto, útiles para la inmovilización, y/o la detección y/o la purificación de la proteína de fusión, del péptido o del polipéptido expresados a partir de dicho vector.
- 50 Estos vectores son construidos e introducidos en células huésped por los procedimientos clásicos de ADN recombinante y de ingeniería genética, que son conocidos en sí mismos.

La presente invención tiene igualmente por objetivo células eucariotas o procariotas modificadas por un vector recombinante, tal como se ha definido anteriormente.

55

5

10

15

20

La presente invención tiene igualmente por objetivo un organismo animal de no humano transgénico, caracterizado por comprender células modificadas por una molécula de ácido nucléico, tal como se ha definido anteriormente.

La presente invención tiene igualmente por objetivo una planta transgénica, caracterizada por comprender células modificadas por una moléculas de ácido nucléico, tal como se ha definido anteriormente.

Las células procariotas o eucariotas modificadas por una molécula de ácido nucléico, tal como se ha definido anteriormente y las plantas transgénicas, tales como se han definido anteriormente, que expresan proteínas enriquecidas y la secuencia peptídica según la invención, son dotadas de capacidad incrementada de fijación, de absorción y de acumulación del uranio; por lo tanto, son útiles para la descontaminación de suelos y de líquidos contaminados por uranio.

65

Como consecuencia, la presente invención tiene igualmente por objetivo la utilización de las células procariotas o eucariotas modificadas por una molécula de ácido nucléico, tal como se ha definido anteriormente y plantas transgénicas, tales como las definidas anteriormente para la descontaminación de suelos y aguas contaminadas por uranio.

Las células transformadas, tales como las definidas anteriormente, son igualmente útiles, en especial para la producción del péptido, del polipéptido o de la proteína de fusión, tal como se ha definido anteriormente.

- 10 La presente invención tiene igualmente pro objetivo un kit para la detección de una contaminación por uranio, caracterizado por comprender, como mínimo: un péptido, un polipéptido o una proteína de fusión, tales como los que se han definido anteriormente.
- Además de las disposiciones anteriores, la invención comprende todavía otras disposiciones que resultarán de la 15 descripción siguiente, que se refieren a ejemplos de realización de los antígenos y anticuerpos, según la presente invención, así como a la tabla I que resume las secuencias de la Solicitud en el que los residuos de la calmodulina que han sido mutados se han indicado en negrita y se han subrayado, haciendo referencia a los dibujos adjuntos, en los que:
- 20 - la figura 1 muestra en alzado la estructura tridimensional del sitio I de la calmodulina de Paramecium tetraurelia y la coordinación de un ión calcio; en la parte baja se muestran residuos que coordinan el calcio en los cuatro sitios,

- la figura 2 muestra secuencias de péptidos derivados del sitio I de la calmodulina que han sido estudiados,

- la figura 3 muestra los espectros de dicroísmo circular de una solución 50 mM del péptido cíclico CaM1c en presencia de iones calcio en MES 10 mM (pH 6,5), añadidos a concentraciones iguales a 0, 0,2, 0,5, 1,0, 2,0, 5,0, 20 equivalentes,
- 25

30

5

- la figura 4 muestra las variaciones de la intensidad del dicroísmo circular en 222 nm del péptido CaM-M1c, en función de la concentración molar de calcio y su adaptación a la curva de isoterma de enlace,

- la figura 5 muestra las variaciones de la intensidad de fluorescencia al máximo de emisión en función de la concentración molar de los iones Terbio (en 545 nm) y Europio (en 618 nm), añadidos al péptido CaM-M1c. Las curvas representan las isotermas de enlace adaptadas a los puntos experimentales.

- la figura 6 representa el diagrama de especiación del uranio (VI) a una concentración de 1 mM,

- la figura 7 es una representación esquemática del uranilo en el bucle coordinante de la calmodulina mutada (péptido CaM-M3c), obtenida a partir de la estructura tridimensional del bucle de la calmodulina (código PDB:1EXR), - la figura 8 muestra los espectros dicroicos de una solución del péptido CaM-M3c 20 mM en tampón MES 1 mM, en 35 presencia de 8 equivalentes de diversos metales,

- la figura 9 muestra los espectros de fluorescencia correspondientes a la titulación por el péptido CaM-M3c, de una solución 2,0 mM de nitrato de uranilo en agua a pH 6,5,

- la figura 10 muestra los espectros de fluorescencia correspondientes a la titulación por el péptido CaM-M3c, de una solución 2,0 mM de nitrato de uranilo en tampón fosfato 1 mM, pH 6,5,

40 - la figura 11 muestra la variación de la intensidad de emisión de fluorescencia (a 520 nm) de una solución 2,0 mM de nitrato de uranilo en tampón fosfato 1,0 mM, en función de la cantidad de péptido CaM-M3c y su adaptación con la ecuación relativa de isoterma de enlace,

- la figura 12 muestra la distribución de fluorescencia de soluciones de nitrato de uranilo 20,0, 2,0 y 0,2 mM en presencia de iones metálicos de calcio 2,0 mM, magnesio 2,0 mM y sodio 0,4 mM (y de tampón fosfato 1,0 mM), en 45 función de la cantidad de péptido CaM-M3c. Esta experiencia favorece la titulación del uranio presente como

contaminante en un agua de fuente, - la figura 13 muestra los espectros de titulación por la proteína calmodulina de una solución 2,0 mM de nitrato de

uranilo en tampón fosfato 1,0 mM (pH 6,5),

- la figura 14 muestra la titulación por SLRT de una solución de nitrato de uranilo 0.4 mM en un tampón fosfato 1.0 50 mM (pH 7,0) por una solución de calmodulina (0 a 8 mM), y posterior titulación de la mezcla final por calcio (de 0 a 8 mM). Cada punto representa el valor de la intensidad referida al máximo del espectro del ión uranilo libre en solución

corregida por las variaciones de la intensidad del LASER. - la figura 15 muestra los espectros de fluorescencia del péptido ligando de la calmodulina en ausencia de la proteína (curva de trazos), en presencia de 1 equivalente de calmodulina (curva continua), con calcio (curva de

- trazos v puntos) o de uranio (curva de puntos), 55 - la figura 16 muestra la simulación la simulación de los puntos experimentales obtenidos en la experiencia de titulación de una solución de uranilo 0,4 mM por la calmodulina, utilizando el programa logiciel Dynafit. Se han propuesto cuatro simulaciones al programa teniendo en cuenta de 1 a 4 sitios de alta afinidad para el uranio por molécula de proteína. Solamente se ha representado la curva correspondiente a 2 sitios, puesto que solo ella 60 conduce una simulación correcta de la experiencia, y
- la figura 17 corresponde a la simulación de los puntos experimentales obtenidos en la experiencia de competición entre calcio y uranilo para la calmodulina, obtenida por el programa Dynafit, teniendo en cuenta que cada monómero de proteína calmodulina contiene dos sitios independientes uno de otro.

Nº de identificación	Secuencia	Denominación
SEQ ID NO:1	EQIAEFKEAFALFDKDGDGTITTKELGTVMRSL	CaM
SEQ ID NO:2	EQIAEFKEAFALCDKDGDGYITTKELGTCMRSL	CaM-M1c
SEQ ID NO: 3	EQIAEFKEAFALCDKDGDGYITTKDLGTCMRSL	CaM-M2c
SEQ ID NO: 4	EQIAEFKEAFALCTKDGTGYITTKELGTCMRSL	CaM-M3c
SEQ ID NO: 5	EQIAEFKEAFALCNKNGNGYITTKELGTCMRSL	CaM-M4c
SEQ ID NO: 6	EQIAEFKEAFALCDKTGTGYITTKELGTCMRSL	CaM-M5c
SEQ ID NO : 7	EQIAEFKEAFALCTKTGDGYITTKELGTCMRSL	CaM-M6c
SEQ ID NO: 8	RRKWQKTGHAVRAIGRL	MLCKp
SEQ ID NO :9	EQIAEFKEAFALCSKDGSGYITTKELGTCMRSL	CaM-M7c
SEQ ID NO :10	EQIAEFKEAFALCTKTGTGYITTKELGTCMRSL	CaM-M8c
SEQ ID NO:11	EQIAEFKEAFALCTKDGDGYITTKELGTCMRSL	CaM-M9c
SEQ ID NO: 12	EQIAEFKEAFALCDKDGTGYITTKELGTCMRSL	CaM-M10c

Tabla I: Lista de los péptidos estudiados en la Solicitud

Ejemplo I: Materiales y métodos

1) Síntesis peptídica

5

Los péptidos han sido sintetizados en fase sólida con un sintetizador automático de péptidos Applied Biosystems, mod. 433A, y en química Fmoc, que utiliza el grupo fluorenilmetiloxicarbonilo (Fmoc) para la protección temporal de la función α amínica de los aminoácidos. Los grupos protectores utilizados para las cadenas laterales de los aminoácidos han sido el tertio-butilo éter (tBu) para los residuos Ser, Thr y Tyr; tertio-butilo éster (OtBu) para Asp, Glu; tritilo (Trt) para Gin, Asn, Cys; tertio-butiloxicarbonilo (Boe) para Lys y 2,2,5,7,8-pentametilcroman-6-sulfonilo (Pmc) para Arg.

- 15 La reacción de acoplamiento ha sido efectuada en presencia de un exceso de 10 equivalentes de aminoácido (1 milimol) con respecto a la resina (0,1 milimol). Esta ha sido protegida inicialmente del grupo Fmoc por una solución de piperidina al 20%. La piperidina en exceso ha sido eliminada por lavado con N-metilpirrolidona (NMP). El seguimiento de la reacción de desprotección ha sido efectuado por detección de UV a 305 nm de los aductos de dibenzofulveno-piperidina. Paralelamente, el aminoácido ha sido disuelto en una mezcla constituida por 1 ml de
- 20 NMP u por 1 ml de una solución de 1 M de 1-N-hidroxi-7-azabenzotriazol (HOAt) en NMP. Entonces, se ha añadido una solución de 1 ml de N,N'-diciclohexil-carbodiimida (DCC) 1 M en NMP para formar el éster activo del aminoácido. Después de 40 minutos, este éster activo ha sido introducido en el reactor que contiene la resina desprotegida.
- Al final de la síntesis, la resina ha sido lavada varias veces con diclorometano (DCM). El cribado del péptido y la desprotección de los grupos protectores de las cadenas laterales de los aminoácidos han sido efectuados en condiciones ácidas. La resina se ha puesto en suspensión (100 ml por gramo de resina) en una solución de 81,5 % de ácido trifluoroacético (TFA), 5% de fenol, 5% de tioanisol, 5% de agua, 2,5% de etanoditiol y 1% de triisopropilsilano durante tres horas con agitación, a temperatura ambiente. Después de filtrado sobre compactado, el medio de la reacción ha sido precipitado con éter diisopropílico, y después ha sido centrifugado. El residuo ha sido
- 30 medio de la reacción ha sido precipitado con eter diisopropilico, y después ha sido centrifugado. El residuo ha sido separado del sobrenadante y se ha disuelto en TFA. Después de re-precipitación con éter y centrifugación, el residuo ha sido disuelto nuevamente en ácido acético al 20% y después ha sido liofilizado.
- El producto de la reacción en bruto obtenido ha sido purificado una primera vez sobre columna preparatoria Vydac C18 fase inversa (1,0 x 25,0 cm) utilizando un gradiente 0-60% de acetonitrilo en 90 minutos. El péptido lineal puro ha sido liofilizado y después redisuelto en 200 ml de una solución de Tris 100 mM, pH 8,0. Un equivalente de ácido 5,5' ditiobis(2-nitrobenzoico) ha sido añadido para conducir a la formación específica del puente de bisulfuro intramolecular entre las dos cisteínas. Las fracciones de producto puro han sido reagrupadas y liofilizadas. La pureza del producto ha sido confirmada por espectrometría de masas "electroespray".
- 40

Se han preparado soluciones stock por disolución en agua, y las concentraciones han sido determinadas por espectrofotometría utilizando coeficientes de extinción molar de 1280 M⁻¹.cm⁻¹ para la tirosina, 120 M⁻¹.cm⁻¹ para el puente de bisulfuro y de 5690 M⁻¹.cm⁻¹ para el triptófano.

45 2) Metales

Todas las sales metálicas utilizadas son nitratos (>99,9% de pureza, Aldrich, Francia). Las soluciones madre son acidificadas con pH=2 con ácido nítrico para evitar la formación de hidróxidos.

50 <u>3) Fluorescencia</u>

Los espectros de fluorescencia son registrados sobre un espectrómetro Cary Eclipse (Varian, Francia) dotado de un

portacubeta termostático. La longitud de onda de excitación utilizada es de 280 nm con anchuras de ranura de 10 nm en excitación y de 2,5 nm en emisión. Los espectros son registrados entre 300 nm y 450 nm en una cubeta de 1 cm de trayectoria óptica.

5 <u>4) Espectrofluorometría Laser con Resolución Temporal (SLRT)</u>

Un láser Nd-YAG (modelo "minilite", CONTINUUM) funcionando a 266 nm y suministrando una energía de 1 mJ en pulsos de 4 ns con una frecuencia de 20 Hz ha sido utilizado como fuente de excitación. El haz ha sido dirigido a una cubeta de cuarzo de 4 ml, y después en la célula de medición del espectrofluorímetro "FLUO 2001" (Dilor, Francia) con ayuda de lentes de cuarzo. La luz ha sido concentrada entonces a la entrada de un policromatador, y la detección de señal se ha efectuado con la ayuda de una barra de 1024 fotodiodos enfriados por efecto Peltier (-30°C). El registro de los espectros se ha realizado integrando la señal detectada por los otros fotodiodos durante un tiempo de 0,5 s. Un circuito electrónico sincronizado con el láser ha permitido efectuar la detección después de un retardo de 90 ms con una duración de 50 ms. El conjunto ha sido controlado por un ordenador (DELL).

15

30

10

5) Espectrometría de masas de tipo electroespray (ESI-MS)

Los espectros de masa del tipo electroespray en modalidad de detección positiva han sido registrados con un aparato Q-TOF II (MICROMASS). La muestra ha analizar ha sido introducida en la fuente mediante un empujador de jeringa (HARVARD APPARATUS). El nitrógeno ha sido utilizado como gas de secado y de colisión con una fuente calentada a 80°C. la tensión de cono era de 30 Voltios, y se ha aplicado una alta tensión de 3500 kV al capilar. El caudal de solución muestra ha sido fijado en 5 mL.min⁻¹. Los espectros representan la media de 40 escaneados registrados entre 400 y 3000 m/z a una velocidad de escaneado de 6 s/scan.

25 <u>6) Dicroísmo circular (CD)</u>

Los espectros CD han sido registrados con un aparato CD6 (JOBIN YVON) dotado de un portacubeta termostático y controlado por ordenador utilizando un programa CDMax. Los compuestos han sido solubilizados con una concentración de 5 mM en un tampón MES 1mM a pH 6,5. Los espectros han sido registrados a temperatura ambiente entre 180 nm y 250 nm utilizando una cubeta de 0,1 mm de trayectoria óptica. Cada espectro representa la media de 4 acumulaciones sucesivas obtenidas con un tiempo de integración de 0,5 s y un paso de 0,5 nm. Los espectros han sido alisados utilizando el algoritmo en el programa CDMax.

Ejemplo 2: Preparación de péptidos cíclicos derivados del sitio I de la calmodulina, y análisis de la quelación de 35 metales pesados.

1) Preparación de péptidos cíclicos

- El péptido lineal de 33 residuos correspondiente al sitio I de la calmodulina (CaM: EQIAEFKEAFALFDKDGD-40 GTITTKELGTVMRSL, SEQ ID NO: 1) comprobado por dicroísmo circular, no presenta estructura ordenada alguna, incluso en presencia de un exceso de iones de calcio. Con una fuerte concentración (100 mM), se agrega en solución, probablemente en razón de las interacciones intermoleculares entre las partes hidrófobas de las hélices no estructuradas.
- 45 Como consecuencia, con la finalidad de evitar estas interacciones desfavorables en la formación de una estructura hélice-bucle-hélice nativa y estable, se han preparado péptidos que comprenden un puente de bisulfuro que liga las posiciones 13 y 29 de dicho péptido, correspondiente, respectivamente, a las posiciones 19 y 35 de la secuencia de la calmodulina. Como consecuencia, se han sintetizado péptidos que comprenden las mutaciones Phe19Cys y Va135Cys. Además, se ha insertado la mutación Thr26Tyr para permitir la introducción de una sonda fluorescente en el bucle coordinante, a efectos de seguir la fijación del metal. Además, el ácido glutámico en posición 25 del
- péptido o en posición 31 de la calmodulina ha sido eventualmente mutado en ácido aspártico (Glu31Asp).

Los péptidos sintetizados presentan las secuencias siguientes (figura 2 y Tabla I), en las que las mutaciones se han indicado en letras negritas:

55

CaM-M1c: EQIAEFKEAFAL DKDGDGYJTTKELGT MRSL (SEQ ID NO: 2) CaM-M2c: EQIAEFKEAFAL DKDGDGYITTKQLGT MRSL (SEQ ID NO: 3)

2) Análisis de la estructura y de la afinidad de los péptidos cíclicos para los metales pesados (péptidos CaM-60 M1c y CaM-M2c)

a) Péptido CaM-M1c

Se ha sintetizado el péptido CaM-M1c correspondiente y su afinidad con respecto a diferentes metales ha sido controlada por espectrometría de masas, dicroísmo circular (DC) y fluorescencia con resolución temporal (SLRT). Los espectros DC registrados en presencia de 8 equivalentes de metales muestran una buena afinidad para el calcio, el cadmio, el terbio, europio y uranio, así como afinidad más débil con el cobalto. No se ha detectado interacción alguna con los otros elementos de la columna de los alcalinotérreos (Mg, Sr, Ba).

El análisis por dicroísmo circular (DC) del péptido CaM1c muestra un espectro típico de una estructura desordenada
con un mínimo de 190 nm (figura 3). La ausencia de estructura secundaria ha sido confirmada por espectroscopio de resonancia magnética nuclear del protón (1H RMN). Por adición de calcio en solución, el espectro DC toma una forma que es típica de una conformación helicoidal con mínimos en 206 y 222 nm. La titulación de CaM1c por DC ha sido efectuada y la intensidad de la señal dicróica en 222 nm ha sido indicada en función de la concentración de iones calcio añadidos (figura 4). La curva de isotermas de enlace que pasa por los puntos experimentales, muestra una estequiometría 1/1 Ca/péptido y permite calcular una constante de disociación Kd de 30 mM.

El espectro de masas del péptido en ausencia del metal muestra tres picos principales en 736,8, 920,7 y 1227,3 m/z, que corresponden al péptido cinco, cuatro, y tres veces protonado, respectivamente. La introducción de concentraciones crecientes de calcio en el péptido lleva a la modificación de este espectro con nuevos picos en 744,7, 930,6, 1240,5 m/z, compatibles con un complejo de 1:1 péptido: calcio y presentando el mismo estado de carga. Suponiendo que el péptido libre de metal y el complejo tienen respuestas parecidas de señal, se puede calcular una constante de disociación, tal como se describe por Whittal y otros (Prat. Sci., 2000, 9, 332-343),

20 Se han utilizado frecuentemente iones lantánidos como modelos de calcio en los estudios biológicos de moléculas (Linse y otros, J. Biol. Chem., 1991, 266, 8050-8054). Se han llevado a cabo titulaciones de espectrofluorometría del péptido CaM-M1c (solución 20 mM en 10 mM de tampón MES, pH 6,5) por soluciones de terbio y europio por fluorescencia láser resuelta en el tiempo (SLRT) (figura 5). Esta espectroscopia se basa en una excitación del metal, seguida de la resolución temporal de la señal fluorescente, superando de esta manera las limitaciones debidas a la

conduciendo a un Kd = 30mM (Tabla II), de acuerdo con el valor calculado para la titulación DC.

- 25 presencia de los fluoróforos, cuya florescencia es de corta duración de vida pero de fuerte intensidad (Whittal y otros, antes citado). Utilizando una longitud de onda de excitación de 266 nm, se ha observado la emisión de fluorescencia de los dos lantánidos por un mecanismo de transferencia de energía con intermedio de la Tyr20 del péptido, con un aumento de la fluorescencia emitida del metal hasta un límite correspondiente a una relación lantánido: péptido de 1:1. Para el terbio, la emisión más fuerte está situada en 545 nm. En el caso del europio, el
- 30 espectro muestra máximos de emisión de fluorescencia en 593 y 618 nm. Las mediciones de intensidad de emisión de fluorescencia (545 nm para Tb3+ y 618 nm para Eu3+) en función de la concentración de lantánido y la adaptación de estos datos con la isoterma de enlace conducen a determinar las constantes de disociación Kd(Tb3+) = 3,5 μM y Kd(Eu3+) = 0,6. (Tabla II).
- En el caso de los iones uranilos, el estudio de la fijación de iones uranilos al péptido resulta difícil por la especiación compleja de este metal en el agua (figura 6). En efecto, a pH 6,5, el diagrama de especiación muestra que las especies mayoritarias son (UO₂)₃(OH)₅ + (67%) y (UO2)(OH)+ (17%). A este pH, queda solamente 5% de ión uranilo UO₂²⁺. El análisis del complejo formado con el péptido por espectrometría de masas muestra que el uranio está coordinado bajo la forma de UO₂²⁺. No obstante, todas las especies en solución. Este problema se vio resuelto por la SLRT, que se basa en el principio siguiente: después de una excitación por un impulso láser, la detección de la fluorescencia se lleva a cabo después de un retardo escogido por el utilizador; un retardo de 80 ms permite prescindir de todas las especies a parte UO₂OH⁺ para la detección. En estas condiciones instrumentales, utilizando una longitud de onda de excitación de 266 nm, se ha efectuado la titulación de una solución 2 mM de UO₂(NO₃)₂ por
- 45 adicións sucesivas de partes alícuotas de una solución acuosa del péptido. Esta experiencia ha permitido determinar una constante de disociación de Kd de 4,7 µM, Tabla II.

Metal	Ca(II)	Cd(II)	U*(VI)	Tb(III)	Eu(III)
Kd(mM)	30 □ 1 ^{a,c}	8 🗆 4 ^a	4,7 □ 0,6 ^b	1,5 □ 0,6 ^b	0,6 □ 0,2 ^b
a. Titulación por DC, b. Titulación por SLRT, c. Titulación por ESI/MS * La especie titulada es la entidad UO₂(OH) ⁺ .					

Tabla II: Constantes de disociación de los complejos formados con CaM-M1c en medios acuosos a pH 6,5

50

15

b) Péptido CaM-M2

55

Un segundo péptido que comprende una mutación adicional, a saber: la sustitución de ácido glutámico en posición 31 de la secuencia de la calmodulina en ácido aspártico (Glu31Asp), ha sido sintetizado igualmente. La cadena lateral del aminoácido es acortada en un grupo matilénico, y la cavidad formada por el bucle tiene, por lo tanto, una dimensión más importante. Los mismos estudios de ESI/MS, DC, SLRT muestran que este péptido pierde la afinidad para todos los metales bivalentes así como el ión uranilo. Solamente se conservan las afinidades para los lantánidos con constantes de disociación de 3,51 mM y 3,2 □ 0,8 mM para el Terbio y el Europio, respectivamente.

El conjunto de los resultados muestra que los péptidos cíclicos estudiados contienen las mutaciones Phe19Cys, Va 135Cys y Thr26Tyr y eventualmente la mutación Glu31Asp, y en las que las cisteínas 19 y 35 están conectadas por un puente de bisulfuro, presentando las propiedades siguientes:

5

- contrariamente al péptido lineal correspondiente en el sitio I de la calmodulina (péptido CaM) que no presenta estructura ordenada y se agrega en solución, los péptidos cíclicos sintetizados poseen una estructura estable de tipo hélice-bucle-hélice, y

- son capaces de ligar iones metálicos, entre ellos uranio VI (péptido CaM-M1c), con una afinidad comparable a la de
 10 la calmodulina nativa para el ión cálcico.

Estos resultados indican igualmente que las mutaciones puntuales de la secuencia del bucle del sitio I de la calmodulina permiten variar la afinidad relativa de los péptidos para diversos iones metálicos. No obstante, ninguno de los péptidos mutantes estudiados liga específicamente el uranio VI.

15

Ejemplo 3: Preparación de péptidos cíclicos específicos de uranio VI.

1) Síntesis de los péptidos

- 20 Los péptidos sintetizados correspondientes a los péptidos cíclicos que contienen las mutaciones Phe19Cys, Va135Cys y Thr26Tyr, tales como se han descrito en el Ejemplo 2, así como las mutaciones adicionales siguientes:
- D20T (péptido CaM-M9c) D24T (péptido CaM-M1Oc) D20T y D24T (péptido CaM-M3c) D20S y D24S (péptido CaM-M7c) D20T y D22T (péptido CaM-M6c) D22T y D24T (péptido CaM-M5c) D20N, D22N y D24N (péptido CaM-M4c) 30 D20T, D22T y D24T (péptido CaM-M8c)

De manera más precisa, las secuencias de estos péptidos en las que los residuos mutados se han indicado en negritas, se han representado en la figura 2 y en la Tabla I.

35 Se presenta en la figura 7 una representación esquemática del uranilo, en el bucle coordinante de la calmodulina modulada (péptido CaM-M3c), obtenida a partir de la estructura tridimensional del bucle de la calmodulina (código PDB: 1EXR).

2) Análisis de la afinidad de los péptidos para diferentes iones metálicos (péptidos CaM-M3c, CaM-M4c y CaM-M5c).

La afinidad del péptido CaM-M3c para diferentes iones metálicos (Ca²⁺, Mg²⁺, Ba²⁺, Sr²⁺, Tb³⁺, Eu³⁺, UO₂²⁺) ha sido comprobada utilizando dos procedimientos espectroscópicos: el dicroísmo circular (DC) y la espectrometría de masas electroespray (ESI-MS).

45

Los espectros DC y los espectros de masas electroespray en modalidad de detección positiva han sido registrados tal como se ha descrito en el ejemplo 1.

La figura 8 muestra que solamente la adición de un exceso de uranilo conduce a una modificación del espectro dicróico del péptido CaM-M3c. En este caso, se han observado dos nuevos mínimos en 207 nm y 222 nm. Son característicos de una estructura secundaria ordenada en hélice α. Este resultado es confirmado por el análisis ESI-MS: solo la adición de uranilo en solución conduce a la aparición de un pico de masa compatible con la formación de un complejo 1/1 péptido/UO₂.

55 Los péptidos CaM-M4c, CaM-M5c, CaM-M6c, CaM-M7c, CaM-M8c, CaM-M9c y CaM-M1Oc han proporcionado los mismos resultados en espectroscopia de dicroísmo circular y de masa (ESI-MS), lo que indica que estos péptidos no ligan el calcio, los lantánidos y otros iones comprobados, sino solamente con el uranio (VI).

3) Análisis de la coordinación del uranio por el péptido CaM-M3c

a) Problema a resolver (especiación)

El análisis de la coordinación del ión uranilo por una molécula biológica se prevé en un pH próximo al valor fisiológico, es decir, comprendido entre 6 y 8. No obstante, a este pH, el ión uranilo no se presenta en solución únicamente en una única forma UO2²⁺, sino en la forma de diferentes complejos derivados de este núcleo metálico: complejos hidroxos y carbonatos, por ejemplo. Este fenómeno está designado con el término de especiación. La

65

60

cantidad de cada una de las especies presentes en solución acuosa depende de la concentración del uranio, de la concentración de los gases disueltos (carbonatos), así como de los parámetros termodinámicos asociados al ión metálico. A una concentración de 1 mM de uranio, el diagrama de especiación (figura 6) muestra que las especies mayoritarias con pH 6,5 son las especies $(UO_2)_3(OH)_5^+$, $UO_2(OH)_2$ y $UO_2(OH)^+$ que representan respectivamente 52,1 ; 16 y 25,3% de U(VI) en solución. Las especies minoritarias son $UO_2^{2^+}$, $UO_2(OH)_3^-$ así como complejos de uranio/carbonatos.

En una experiencia de titulación por fluorescencia clásica, cada una de estas especies de uranio participa en la intensidad global de fluorescencia detectada después de excitación. El cálculo de una constante de disociación es, 10 por lo tanto, imposible, puesto que no se puede aislar la contribución de cada una de las especies presentes en solución. Por esta razón, las titulaciones han sido efectuadas utilizando la resolución temporal, es decir, la diferencia de tiempo debida de fluorescencia de cada una de las especies utilizadas, tal como se describe en el ejemplo 1. Utilizando un retraso superior o igual a 70 ms entre el láser (excitación) y la detección, la única especie detectada es el compleio monohidroxo $UO_2(OH)^+$.

15

5

b) Análisis de la coordinación del uranio por el péptido CaM-M3c en diferentes medios

b₁) Análisis de la coordinación del uranio en el agua

- 20 El uranio a 2 mM ha sido titulado por el péptido CaM-M3c en un medio acuoso puro, en el que el pH se ha ajustado a 6,5 con ayuda de amoniaco. Los parámetros de resolución temporal (70 ms de retraso, 100 ms de anchura de puerta, 0,5 s de integración) permiten no visualizar más que la especie monohidroxilada del uranio.
- Con la adición de cantidades crecientes de péptido en la solución de uranio, la intensidad de la fluorescencia de 25 UO₂(OH)⁺ disminuye demostrando la coordinación del metal al péptido. El gráfico de intensidad a 520 nm en función de la concentración en péptido añadido se puede simular por la expresión teórica correspondiente al equilibrio químico puesto en juego, teniendo en cuenta el hecho de que la concentración de $UO_2(OH)^+$ en solución es igual a 17,21% del U(VI) introducido. La constante de disociación correspondiente al equilibrio UO₂(OH) + CaM-M3c →+ $(CaM-M3c)(UO_2) + OH$ se calcula a partir de la simulación: Kd = 3,8 \Box 0,3 mM (figura 9).
- 30

35

b₂) Análisis de coordinación del uranio en medio de fosfato

En una segunda experiencia, se ha estudiado la guelación del uranio por el péptido en un medio tampón fosfato 1 mM, a pH 6,5. En este medio, el uranilo forma inicialmente complejos con los iones fosfato, cuyos datos termodinámicos son los siguientes:

$$PO_4^{3-}+UO_2^{2+}=UO_2PO_4^{-}$$
 $\log_{10}K = 13,7$

$$HPO_4^2 + OO_2^{22} - OO_2 HPO_4 = 10g_{10} K - 7,7$$

$$H_3PO_4 + UO_2^{2+} = UO_2H_2PO^{+}H^+$$
 $log_{10}K = 1,1$

Los complejos uranio/fosfato presentan la particularidad de aumentar la intensidad de fluorescencia del ión metálico, 40 mientras que los otros ligandos producidos conducen a una atenuación de la fluorescencia.

log K-77

Se han añadido sucesivamente fracciones de una solución acuosa del péptido a una solución de 2.0 mM de $UO_2(NO_3)_2$ en un tampón fosfato 1 mM a pH 6,5. El espectro de fluorescencia del ión uranilo (λ_{ex} = 266 nm) es registrado después de cada adición. El conjunto de los espectros obtenidos es representado en la figura 10.

45

El gráfico de intensidad a 520 nm en función de la concentración de uranio añadido se simula entonces por la isoterma de enlace correspondiente a la formación de un complejo 1/1 entre el uranio y el péptido, según la relación, deducida de la expresión de constante de disociación:

$$I_{0} - I = \frac{(I_{0} - I)_{\text{max}}}{4[U]_{0}} \left[4[U]_{0} + \frac{K_{d}}{[P]} - \sqrt{(4[U]_{0} + \frac{K_{d}}{[P]})^{2} - 16[U]_{0}^{2}} \right]$$
(1)

50

en la que [U]₀ = 2,0 mM, K_d es la constante de disociación del complejo, y [P] indica la cantidad de péptido añadida a la solución. Los datos experimentales, así como su interpretación por la ecuación (I) se han representado en la figura 11. La constante de disociación calculada para este enfoque es de 18 mM.

55

b₃) Análisis de la coordinación del uranio en presencia de otros iones

La coordinación del uranio por el péptido ha sido estudiada igualmente en presencia de una mezcla de otros iones. La composición del medio reactivo corresponde a la media de la composición en iones de varias aguas de fuentes de procedencia francesa, de las que se han retirado los iones carbonato que son inhibidores de la fluorescencia del uranilo. La composición exacta del medio comprobado es la siguiente:

5 [Ca²⁺]=[Mg²⁺]= 2,0 mM [Na⁺] = 0,4 mM [NO₃⁻] = [SO₄²⁻] = 4,0 mM pH = 6,5

10

Este medio está artificialmente contaminado por las concentraciones de uranio cada vez más débiles (20 mM, 2 mM, 0,2 mM). En cada uno de estos casos, el péptido es añadido hasta obtener la extinción total de la fluorescencia del uranio (figura 12).

- 15 Las constantes de disociación aparentes calculadas para cada una de estas titulaciones son de 10 □ 1 mM. Son del mismo orden de magnitud que la constante de disociación calculada en el agua desionizada a pH 6,5 y en tampón fosfato. Esto pone en evidencia la ausencia de competición entre U (VI) y los otros cationes metálicos por una parte, y entre el péptido y los otros ligandos del uranio por otra parte: el péptido CaM-M3c es, por lo tanto, selectivo del uranio en estas condiciones.
- 20

25

Los resultados obtenidos muestran que el péptido CaM-M3c que posee las mutaciones D20T y D24T es selectivo del uranio VI. En el dominio de concentración estudiado (0,1 mM a 2,0 mM en metales), el péptido CaM-M3c coordina el uranio con una constante de disociación entre 3,8 y 18 mM en los diferentes medios comprobados. No se ha detectado ninguna afinidad medible para Mg, Ca, Sr, Ba, Eu, Tb.

Ejemplo 4: Análisis de la interacción del uranio con la calmodulina nativa de cerebro bobino.

1) Análisis de la coordinación del uranio por la proteína calmodulina de ciervo de buey.

- 30 La coordinación del uranio (en forma de uranilo, 2,0 mM) por la proteína nativa en medio fosfato 1 mM se ha estudiado también. La formación de complejo del uranio con la proteína se traduce por una caída de la intensidad de fluorescencia del uranilo. Los espectros de titulación se han representado en la figura 13. En otra experiencia, se ha titulado una solución de nitrato de uranilo 0,4 mM en un tampón fosfato 1,0 mM (pH 7,0) por una solución de calmodulina hasta una concentración proteica de 8 mM. Después de añadir calmodulina 8 mM, se han añadido iones
- 35 calcio hasta una concentración de 8 mM (figura 14). Los valores de titulación del uranilo por la calmodulina han sido interpretados simulando los datos experimentales por un sistema de ecuaciones correspondiente a uno, dos, tres, o cuatro sitios independientes para el uranio (figura 16). Se ha utilizado el programa Dynafit (Kuzmic, P. 1996, Anal. Biochem. 237, 260-273) para estas simulaciones. Solamente el sistema que tiene en cuenta dos sitios con elevada afinidad conduce a una simulación aceptable con constantes de disociación de 3,3
- 40 cada uno de estos dos sitios. Los valores de competición con los iones calcio han sido igualmente interpretados con un sistema de ecuaciones adaptadas, y la simulación de los puntos experimentales con este sistema se ha indicado en la figura 17. La simulación ha sido efectuada considerando que en presencia de 8 mM de calmodulina y de 0,4 mM de uranilo, cada uno de los dos sitios con alta afinidad está poblado de manera equiprobable en uranio. Se ha considerado igualmente por hipótesis que cada uno de los estos dos sitios es independiente del otro. La simulación
- 45 se ha efectuado, por lo tanto, por un sistema de cuatro equilibrios químicos: dos corresponden a los equilibrios de disociación de los complejos "sitio-uranio", y dos corresponden al desplazamiento del uranio por el calcio en cada uno de los sitios. La simulación confirma que uno solo de los dos sitios que ha formado complejo con el uranio es desplazado por el calcio. Esto demuestra que la proteína calmodulina puede fijar el uranio en sitios de formación de complejo del calcio.
- 50

55

2) interacción de la proteína con su ligando en presencia de uranio.

La calmodulina en presencia de calcio, puede ligar y activar una gran diversidad de dianas. Entre estas, el péptido MLCKp, de 17 residuos y derivado del dominio que liga la calmodulina de una quinasa a la cadena ligera de la miosina de músculo de conejo (CALBIOCHEM) presenta la secuencia siguiente:

Ac-RRKWQKTGHAVRAIGRL-NH₂ (SEQ ID NO: 8)

Se han realizado dos series de experiencias para verificar que la proteína puede interaccionar siempre con este 60 ligando en presencia del ión uranilo.

En una primera serie, un espectro de fluorescencia del triptófano del ligando, disuelto con la concentración 5 mM en un tampón MES 10 mM con pH 6,5 se ha registrado, tal como se describe en el ejemplo 1.

65 La excitación de la solución en 280 nm permite detectar una emisión en 350 nm, característica de un triptófano expuesto al disolvente acuoso. La adición de un equivalente de calmodulina en ausencia de metales, conduce a un

desplazamiento del máximo de emisión a 330 nm, así como a un aumento de 25% de la intensidad. Esto demuestra que la proteína interacciona con el ligando, encontrándose el triptófano de este en un medio más hidrófobo. La adición en solución de 10 equivalentes de calcio conduce a un espectro de emisión de fluorescencia que presenta una intensidad aumentada (+ 20%) y el mismo máximo de 330 nm. Estos datos están de acuerdo con la obtención de una estructura similar a la estructura cristalográfica del complejo péptido/calmodulina obtenido en presencia de calcio (PDB 1 COL).

La misma experiencia realizada en presencia de uranilo conduce a una extinción total de la fluorescencia del triptófano del ligando (figura 15). Esto es compatible con una estructura similar a la obtenida en el caso del calcio. En efecto, este último es un metal con capa completa, que no presenta ninguna transición posible en fluorescencia. Por el contrario, con el uranio, el triptófano pierde su excitación a través del metal, que presenta niveles de energía correspondientes a una transición fluorescente. La emisión detectada es entonces la del metal (λ>450 nm) y no la del triptófano. Este fenómeno de transferencia de energía demuestra, además, que el uranio se encuentra en este complejo situado a menos de 15 Å (distancia máxima para la transferencia de energía) del triptófano, lo que está de acuerdo con las distancias medidas en la estructura en los radios X (10 Å y 6,5 Å) entre el triptófano del péptido y dos de los cuatro calcios.

Estos resultados indican que proteínas camaleón derivadas de la calmodulina, que comprenden la secuencia de, como mínimo, un péptido según la invención, pueden, en presencia de uranio, fijar el péptido substrato MLCK y que pueden, por lo tanto, ser utilizadas como biosensores específicos del uranio VI.

Ejemplo 5: Análisis comparativo de la afinidad y de la especificidad de los péptidos para el uranio y el terbio.

Las afinidades comparadas para $UO_2^{2^+}$ y Tb³⁺ de los péptidos derivados del sitio I de la calmodulina, mutados a nivel de los residuos tales como los que se han indicado en la siguiente tabla III, se han medido en medio fosfato 1 mM, pH = 7, por la técnica, descrita en el ejemplo 1.

Los resultados se han presentado en la siguiente Tabla III.

30 <u>Tabla III</u>: Afinidades comparadas de los péptidos para UO₂²⁺ y Tb³⁺

Péptido	Carga	Res20	Res22	Res24	Res31	$Kd(\mu M) UO_2^{2+}$	Kd Tb ³⁺	Kd Ca ²⁺
CaM-M1c	4	D	D	D	E	6,8	4 μM	30 µM
CaM-M2c	4	D	D	D	D	> 1000	36 µM	> 10 mM
CaM-M3c	2	Т	D	Т	Е	18	15 mM	>10mM
CaM-M4c	1	N	Ν	Ν	Е	26	12 mM	> 10 mM
CaM-M5c	2	D	Т	Т	Е	9,8	23 mM	> 10 mM
CaM-M6c	2	Т	Т	D	E	29	8,3 mM	> 10 mM
CaM-M7c	2	S	D	S	E	53	9,3 mM	> 10mM
CaM-M8c	1	Т	Ţ	Т	E	54	18 mM	> 10 mM
CaM-M9c	3	Т	D	D	Е	15	56 µM	> 10 mM
CaM-M10c	3	D	D	Т	Е	47	9,5 mM	> 10 mM

Estos resultados demuestran que la sustitución en el bucle formador de complejo de la calmodulina de un residuo 35 D24 por un residuo neutro, por ejemplo treonina, o de dos residuos de los residuos D20, D22 y D24 por dos residuos neutros, por ejemplo, treonina o serina, o finalmente tres residuos D20, D22 y D24 por residuos neutros, por ejemplo, treonina, serina o asparragina, reducen una especificidad para el uranilo. Para estos mutantes, la afinidad para los iones calcio o lantánidos está fuertemente reducida al límite de la detección.

40 LISTADO DE SECUENCIAS

5

20

<110> COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE (CEA) VITA, Claudio LE CLAINCHE, Loïc MONJARDET, Véronique

45 <120> PÉPTIDOS QUELANTES DEL URANIO Y SUS APLICACIONES

<130> F263PCT89

<150> FR 0308211 50 <151> 2003-07-04

```
<160> 12
     <170> Patentln version 3.1
 5
      <210> 1
      <211> 33
      <212> PRT
      <213> Secuencia artificial
10
      <220>
      <223> péptido CaM
      <400> 1
15
      Glu Gln Ile Ala Glu Phe Lys Glu Ala Phe Ala Leu Phe Asp Lys Asp
1 5 10 15
      Gly Asp Gly Thr Ile Thr Thr Lys Glu Leu Gly Thr Val Met Arg Ser
20 25 30
      Leu
      <210> 2
      <211> 33
20
      <212> PRT
      <213> Secuencia artificial
      <220>
      <223> péptido CaM-M 1c
25
      <400> 2
       Glu Gln Ile Ala Glu Phe Lys Glu Ala Phe Ala Leu Cys Asp Lys Asp
1 5 10 15
       Gly Asp Gly Tyr Ile Thr Thr Lys Glu Leu Gly Thr Cys Met Arg Ser
20 25 30
       Leu
30
      <210> 3
      <211> 33
      <212> PRT
      <213> Secuencia artificial
35
      <220>
      <223> péptido CaM-M2c
      <400> 3
      Glu Gln Ile Ala Glu Phe Lys Glu Ala Phe Ala Leu Cys Asp Lys Asp
1 5 10 15
      Gly Asp Gly Tyr Ile Thr Thr Lys Asp Leu Gly Thr Cys Met Arg Ser
20 25 30
```

40 Leu

<210> 4 <211> 33 <212> PRT <213> Secuencia artificial 5 <220> <223> péptido CaM-M3c <400> 4 10 Glu Gln Ile Ala Glu Phe Lys Glu Ala Phe Ala Leu Cys Thr Lys Asp 1 5 10 15 Gly Thr Gly Tyr Ile Thr Thr Lys Glu Leu Gly Thr Cys Met Arg Ser 20 25 30 Leu <210> 5 <211> 33 15 <212> PRT <213> Secuencia artificial <220> <223> péptido CaM-M4c 20 <400> 5 Glu Gln Ile Ala Glu Phe Lys Glu Ala Phe Ala Leu Cys Asn Lys Asn 1 5 10 15 Gly Asn Gly Tyr Ile Thr Thr Lys Glu Leu Gly Thr Cys Met Arg Ser 20 25 30 Leu 25 <210> 6 <211> 33 <212> PRT <213> Secuencia artificial 30 <220> <223> péptido CaM-M5c <400>6 Glu Gln Ile Ala Glu Phe Lys Glu Ala Phe Ala Leu Cys Asp Lys Thr 1 5 10 15 Gly Thr Gly Tyr Ile Thr Thr Lys Glu Leu Gly Thr Cys Met Arg Ser 20 25 30 Leu 35 <210>7 <211> 33

<212> PRT

```
<213> Secuencia artificial
      <220>
      <223> péptido CaM-M6c
 5
      <400>7
       Glu Gln Ile Ala Glu Phe Lys Glu Ala Phe Ala Leu Cys Thr Lys Thr
1 5 10 15
       Gly Asp Gly Tyr Ile Thr Thr Lys Glu Leu Gly Thr Cys Met Arg Ser
20 25 30
       Leu
10
     <210> 8
      <211> 17
      <212> PRT
     <213> Secuencia artificial
     <220>
15
     <223> péptido MLCKp
      <400> 8
       Arg Arg Lys Trp Gln Lys Thr Gly His Ala val Arg Ala Ile Gly Arg
1 5 10 15
       Leu
20
      <210> 9
      <211> 33
      <212> PRT
25
     <213> Secuencia artificial
     <220>
      <223> péptido CaM-M?c
30
     <400> 9
      Glu Gln Ile Ala Glu Phe Lys Glu Ala Phe Ala Leu Cys Ser Lys Asp
1 5 10 15
      Gly Ser Gly Tyr Ile Thr Thr Lys Glu Leu Gly Thr Cys Met Arg Ser
20 25 30
      Leu
      <210> 10
35
      <211> 33
      <212> PRT
      <213> Secuencia artificial
      <220>
     <223> péptido CaM-M8c
40
      <400> 10
```

```
Glu Gln Ile Ala Glu Phe Lys Glu Ala Phe Ala Leu Cys Thr Lys Thr
1 5 10 15
      Gly Thr Gly Tyr Ile Thr Thr Lys Glu Leu Gly Thr Cys Met Arg Ser
20 25 30
      Leu
      <210> 11
      <211> 33
      <212> PRT
 5
      <213> Secuencia artificial
      <220>
     <223> péptido caM-M9c
10
      <400> 11
      Glu Gln Ile Ala Glu Phe Lys Glu Ala Phe Ala Leu Cys Thr Lys Asp
1 10 15
      Gly Asp Gly Tyr Ile Thr Thr Lys Glu Leu Gly Thr Cys Met Arg Ser
20 25 30
      Leu
15
     <210> 12
      <211> 33
      <212> PRT
      <213> Secuencia artificial
20
      <220>
     <223> péptido CaM-M 10c
      <400> 12
      Glu Gln Ile Ala Glu Phe Lys Glu Ala Phe Ala Leu Cys Asp Lys Asp
1 5 10 15
      Gly Thr Gly Tyr Ile Thr Thr Lys Glu Leu Gly Thr Cys Met Arg Ser
20 25 30
```

25

Leu

REIVINDICACIONES

1. Péptido aislado, caracterizado porque es seleccionado dentro del grupo constituido por las secuencias SEQ ID NO: 4 a 7, 9, 10 y 12.

2. Péptido, según la reivindicación 1, caracterizado porque está conjugado, como mínimo, a un fluoróforo.

3. Péptido, según la reivindicación 2, caracterizado porque dicho fluoróforo es una proteína fluorescente seleccionada entre: EBFP, ECFP, EYFP, EGFP, DsRed, CopGFP y PhiYFP.

10

5

4. Péptido, según la reivindicación 2, caracterizado porque dicho fluoróforo es seleccionado entre dansilo, cumarina, fluoresceína y los derivados Alexa.

5. Polipéptido, caracterizado porque comprende la concatenación de, como mínimo, dos péptidos idénticos o diferentes, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.

6. Proteína de fusión, caracterizada porque está constituida por la fusión de la secuencia de, como mínimo, un péptido, según la reivindicación 1, con la secuencia de una proteína apropiada.

20 7. Proteína de fusión, según la reivindicación 6, caracterizada dicha proteína apropiada y seleccionada dentro del grupo constituido por calmodulina, proteínas camaleón procedentes de la anterior, y proteínas que poseen un motivo de tipo hélice-bucle-hélice, capaces de ligar el calcio.

8. Proteína de fusión, según la reivindicación 6 ó 7, caracterizada porque está conjugada, como mínimo, a un fluoróforo, tal como el definido en la reivindicación 3 ó 4.

9. Proteína de fusión, según la reivindicación 8, caracterizada porque uno de los extremos de dicha proteína está acoplado a un donante de fluorescencia, y el otro está acoplado a un aceptador de la fluorescencia.

30 10. Proteína de fusión, según la reivindicación 9, caracterizada porque comprende en uno de sus extremos la secuencia del EBFP o ECFP y en el otro extremo la secuencia del EGFP o EYFP.

11. Molécula de ácido nucléico aislada, caracterizado porque comprende una secuencia codificante para un péptido, una polipéptido o una proteína de fusión, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.

35

12. Vector recombinante eucariota o procariota, caracterizado porque comprende un inserto constituido por una molécula de ácido nucléico, según la reivindicación 11.

13. Célula eucariota o procariota, caracterizada porque está modificada por un vector recombinante, según la reivindicación 12.

14. Organismo animal no humano transgénico, caracterizado porque comprende células modificadas por una molécula de ácido nucléico, según la reivindicación 11.

45 15. Planta transgénica, caracterizada porque comprende células modificadas por una molécula de ácido nucléico, según la reivindicación 11.

16. Utilización de, como mínimo, un péptido aislado, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, de un polipéptido, según la reivindicación 5, o una proteína de fusión, según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10, para
 50 la preparación de un reactivo destinado a la detección de suelos y aguas contaminados por uranio.

17. Utilización de, como mínimo, un péptido aislado, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, de un polipéptido, según la reivindicación 5, o una proteína de fusión, según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10, para la preparación de un reactivo destinado al diagnóstico de individuos contaminados por uranio.

55

18. Utilización de, como mínimo, una célula, según la reivindicación 13, para la recuperación de suelos y aguas contaminados por uranio.

19. Utilización de una planta transgénica, según la reivindicación 15, para la recuperación de suelos y aguas contaminados por uranio.

20. Péptido, polipéptido o proteína de fusión, según una de las reivindicaciones 1 a 10, para utilización como medicamento para el tratamiento de individuos contaminados por uranio.

65 21. Péptido para utilización como medicamento, según la reivindicación 20, caracterizado porque está asociado, como mínimo, a una molécula que permite el direccionado al riñón y/o a huesos.

22. Péptido para la utilización como medicamento, según la reivindicación 20 ó 21, caracterizado porque está asociado a una molécula que favorece su excreción in vivo.

5 23. Kit para la detección de contaminación por uranio, caracterizado porque comprende, como mínimo, un péptido aislado, un polipéptido o una proteína de fusión, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.



Figura 1

posición	7 39
CaM :	EQIAEFKEAFALFDKDGDGTITTKELGTVMRSL
CaM-MIc :	EQIAEFKEAFALCDKDGDGYITTKELGTCMRSL
CaM-M2c :	EQIAEFKEAFALCDKDGDGYITTKDLGTCMRSL
CaM-M3c:	EQIAEFKEAFALCTKTGDGYITTKELGTCMRSL
CaM-M4c:	EQIAEFKEAFALCNKNGNGYITTKELGTCMRSL
CaM-M5c :	EQIAEFKEAFALCDKTGTGTGTITTKELGTCMRSL
CaM-M6c :	EQIAEFKEAFALCTKTGDGYITTKELGTCMRSL
CaM-M7c :	EQIAEFKEAFALCSKDGSGYITTKELGTCMRSL
CaM-M8c :	EQIAEFKEAFALCTKTGTGYITTKELGTCMRSL
CaM-M9c	EQIAEFKEAFALCTKDGDGYITTKELGTCMRSL
CaM-M10c	EQIAEFKEAFALCOKDGTGYITTKELGTCMRSL

Figura 2



Figura 3



Figura 4



FIGURA 5



FIGURA 6

.



Figura 7



FIGURA 8



FIGURA 9



FIGURA 10



FIGURA 11



FIGURA 12



FIGURA 13



FIGURA 14



FIGURA 15



FIGURA 16



FIGURA 17