



INSTITUTO NACIONAL
DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

(11) Número de Publicação: **PT 1200583 E**

(51) Classificação Internacional:

C12N 15/12 (2006.01) **C12N 15/10** (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01) **C12N 5/10** (2006.01)

C12P 21/02 (2006.01)

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: **2000.07.13**

(30) Prioridade(s): **1999.07.13 DE 1993268**

(43) Data de publicação do pedido: **2002.05.02**

(45) Data e BPI da concessão: **2006.10.17**
012/2006

(73) Titular(es):

SCIL PROTEINS GMBH

HEINRICH-DAMEROW-STRASSE 1 06120

HALLE/SAALE

DE

(72) Inventor(es):

ULRIKE FIEDLER

RAINER RUDOLPH

DE

DE

(74) Mandatário:

PEDRO DA SILVA ALVES MOREIRA

RUA DO PATROCÍNIO, N.º 94 1350-232 LISBOA

PT

(54) Epígrafe: **PROJECTO DE PROTEÍNAS EM FOLHAS PLISSADAS BETA COM PROPRIEDADES DE LIGAÇÃO ESPECÍFICAS**

(57) Resumo:

RESUMO

"PROJECTO DE PROTEÍNAS EM FOLHAS PLISSADAS BETA COM PROPRIEDADES DE LIGAÇÃO ESPECÍFICAS"

A presente invenção descreve proteínas em folha plissada beta de novo tipo com propriedades de ligação específicas e propriedades catalíticas, bem como processos para a preparação destas proteínas.

DESCRIÇÃO

"PROJECTO DE PROTEÍNAS EM FOLHAS PLISSADAS BETA COM PROPRIEDADES DE LIGAÇÃO ESPECÍFICAS"

A presente invenção refere-se a processos para a preparação de proteínas em folhas plissadas beta com propriedades de ligação específicas semelhantes às dos anticorpos, novas ou alteradas, bem como a proteínas com propriedades de ligação específicas semelhantes às dos anticorpos.

Os anticorpos e os seus derivados são utilizados em muitos domínios da terapia humana e veterinária, no diagnóstico bem como na monitorização. Um problema com a utilização dos anticorpos de ocorrência natural é a sua preparação. A produção dos anticorpos é efectuada agora como dantes em sistemas de cultura de células animais, um processo que é muito caro. Para algumas utilizações, como por exemplo a preparação de proteínas de fusão ou um emprego na terapia, que torne necessária uma depuração rápida do sangue e uma boa penetração nos tecidos, a dimensão das moléculas de anticorpos de ocorrência natural representa um outro problema (Colcher *et al.*, 1998). As moléculas de anticorpos recombinantes, como os scFv's (Bird *et al.* 1988), minianticorpos (Pack e Plückthun, 1992) ou anticorpos biespecíficos (Holliger e Winter, 1993) já só são em grande parte constituídas pelos domínios de ligação a antigénios dos anticorpos (VH e VL). Em virtude da sua dimensão consideravelmente reduzida, aqueles apresentam uma penetração nos tecidos melhorada e são também melhor apropriados para

fusões com outras proteínas do que anticorpos completos. Em comparação com estes, os fragmentos de anticorpos recombinantes são, contudo, frequentemente instáveis, possuem afinidades reduzidas e são difíceis de preparar por via recombinante em virtude das pontes de dissulfureto a formar. Métodos para a estabilização e melhoramento da afinidade dos fragmentos de anticorpos recombinantes abrangem, entre outros, o ensaio de diferentes peptídeos de ligação e a introdução de pontes de dissulfureto (Glockshuber *et al.*, 1990, Cumber *et al.*, 1992, Brinkmann, 1997).

A sequência e o comprimento dos peptídeos de ligação pode influenciar não só a estabilidade frente às proteases, mas também a afinidade dos fragmentos de anticorpos (Pantoliano *et al.*, 1991). A introdução de pontes de dissulfureto adicionais nas regiões estruturais conservadas dos domínios variáveis pode levar a uma resistência aumentada ao calor (Young *et al.*, 1995) e a agentes desnaturantes, bem como a rendimentos melhorados na expressão heteróloga. Em geral muitos scFv's apresentam no entanto uma estabilidade reduzida e tendem para a agregação logo a 37 °C. A instabilidade pode igualmente ser causada por meio da utilização dos iniciadores de clonagem fragmentos de Fv comuns, através dos quais novas mutações destabilizadoras podem ser introduzidas. A produção dos fragmentos de anticorpos no sistema bacteriano é efectuada na maioria dos casos por meio de secreção no espaço periplasmático, em que também neste caso são possíveis optimizações no que respeita o estado de redox ou a expressão simultânea de auxiliares de dobragem.

É um objectivo da presente invenção proporcionar um processo para a preparação de proteínas, que apresentem propriedades de ligação semelhantes às dos anticorpos, novas ou

alteradas, e simultaneamente, no entanto, não apresentem as desvantagens acima descritas das moléculas de anticorpos completas ou recombinantes.

O objectivo acima referido é alcançado por meio do processo de acordo com a invenção para a preparação das proteínas de acordo com a reivindicação 1. Formas de realização da invenção preferidas resultam das reivindicações dependentes e da descrição seguinte.

Por meio de alterações da superfície de uma proteína em folha plissada beta são originadas propriedades de ligação de um novo tipo, anteriormente não existentes, na proteína. Estas propriedades de ligação são produzidas por meio de mutagénese de um domínio de folha plissada beta. As proteínas em folha plissada beta de novo tipo são, apesar das novas propriedades de ligação, semelhantes às proteínas de partida na estrutura e na estabilidade. As proteínas de partida para o projecto das moléculas de ligação de novo tipo são proteínas com uma estrutura em folha plissada beta preponderante, como p. ex. a proteína cristalina gama, uma proteína estrutural do cristalino. Com base na estrutura dos cristais, seleccionam-se, por exemplo por meio de análises computacionais, domínios e aminoácidos na folha plissada beta das proteínas de partida, que estão expostas à superfície e, em consequência são acessíveis ao solvente ou aos possíveis parceiros de ligação. No gene que codifica para a proteína de partida, estes domínios ou posições de aminoácidos são submetidos a mutagénese com métodos da engenharia genética. No plano do ADN é assim preparada uma variedade de genes mutados (banco ou biblioteca), que codificam para os diferentes mutantes de proteínas em folha plissada beta. O isolamento de mutantes com propriedades de ligação pretendidas de tipo novo é efectuado

com o auxílio de um sistema de selecção apropriado, como p. ex. o sistema de *Phage Display*. No *Phage Display*, a totalidade dos mutantes de proteínas preparados é exposta sobre a superfície de bacteriófagos (Banco de *Phage Display*). Estes fagos recombinantes são investigados no que respeita a sua ligação às moléculas alvo pretendidas. Os fagos que expõem à sua superfície mutantes de folhas plissadas beta com uma ligação específica para a molécula alvo são concentrados e isolados por meio de uma reiterada selecção. Os genes que codificam para mutantes ligantes de folha plissada beta são obtidos dos fagos e expressos num sistema de expressão apropriado, como p. ex. *E. coli*. Com o processo descrito, consegue-se surpreendentemente preparar, a partir de proteínas em folha plissada beta que não apresentam quaisquer propriedades de ligação específica, proteínas que se ligam de modo específico, em que são isoladas mutantes com a especificidade pretendida a partir de bibliotecas por meio da utilização de um processo de selecção apropriado. Em função das propriedades da proteína de partida, os mutantes de folha plissada beta preparados com o sistema descrito têm, p. ex., frente a anticorpos e fragmentos de anticorpos recombinantes vantagens no que se refere à dimensão, estabilidade e produção activa funcional no sistema heterólogo, de um modo preferido bacteriano. Estas propriedades melhoradas dos mutantes de folha plissada beta de novo tipo possibilitam, p. ex., substituir anticorpos, fragmentos de anticorpos recombinantes ou anticorpos catalíticos bem como tornar acessíveis domínios completamente novos de aplicação.

A solução, de acordo com a invenção, por exemplo da problemática de anticorpos descrita, baseia-se em proporcionar um processo para o projecto de proteínas com propriedades de ligação específicas em cada caso, que apresentem uma elevada

estabilidade frente a valores de pH reduzidos, agentes desnaturantes e temperaturas elevadas, isto é, resistam a condições nas quais os anticorpos são instáveis. A produção de proteínas com estrutura em folha plissada beta com propriedades de ligação semelhantes às dos anticorpos é objecto da presente invenção. São especialmente apropriadas para o projecto proteínas pequenas com uma elevada estabilidade de modo natural. Por meio de alteração da sua superfície, são obtidas de acordo com a invenção, com conservação da estabilidade, a título exemplificativo, novas propriedades de ligação específica na proteína.

De acordo com a invenção, foram seleccionadas como uma possível classe proteínas estáveis, a título de exemplo as cristalinas. As cristalinas, as proteínas estruturais do cristalino, não estão sujeitas habitualmente a qualquer "turnover" celular e apresentam em consequência também propriedades extraordinárias de estabilidade (Mandal *et al.*, 1987, Rudolph *et al.*, 1990). As cristalinas gama, uma classe das cristalinas nos vertebrados, são proteínas monoméricas com uma massa molecular de cerca de 22 kDa. O motivo estrutural principal das cristalinas gama é a folha plissada beta antiparalela (Hazes e Hol, 1992, Richardson *et al.*, 1992, Hemmingsen *et al.*, 1994). As cristalinas gama são constituídas por dois domínios globulares muito semelhantes, um domínio terminal em N e um terminal em C, que estão ligados entre si por meio de um peptídeo de ligação em forma de V. O padrão de dobragem característico das cristalinas gama (motivo "Greek-Key", Slingsby, 1985, Wistow e Piatigorsky, 1988) é muito provavelmente a causa para a considerável estabilidade térmica bem como para a estabilidade frente a agentes desnaturantes (Mandal *et al.*, 1987). A cristalina gama-II de olhos de vitela é

uma proteína de 21 kDa com muitas cisteínas (7), inabitual para a sua dimensão, que se encontra em forma reduzida sob condições fisiológicas.

A cristalina gama-II não apresenta no estado plissado normal quaisquer propriedades de ligação. A alteração de acordo com a invenção (mutagénesis) de uma região seleccionada exposta a solvente desta proteína, que é constituída pelo motivo estrutural da folha plissada beta, levou surpreendentemente à alteração da estrutura superficial e do padrão de carga da proteína e, em consequência, à formação de novas propriedades de ligação. Neste caso, foram seleccionados apenas domínios ou posições de aminoácidos que não tomam parte, de modo decisivo, no comportamento estrutural da proteína. A mutagénesis de uma pequena proteína em folha plissada (Riddle *et al.*, 1997), mostrou que proteínas em elevada percentagem podem formar correctamente a estrutura nativa da folha plissada beta apesar de alterações consideráveis na sequência.

Existem já preparações para a mutagénesis de domínios determinados de proteínas com o objectivo do isolamento de moléculas com propriedades de ligação melhoradas ou novas para fragmentos de anticorpos recombinantes (Nissim *et al.*, 1994, de Kruif *et al.*, 1995), para proteínas com propriedades de ligação já presentes (receptores, proteínas inibidoras, proteínas de ligação a ADN), bem como para bibliotecas de peptídeos (Cortese *et al.*, 1995, Haaparanta e Huse 1995, McConell *et al.*, 1996). No caso dos anticorpos foram apenas submetidos a mutagénesis os domínios que se ligam a antigénios, que ocorrem como regiões *loop*. Isto é igualmente o caso para a maioria das outras proteínas, como, p. ex., tendamistato (McConell e Hoess, 1995) ou citocromo b₅₆₂ (Ku e Schultz, 1995). Também neste caso são

submetidas a mutagénese regiões *loop*. São exemplos para mutagénese em hélices alfa, o domínio Z da proteína A (Nord *et al.*, 1997) e o domínio de dedo de zinco CP-1 (Choo e Klug, 1995). Nas mutagénese habituais alterava-se apenas a especificidade da ligação, em que se partia sempre de proteínas já com propriedades de ligação presentes. Em nenhum caso se utilizou uma proteína sem propriedades de ligação, nem se alterou especificamente um motivo estrutural em folha plissada beta. No processo aqui descrito, foi pela primeira vez efectuada uma mutagénese dirigida numa proteína sem propriedades de ligação próprias, no domínio rígido da folha plissada beta. Deste modo, foi obtida de modo inesperado uma proteína com estabilidade considerável e com propriedades de ligação específicas, comparável com moléculas de anticorpos.

Como sistema adequado para o isolamento de proteínas em folha plissada beta mutadas com novas propriedades de ligação originadas serve o sistema de *Phage Display*. O sistema possibilita uma selecção muito eficaz de grandes reportórios de variantes de proteínas para propriedades de ligação específicas (Smith, 1985). Nesta selecção é sempre produzida uma variante proteica sobre a superfície de um fago filamentosos e pode interagir com as moléculas alvo que estão imobilizadas numa fase sólida. As proteínas que se ligam à molécula alvo podem ser obtidas por meio de eluição dos fagos. Após isolamento do ADN fágico, a sequência de ADN das variantes proteicas ligadas de modo específico pode ser determinada. Para além do sistema *Phage Display*, podem também ser utilizados outros sistemas de selecção, como p. ex. o *Display* de bactérias (Stahl e Uhlen, 1997) ou o *Display* de ribossomas (Hanes *et al.*, 1997).

Com a invenção descrita é possível de modo surpreendente, por exemplo alterar a proteína cristalina gama-II em folha plissada beta muito estável por meio de mutagénese dirigida especificamente para um local na folha plissada beta na superfície de tal modo que resulta, a partir da proteína não ligante, uma proteína com propriedades de ligação específicas. Por meio de uma alteração de modo aleatório de oito posições de aminoácidos, consegue-se deste modo pela primeira vez uma mutagénese numa molécula do esqueleto no interior do domínio relativamente rígido da proteína. Por conseguinte, produz-se a partir da proteína cristalina gama-II em folha plissada beta uma espécie proteica "semelhante a um anticorpos" no que se refere às suas propriedades de ligação específicas. A cristalina gama-II ou outras proteínas em folha plissada beta estável, pequenas, podem ser, de um modo geral, utilizadas com o processo descrito como moléculas de esqueleto de novo tipo para o projecto de propriedades de ligação de novo tipo. As proteínas em folha plissada beta moduladas podem, p. ex., substituir anticorpos recombinantes em diferentes aplicações. Graças à sua dimensão relativamente reduzida (20 kDa), as mesmas são apropriadas como parceiros de fusão para outras proteínas funcionais (preparação de proteínas multifuncionais). Outras possibilidades de aplicação situam-se na terapia genética, em que podem ter utilização como módulos para o direccionamento específico em relação a células dos vectores de terapia genética e na imunização intracelular. A estabilidade das proteínas de ligação de novo tipo possibilita além disso utilizações que até agora não são realizáveis com anticorpos recombinantes, p. ex. no diagnóstico e na terapia da medicina humana e da medicina veterinária, nos biossensores e na biosseparação. Outros domínios de aplicação são em geral a indústria farmacêutica e de

cosmética bem como a análise e remoção de substâncias prejudiciais.

Em seguida são descritas algumas forma de realização preferidas da invenção.

As proteínas com estrutura em folha plissada beta seleccionadas de acordo com a invenção para a mutagénese não apresentam quaisquer propriedades de ligação ou apresentam propriedades de ligação tais, que tornam desejável uma alteração, em particular um melhoramento.

São conhecidas proteínas com estrutura em folha plissada beta. Um exemplo para uma classe de proteínas com folha plissada beta são as cristalinas, em especial as cristalinas alfa, beta e gama. Utilizáveis, por princípio, são as cristalinas provenientes de todas as espécies animais, por exemplo de vertebrados, roedores, aves e peixes. Outros exemplos de proteínas com estrutura em folha plissada beta que podem ser mudadas de acordo com a invenção são: esferulinas, proteínas do *stress* térmico, proteínas do choque hipotérmico, proteínas de hélice beta e fibronectinas. De acordo com a invenção são submetidas a mutagénese, p. ex., algumas subunidades ou domínios destas proteínas, p. ex. das cristalinas com estrutura em folha plissada beta.

De entre as cristalinas é de referir como especialmente preferida a cristalina gama, da qual se pôde mostrar de acordo com a invenção, a titulo de exemplo, que a sua estrutura em folha plissada beta é de tal modo alterada, isto é, pode ser mudada, que resultam novas propriedades de ligação específicas ou novas actividades catalíticas, que, p. ex., são comparáveis a

uma molécula de anticorpo. Um exemplo para uma cristalina gama é a cristalina gama-II.

Encontram-se exemplos de proteínas em hélice beta, entre outros, em Jenkins J. *et al.*, *J. Struct. Biol.* 1998, **122** (1-2): 236-46, Pickersgill, R. *et al.*, *J. Biol. Chem.* 1998, **273** (38), 24600-4 e Raetz C. R. *et al.*, *Science* 1995, **270** (5238), 997-1000.

A estrutura em folha plissada beta é definida por ter essencialmente uma forma de placa e estar quase inteiramente distendida. Ao contrário de hélices alfa, que são formadas por uma parte contínua da cadeia polipeptídica, as folhas plissadas beta podem ser formadas por diferentes regiões da cadeia polipeptídica. Deste modo, domínios mais afastados, na estrutura primária, podem vir a localizar-se na vizinhança imediata uns dos outros. Uma cadeia beta tem normalmente o comprimento de 5 a 10 aminoácidos e está quase completamente distendida. As cadeias beta situam-se tão juntas umas às outras que se formam pontes de hidrogénio entre os grupos C=O de uma e os grupos NH da outra cadeia ou inversamente. As folhas plissadas beta podem ser formadas por várias cadeias e têm uma estrutura em placa. Nestas folhas o átomo alfa de carbono situa-se sempre alternadamente acima ou abaixo do plano da placa. As cadeias laterais dos aminoácidos seguem este padrão e estão por conseguinte dirigidas alternadamente uma vez para cima e uma vez para baixo. Conforme a orientação das cadeias beta, distinguem-se folhas plissadas paralelas e antiparalelas. De acordo com a invenção, podem ser ambas submetidas a mutagénese e utilizadas para a preparação das proteínas reivindicadas.

Para a mutagénese da estrutura em folha plissada beta são seleccionadas na proteína as regiões da folha plissada beta que estão próximas da superfície. Os aminoácidos expostos na superfície podem ser identificados em virtude da estrutura cristalina aos raios X que apresentam. Quando não existe qualquer estrutura cristalina, então pode investigar-se por meio de análise computadorizada, por intermédio da estrutura primária presente dos domínios em folha plissada beta expostos na superfície e pode prever-se a acessibilidade de cada posição de aminoácidos (www.embl-heidelberg.de/predictprotein/predictprotein.html) ou modelar a estrutura 3d da proteína (www.expasy.ch/swissmo/SWISS-MODEL.html) e deste modo obter informação sobre aminoácidos possivelmente expostos à superfície.

Porém são também possíveis mutagénese na folha plissada beta nas quais se suprime uma pré-selecção demorada das posições de aminoácidos a serem submetidos a mutagénese. Aquelles domínios de ADN que codificam para a estrutura em folha plissada beta são isolados do seu ADN envolvente, submetidos a mutagénese eventualmente dirigidas e em seguida integrados novamente no ADN que codifica para a proteína, a partir do qual tinham sido retirados anteriormente. Deste modo, termina-se um processo de selecção de mutantes com as propriedades de ligação e/ou propriedades catalíticas e/ou propriedades de fluorescência pretendidas.

Numa outra forma de realização da invenção, seleccionam-se as regiões em folha plissada beta próximas da superfície, como acima já exposto, e no interior destas regiões seleccionadas identificam-se as posições de aminoácidos a submeter a mutagénese. Estas posições de aminoácidos assim seleccionadas

podem então, no plano do ADN, ser submetidas a mutagénese dirigida, isto é, um codão que codifica para um determinado aminoácido é trocado por um codão que codifica para um outro aminoácido específico previamente seleccionado, ou esta troca é efectuada no âmbito de uma mutagénese aleatória, em que, pelo contrário, a posição do aminoácido a trocar não é definida pelo novo codão que codifica para o aminoácido ainda não determinado.

Os aminoácidos expostos à superfície estão acessíveis ao solvente envolvente. Para uma acessibilidade dos aminoácidos na proteína de mais de 8% em comparação com a acessibilidade dos aminoácidos no tripeptídeo modelo Gly-X-Gly, falamos de aminoácidos expostos à superfície. Estes domínios proteicos ou posições de aminoácidos individuais são também sítios de ligação preferidos para possíveis parceiros de ligação, dos quais devem ser seleccionados de acordo com a invenção. No que se refere aos parceiros de ligação pode tratar-se, a título exemplificativo, de antigénios ou substratos ou análogos de estado transitório de substratos.

De acordo com a invenção, podem ser mutadas praticamente todas as proteínas que se situam à superfície ou apresentam estruturas em folha plissada beta acessíveis a um solvente ou a um parceiro de ligação. Neste caso são de considerar predominantemente as proteínas que são especialmente estáveis, isto é, por exemplo, que são resistentes à desnaturação ou suficientemente "pequenas".

Por "mutagénese" deve entender-se de acordo com a invenção a alteração de um ou vários aminoácidos expostos à superfície na cadeia polipeptídica com estrutura em folha plissada beta. Entre estes encontram-se, por exemplo, as substituições de aminoácidos,

em que um aminoácido com determinadas propriedades no que se refere à sua polaridade, carga, solubilidade, hidrofobilidade ou hidrofiliidade é substituído por um aminoácido com uma outra propriedade, por exemplo, por conseguinte, um aminoácido não polar hidrófobo por um aminoácido polar, um aminoácido com carga negativa por um aminoácido com carga positiva, etc.. A expressão "submetido a mutagénese" abrange também inserções e eliminações de um ou vários aminoácidos. Neste caso é condição que as mutações de aminoácidos expostos à superfície abrangam pelo menos duas cadeias beta expostas à superfície de pelo menos de uma folha plissada beta exposta à superfície. As mutações são de preferência dirigidas a posições de aminoácidos individuais na folha plissada beta ou exercidas em domínios seleccionados da folha plissada beta. As mutações podem estar presentes num domínio ou em vários domínios da estrutura em folha plissada beta. As alterações podem abranger aminoácidos adjacentes ou aminoácidos situados mais afastados entre si na folha plissada beta. As alterações podem também abranger aminoácidos em diferentes folhas plissadas beta, por conseguinte em mais do que uma folha plissada beta. As inserções, eliminações ou substituições de um ou vários aminoácidos estão localizadas em pelo menos duas cadeias beta expostas à superfície de pelo menos uma folha plissada beta exposta à superfície. Neste caso, podem ser substituídos, suprimidos ou inseridos numa cadeia beta exposta à superfície um ou vários aminoácidos, isto é, p. ex. uma cadeia beta exposta à superfície pode apresentar várias mutações, desde que pelo menos sejam mudadas duas cadeias beta expostas à superfície. Numa outra forma de realização, são submetidas a mutagénese pelo menos duas folhas plissadas beta expostas à superfície em cada cadeia beta exposta à superfície, isto é, em cada caso uma folha plissada beta exposta à superfície apresenta pelo menos uma cadeia beta exposta à

superfície submetida a mutagénese. Numa outra forma de realização da invenção, as folhas plissadas beta expostas à superfície submetidas a mutagénese estão ordenadas de modo antiparalelo, em que é preferido tratar-se de pelo menos duas folhas plissadas beta ordenadas de modo antiparalelo.

De acordo com a invenção é, por exemplo, preferido que sejam submetidas a mutagénese duas ou três cadeias beta expostas à superfície. De acordo com a invenção é também possível que sejam submetidas a mutagénese quatro ou mais cadeias beta expostas à superfície. Além disso, é possível que pelo menos duas cadeias beta em pelo menos duas folhas plissadas beta sejam submetidas a mutagénese, em que é preferida uma mutagénese de três cadeias beta em duas folhas plissadas beta antiparalelas.

Numa forma de realização da invenção, a mutagénese é realizada por meio de montagem de oligonucleótidos de ADN com o codão de aminoácidos NNK. Evidentemente, são também utilizáveis outros codões (tripletos).

As mutações são tais que a estrutura em folha plissada beta é conservada. Em geral, a mutagénese tem lugar no lado exterior de um domínio em folha plissada beta estável exposto à superfície da proteína. A mesma abrange não só mutações específicas de um sítio mas também mutações dirigidas ao acaso. As mutagénese específicas de um local, que abrangem um domínio relativamente pequeno na estrutura primária (cerca de 3-5 aminoácidos), podem ser efectuadas com os *kits* disponíveis comercialmente da Stratagene (QuickChange) ou Bio-Rad (*kit* de mutagénese *in vitro* *Muta-Gene phagemid*) (cf. US-A-5789166; US-A-4873192).

Em domínios maiores, tem que ser preparado um bloco integrado de ADN de uma mutagénese específica de um local, em que o domínio a submeter a mutagénese é obtido por meio de montagem de oligonucleótidos que contêm as posições mutadas e as não alteradas (Nord *et al.*, 1997; McConell e Hoess, 1995). Mutagénese dirigidas ao acaso podem ser efectuadas por meio da multiplicação do ADN em estirpes mutadoras ou por meio de uma amplificação por PCR (PCR *errorprone*) (por exemplo, Pannekoek *et al.*, 1993). Neste caso, utiliza-se uma polimerase com uma taxa de erro mais elevada. A fim de aumentar o grau da mutagénese introduzida ou combinar mutações diferentes, podem ser combinadas as mutações nos fragmentos de PCR por meio de *shuffling* de ADN (Stemmer, 1994). Uma revisão de conjunto destas estratégias de mutagénese em enzimas pode ser encontrada na revisão de Kuchner e Arnold (1997). A fim de efectuar esta mutagénese dirigida ao acaso num domínio de ADN seleccionado, tem igualmente que ser construído um bloco integrado de ADN, que é utilizado para a mutagénese.

As moléculas de ADN obtidas no passo de mutagénese são expressas num sistema de expressão apropriado. De preferência estes sistemas de expressão são tais que facilitam a selecção e o isolamento subsequentes de mutantes com as propriedades de ligação pretendidas e/ou a actividade catalítica ou enzimática pretendida. Os vectores de expressão e os sistemas de expressão deste tipo são conhecidos do especialista e foram já anteriormente descritos mais em pormenor. É evidentemente possível utilizar também outros sistemas de expressão que possibilitam a selecção de acordo com a invenção de mutantes com propriedades ou actividades específicas.

De um modo preferido, utiliza-se para a expressão e selecção o sistema *Phage-display*, no qual a totalidade dos mutantes preparados ao nível do ADN é clonada num fagemídeo e expressa sobre a superfície de fagos. Em proteínas com cisteínas reduzidas, pode, numa forma de realização da invenção especialmente preferida, adicionar-se GSH para o melhoramento da exposição e da selecção dos mutantes.

De acordo com o processo da invenção, são preparadas proteínas mutadas, moléculas de ADN, moléculas de ARN derivadas daquelas e partes funcionais destas, as quais codificam para uma proteína com uma estrutura em folha plissada beta mutada, que é capaz de uma ligação nova ou alterada semelhante às dos anticorpos a um parceiro de ligação pretendido. A expressão "partes funcionais" refere-se a subunidades, domínios e epítomos da proteína com estrutura em folha plissada beta, que são submetidos a mutagénese de acordo com a invenção e que apresentam ou são co-responsáveis pelas propriedades de ligação e actividades pretendidas.

A selecção e o isolamento de mutantes com as propriedades de ligação semelhantes às de anticorpos pretendidas são efectuados de um modo conhecido em si. Em seguida descrevem-se exemplos de processos de selecção e processos de isolamento de mutantes com propriedades de ligação e com actividades catalíticas novas ou alteradas:

Numa selecção de propriedades de ligação pretendidas, põem-se em contacto as proteínas mutadas ou as partes funcionais destas com os seus parceiros de ligação. Por meio de processos de detecção apropriados, seleccionam-se mutantes com as propriedades de ligação pretendidas.

Na selecção de actividade catalítica, que não é *per se* abrangida pelas reivindicações, as proteínas mutadas ou partes funcionais destas são postas em ligação com os substratos e em seguida são seleccionadas por meio de métodos de detecção apropriados no que se refere à actividade enzimática pretendida.

Uma selecção da actividade catalítica pode ter lugar em vários passos:

1. *Phage Display*:

Acoplamento de análogos de estados transitórios numa fase sólida e selecção do banco de mutantes contrários. Estas substâncias são análogos de estados transitórios do substrato, que normalmente ocorrem numa reacção enzimática de um substrato para o produto (substrato-produto de estado transitório). Para este fim, o estado transitório do substrato tem com efeito que ser clarificado. É também possível efectuar uma selecção de ligação do substrato.

2. *sem Phage Display*:

Clonagem dos mutantes num sistema de expressão bacteriano e inoculação em placas das bactérias recombinantes para a formação de colónias individuais. A proteína mutada pode ser expressa nas bactérias por meio de adição de indutores (por exemplo, IPTG) ao meio nutriente. O meio nutriente deve além do mais conter o substrato, a partir de cuja reacção se deve efectuar a selecção. O substrato deve na reacção formar um produto identificável, por

exemplo colorido. As bactérias que expressam um mutante, que transforma o substrato no meio nutriente, adquirem deste modo uma cor diferente. Um exemplo seria a busca de actividade de beta-galactosidase e a reacção de X-Gal (cor azul) (Zhang et al., 1997).

3. Outros processos de detecção são também conhecidos do especialista:

Para além das variantes da coloração, podem, por exemplo, ser seleccionados mutantes proteicos que medeiam uma nova resistência (adição de antibióticos ao meio nutriente) ou que possibilitam um crescimento em meio nutriente mínimo, no qual a bactéria "normal" não cresce. Neste caso, pode-se utilizar a vantagem de crescimento selectivo das bactérias com os novos mutantes proteicos (Crameri et al., 1997).

4. Expressão e secreção das proteínas mutadas:

Obtenção do sobrenadante e ensaio da actividade enzimática pretendida, a seleccionar, por exemplo em bactérias (You e Arnold, 1996). A presente invenção resolve assim o problema da produção de proteínas com novas propriedades de ligação ou novas propriedades catalíticas por meio da mutagénese de proteínas com estruturas em folha plissada beta no respectivo motivo estrutural. De entre estas proteínas, são seleccionadas as que apresentam as propriedades de ligação pretendidas novas ou alteradas, de um modo preferido melhoradas, ou as actividades enzimáticas ou catalíticas pretendidas novas ou alteradas, de um modo preferido melhoradas. Por meio do sistema de acordo com a

invenção é mesmo possível alterar proteínas em folha plissada beta que não apresentam qualquer propriedade de ligação ou qualquer propriedade enzimática de tal modo que estas após submetidas a mutagénese na folha plissada beta obtêm propriedades de ligação ou propriedades catalíticas.

Por "propriedades de ligação" deve entender-se, de acordo com a invenção, por exemplo, a afinidade específica de um antigénio com um anticorpo. De acordo com a mutagénese efectuada de acordo com a invenção, a proteína em folha plissada beta apresenta, por conseguinte, propriedades semelhantes às dos anticorpos e reúne em si as vantagens da elevada especificidade de ligação de um anticorpo com as propriedades vantajosas de estabilidade de uma proteína em folha plissada beta. As proteínas em folha plissada beta preparadas de acordo com a invenção com propriedades semelhantes às dos anticorpos podem também apresentar uma função catalítica.

Por alteração das propriedades de ligação, deve-se, de acordo com a invenção, entender não só uma degradação como também um melhoramento destas propriedades, sendo preferido um melhoramento.

De acordo com a invenção, entende-se por "proteína com uma nova propriedade de ligação específica semelhante às dos anticorpos" uma proteína que anteriormente não possuía qualquer propriedade de ligação específica e que por meio da mutagénese dirigida de aminoácidos expostos à superfície em pelo menos duas cadeias beta expostas à superfície de pelo menos uma folha plissada beta exposta à superfície passa a apresentar uma propriedade de ligação específica. Nesta categoria cabem, no entanto, também proteínas que já antes de submetidas a

mutagénese apresentavam uma propriedade de ligação específica semelhante às dos anticorpos e que após a mutagénese na folha plissada beta apresentam uma outra propriedade de ligação específica adicional.

Na invenção estão além disso abrangidas as proteínas que já possuíam uma propriedade de ligação específica e que, após submetidas a mutagénese de aminoácidos expostos à superfície em pelo menos duas cadeias beta expostas à superfície de uma ou várias folhas plissadas beta expostas à superfície, obtêm um melhoramento, em geral denominado uma alteração, na sua propriedade de ligação específica.

O processo de acordo com a invenção e as proteínas preparadas através do mesmo distinguem-se também das proteínas e dos processos do estado da técnica na medida em que nestas as estruturas em folha plissada beta foram alteradas por mutagénese aleatória, que não era dirigida especificamente para a estrutura em folha plissada beta, mas sim sobre toda a proteína e em especial não era dirigida especificamente para aminoácidos expostos à superfície em pelo menos duas cadeias beta expostas à superfície de pelo menos uma folha plissada beta exposta à superfície ou diziam respeito a aminoácidos semelhantes expostos à superfície.

Numa forma de realização preferida da invenção, que é descrita a título de exemplo em seguida, foi seleccionada como exemplo de uma proteína com estrutura em folha plissada beta, a cristalina gama, como ponto de partida para a mutagénese. Neste caso, seleccionaram-se em primeiro lugar, por meio de investigações estruturais, posições de aminoácidos expostas à superfície e submeteram-se a mutagénese por meio de métodos de

mutagénese conhecidos em si. Os mutantes obtidos foram expressos num sistema de expressão apropriado, igualmente conhecido. A selecção foi dirigida aos mutantes cujos aminoácidos expostos à superfície na folha plissada beta da cristalina gama apresentavam uma ligação específica ao antigénio BSA-17-hemissuccinato de estradiol. Foram com efeito isolados vários mutantes com a propriedade de ligação pretendida, e efectivamente apenas um possuía a permuta de aminoácidos esperada. Foi deste modo obtida uma molécula semelhante a anticorpo que não era uma imunoglobulina e que se baseava na proteína de partida cristalina gama.

Por meio do processo de acordo com a invenção é possível a preparação de um número de facto enorme de mutantes. Já a mutagénese de oito posições de aminoácidos possibilita a formação de $2,6 \times 10^{10}$ diferentes espécies de proteínas, que podem ser investigadas no que se refere às propriedades de ligação e actividades catalíticas pretendidas.

Demonstrou-se além disso de acordo com a invenção que uma proteína com estrutura em folha plissada beta pode ser alterada por meio de mutagénese de aminoácidos expostos à superfície nas suas propriedades de fluorescência.

Os genes mutados obtidos podem ser multiplicados em sistemas adequados e as proteínas podem ser expressas. Sistemas de expressão adequados são sistemas procarióticos ou eucarióticos. O ADN que codifica para a proteína mutada é, por exemplo, transformado num vector apropriado, por exemplo num vector de expressão, e incorporado numa célula hospedeira por meio de transformação, transfecção ou infecção. A ligação com

sequências regulatórias, que comandam especificamente a expressão do ADN mutado heterólogo, é evidentemente vantajosa.

Como célula hospedeira pode utilizar-se uma célula hospedeira de um eucarionte superior, por exemplo uma célula de mamífero, ou uma célula hospedeira de um eucarionte inferior, por exemplo uma célula de levedura, ou uma célula de procarionte, por exemplo uma célula bacteriana. Um exemplo de uma célula hospedeira bacteriana possível é *E. coli* ou *B. subtilis*. Também é possível um sistema de tradução livre de células para a preparação das proteínas por utilização de ARN que deriva do ADN da presente invenção. Os sistemas de expressão e de clonagem apropriados estão descritos em diferentes livros de texto para a biologia molecular, a biotecnologia e a tecnologia genética. São exemplos para este fim Sambrook *et al.*, 1989 e Ausubel *et al.*, 1994.

A presente invenção apresentada em geral é em seguida elucidada mais em pormenor por meio de um exemplo de realização e dos desenhos anexos. O exemplo deve ser entendido como uma possível forma da invenção e a invenção não é limitada por esta forma de realização especial.

As figuras em anexo representam:

Fig. 1: Oligonucleótidos para a montagem dos mutantes da cristalina gama.

Fig. 2: Representação esquemática da montagem de oligonucleótidos e PCR subsequente em pérolas magnéticas (MB) carregadas de estreptavidina. As

localizações caracterizadas por X marcam as posições de aminoácidos submetidas a processo aleatório.

Fig. 3: Representação esquemática da amplificação da região não submetida a mutagénese da cristalina gama-II.

Fig. 4: Oligonucleótidos para a amplificação da região não submetida a mutagénese da cristalina gama-II.

Fig. 5: Representação esquemática do bloco integrado de expressão 5E- pCANTAB da cristalina gama-II. g3-SS: Sequência peptídica de sinal da proteína fágica G3; E-Tag: 11 aminoácidos para a detecção imunológica; fd Gen 3: proteína 3 *minor coat* dos fagos filamentosos M13.

Fig. 6: ELISA de fagos policlonais com fagos concentrados depois da 3.^a lavagem de bateia. As placas de microtitulação foram revestidas com o conjugado BSA-17-hemissuccinato de beta-estradiol ou, como controlo, apenas com BSA. São representados lado a lado a ligação dos cristalina gama-II-fagos de tipo selvagem (GC-WT), dos fagos do banco de partida (GCUC-1) e dos fagos concentrados, por lavagem em bateia repetida, (fagos E-17) ao respectivo antigénio.

Fig. 7: Sequência parcial de ADN do mutante 12A de cristalina gama-II que se liga a BSA-17-hemissuccinato de estradiol (Mu 12A) no fagemídeo pGCKT 8-3 ou do tipo selvagem de cristalina gama-II (WT) em pCANTAB 5E. Os *itálicos* e os *sublinhados* são os locais de corte introduzidos Sfi I (5') ou Bst EII (3') marcados. Os

codões das posições dos aminoácidos do processo aleatório são impressos em negrito.

Fig. 8: Sequências de aminoácidos derivadas do mutante 12A de cristalina gama-II que se liga a BSA-17-hemissuccinato de estradiol (Mu 12A) e do tipo selvagem de cristalina gama-II (WT) após expressão nos fagemídeos e cisão do peptídeo de sinal. As posições de aminoácidos do processo aleatório são caracterizadas a negrito e os aminoácidos realmente permutados são caracterizados a negrito e sublinhado. Os aminoácidos introduzidos adicionalmente por meio do local de corte Sfi I N-terminal e a fusão E-Tag C-terminal são representados em itálico e sublinhados.

Fig. 9: Sequência do iniciador utilizado para a clonagem de Mu 12A e cristalina gama-II no vector pET-20b.

Fig. 10: Sequência proteica derivada do mutante que se liga a BSA-17-estradiol 12A e da cristalina gama-II após expressão em pET-20b. As posições de aminoácidos do processo aleatório são caracterizadas a negrito e os aminoácidos realmente permutados são caracterizados a negrito e sublinhado. Os aminoácidos C-terminais introduzidos adicionalmente por meio de clonagem incluindo os 6 resíduos de histidina são representadas em itálico e sublinhados.

Fig. 11: Ligação dependente da concentração do mutante 12A no conjugado BSA-17-hemissuccinato de beta-estradiol. Foi investigada a ligação do mutante (12A) e da cristalina

gama-II (WT) ao conjugado (BSA-estr. 17) e como controlo a BSA.

Fig. 12: Estabilidade do mutante 12A perante o agente desnaturante guanidina. São representados os máximos de emissão após incubação das proteínas purificadas do mutante 12A e da cristalina gama-II com diferentes concentrações de guanidina e após tempos diferentes.

Fig. 13: Espectro de emissão de fluorescência do tipo selvagem da cristalina gama e de mutante 12A em fosfato de Na 50 mM, pH 6,5. O sinal de fluorescência (Fig. 13A) foi medido a um comprimento de onda de estimulação de 280 nm. A concentração de proteína perfez 100 µg/mL. A Fig. 13B apresenta os espectros de absorção das amostras proteicas utilizadas para a medição da fluorescência. A absorção foi determinada numa cubeta com 1 cm de espessura de percurso óptico.

EXEMPLO

Preparação de um mutante de cristalina gama com ligação específica à hormona estradiol

O projecto de proteínas em folha plissada beta de tipo novo com propriedades de ligação a antigénios foi mostrado por meio do isolamento de um mutante da cristalina gama-B de bovino (gama-II), que se liga de modo específico à hormona estradiol. Por meio da alteração dirigida de posições de aminoácidos seleccionadas de uma folha plissada beta exposta à superfície, foi preparada uma proteína estável de tipo novo com estrutura em

folha plissada beta e propriedades de ligação específicas. Após selecção da região apropriada ou dos aminoácidos apropriados para uma mutagénese na folha plissada beta, segue-se uma mutagénese específica em relação a locais ao nível do ADN, a preparação de um banco de mutantes de folha plissada beta num fagemídeo, o qual possibilita a expressão e a selecção subsequente de propriedades de ligação de tipo novo dos mutantes no sistema de *Phage Display*. Os mutantes isolados foram comparados no que se refere às suas novas propriedades com a proteína cristalina gama-II de partida.

Seleccção de uma região apropriada para a mutagénese na cristalina gama

Com base na estrutura de raios X da cristalina gama-II (Wistow *et al.*, 1983), seleccionou-se o domínio N-terminal da cristalina gama-II (Acc. M16894) para uma mutagénese. No total foram identificados aí oito aminoácidos, que formam um segmento de superfície contínuo. Os aminoácidos seleccionados são componentes de uma folha plissada beta e não devem contribuir decisivamente para a conservação da estrutura. Trata-se de posições de aminoácidos que são acessíveis ao solvente e em consequência também aos possíveis parceiros de ligação. Os oito aminoácidos Lys 2, Thr 4, Tyr 6, Cys 15, Glu 17, Ser 19, Arg 36 e Asp 38 abrangem uma área de cerca de 6,1% da superfície total da proteína.

Preparação de um pool de ADN em genes mutados da cristalina gama-II

Por meio de uma mutagénese dirigida a um local, submeteram-se a um processo aleatório as oito posições de aminoácidos. Deste modo é possível formar $2,6 \times 10^{10}$ diferentes espécies proteicas. O domínio a submeter a mutagénese foi obtido ao nível do ADN por meio de depósito conjunto de oligonucleótidos individuais. Em seguida, efectuou-se a clonagem num fagemídeo construído no sistema de *Phage Display* para a selecção.

Montagem de oligonucleótidos

Para a mutagénese, foram montados numa fase sólida 227 pb, que continham o domínio 5' dos mutantes de cristalina gama com as oito posições de aminoácidos submetidas ao processo aleatório bem como locais de corte por restrição apropriados. No total foram, para este fim, utilizados 10 oligonucleótidos individuais, dos quais três continham as posições de aminoácidos submetidas ao processo aleatório (Fig. 1). Nas 8 posições a submeter a mutagénese, foi utilizada na síntese de iniciadores a mistura de nucleótidos NN(T/G), de modo a que teoricamente numa posição resultam 32 diferentes codões (cf. Nord *et al.*, 1997). Para o início da montagem, depositaram-se oligonucleótidos tratados com biotina em pérolas magnéticas carregadas de estreptavidina (MBs) da Firma Dynal (M-280). Após vários passos de depósito, ligação e polimerase, foi possível amplificar o *pool* reunido na fase sólida nas regiões submetidas a mutagénese da cristalina gama por meio de PCR (Fig. 2). Os produtos de PCR com cerca de 250 pb de comprimento continham um local de corte Sfi I 5' e um local de corte Bst EII 3'.

Todos os oligonucleótidos utilizados para a montagem foram ajustados a uma concentração de 100 pmol/ μ L. Em primeiro lugar foram reunidos os iniciadores GCLIE1B e GCLIE2P. Para este fim, utilizaram-se em cada caso 4 μ L do iniciador com 36 μ L do tampão de lavagem e de ligação (tampão WB: NaCl 1 M, tris-HCl 10 mM a pH 7,5, EDTA 1 mM) e incubou-se durante 5 min a 70 °C. Após reunião dos dois iniciadores e incubação adicional de 5 minutos a 70 °C, arrefeceu-se a mistura de iniciadores lentamente até à temperatura ambiente. Misturaram-se 4 μ L do híbrido de iniciadores GCLIE1B/GCLIE2P com 56 μ L de tampão WB e adicionou-se a 300 μ g das MBs carregadas com estreptavidina que tinham sido previamente lavadas com tampão de lavagem e de ligação. Após uma incubação de 15 minutos à temperatura ambiente, efectuou-se uma lavagem das MBs com tampão de WB e TE (tris-HCl 10 mM a pH 7,5, EDTA 1 mM). Às MBs acopladas ao 1.º híbrido de iniciadores, adicionou-se um fragmento em ponte de iniciador, o qual foi preparado como se segue: misturaram-se 4 μ L do iniciador GCLIB4P ou GCLI5P com 36 μ L de tampão de ligação 1 x da Firma GIBCO BRL (tris-HCl 50 mM a pH 7,6, MgCl₂ 10 mM, ATP 1 mM, DTT 1 mM, 5% (p/v) de polietilenoglicol-8000). Após uma incubação de 5 minutos a 70 °C, reuniram-se as duas misturas reaccionais, incubou-se durante mais 5 min a 70 °C e arrefeceu-se até à temperatura ambiente. À mistura adicionaram-se 4 μ L de GCLI3P e 16 μ L de tampão de ligação 1 x, que previamente tinham novamente sido incubados durante 5 min a 70 °C. Após adição de 12 unidades de ligase de ADN T4 (Firma GIBCO BRL) e de 8 μ L de tampão de ligação 1 x, a mistura reaccional foi incubada durante 1 h à temperatura ambiente. Trataram-se 12 μ L deste fragmento em ponte de GCLIE3P/GCLIB4P/GCLI5P com 54 μ L de tampão de ligação 1 x bem como 6 unidades de ligase, adicionou-se às MBs lavadas, que continham o primeiro híbrido de iniciadores e incubou-se

durante 1 h à temperatura ambiente. Após a reacção de ligação, lavaram-se as MBs duas vezes com tampão TE e retomaram-se em 64 µL de tampão de ligação 1 x com 8 µL de ligase. As MBs foram então tratadas com 8 µL da mistura de iniciadores reunida GCLI6P/GCLIB7P, cuja montagem tinha sido efectuada previamente de modo análogo ao de GCLIB4P/GCLI5P. A ligação foi novamente efectuada durante 1 h à temperatura ambiente. Após uma lavagem dupla das MBs em tampão TE, adicionam-se 12 µL do segundo fragmento em ponte GCLIB8P/GCLIE9P/GCLIE10 e ligou-se durante 1 h. A preparação do 2.º fragmento em ponte foi efectuada de modo análogo ao do 1.º fragmento em ponte, em que em primeiro lugar se reuniram GCLIE9P e GCLIE10 e num segundo passo se ligaram com GCLI8P. As MBs com os iniciadores imobilizados são então novamente lavadas com tampão TE. A reacção subsequente de polimerase de ADN e ligase preencheu as lacunas na segunda cadeia. As MBs são para este fim incubadas durante 30 min a 37 °C na seguinte mistura tampão: 52,5 µL de H₂O, 6 µL de tampão L da Firma Boehringer (tris-HCl 100 mM a pH 7,5, MgCl₂ 100 mM, ditioeritritol 10 mM), 0,5 µL de dNTP's (25 mM de cada dNTP) e 1 µL de 2 unidades de fragmento de Klenow (Firma Boehringer). A reacção de ligação foi terminada após lavagem dupla das MBs com tampão TE durante 1 h à temperatura ambiente. Numa mistura reaccional de 100 µL encontram-se 10 unidades de ligase. Após um passo duplo de lavagem com tampão TE, a cadeia de ADN não ligada por ligação covalente às MBs foi removida por meio de tratamento com 40 µL de NaOH 0,1 M durante 30 s e as MBs foram ressuspensas em 60 µL de TE. A PCR para a amplificação do banco foi efectuada com as MBs como molde. A reacção de PCR (50 µL) foi realizada como se segue: 6 µL de MBs, 5 µL de tampão de reacção de PCR 10 x da Firma Stratagene (KCl 100 mM, (NH₄)₂SO₄ 100 mM, tris-HCl 200 mM a pH 8,75, MgSO₄ 20 mM, 1% de Triton X-100, 1 mg/mL de BSA), 1 µL (2,5 unidades) de polimerase Pfu-DNA (Firma Stratagene), 0,5

μL de dNTP's (25 mM de cada dNTP), 0,35 μL de GCLIE1B, 0,35 μL de GCLIA11B e 36,8 μL de H_2O . A PCR foi efectuada em 35 ciclos com uma hibridização com o iniciador a 55 °C durante 1 min, uma reacção de polimerase a 72 °C durante 1,5 min, uma desnaturação a 95 °C durante 1 min e uma reacção de polimerase final durante 5 min a 72 °C.

Preparação do fagemídeo pGCKT 8-3

Partindo do fagemídeo pCANTAB 5E (Kit-PRAS da Firma Pharmacia Biotech), construiu-se um derivado do fagemídeo para a clonagem do banco de mutantes de cristalina gama-II. O domínio 3' total da cristalina gama-II (domínio C-terminal) e o domínio 5' não submetido a mutagénesse foram amplificados por meio de PCR com utilização do plasmídeo pGII (Mayr *et al.*, 1994) como molde e dos iniciadores GCFORNOT e GCBACKSfiBst (Fig. 3, 4).

Os locais de corte Sfi I- (GCBACKSfiBst) ou Not I introduzidos por meio do iniciador possibilitam a inserção do produto da PCR no fagemídeo pCANTAB 5E. Com o iniciador GCBACKSfiBst integrou-se adicionalmente um local de corte Bst EII no gene da cristalina gama, que possibilita a clonagem do fragmento de ADN de cristalina gama mutado. A introdução de novo do local de corte não provoca uma alteração da sequência de aminoácidos na cristalina gama-II. O produto da PCR foi clonado após sequenciação como fragmento Sfi I/Not I no fagemídeo pCANTAB 5E cortado por Sfi I/Not I. O fagemídeo pGCKT8-3 assim construído foi o ponto de partida para a preparação do banco de *Phage Display* da cristalina gama-II.

Preparação do banco de Phage Display da cristalina gama e clonagem da cristalina gama-II de tipo selvagem

O fagemídeo pGCKT 8-3 foi cortado com as enzimas de restrição Bst EII e Sfi I e foi submetido a um tratamento com fosfatase (fosfatase de *shrimps*, Firma USB). O ADN foi separado por electroforese em gel após uma única cisão, as fracções de vector cindidas foram cortadas e isoladas por meio de electroeluição a partir dos géis de agarose. Antes de cada tratamento enzimático subsequente efectuou-se uma extracção com fenol/clorofórmio e uma precipitação do ADN com glicogénio. O pool de fragmentos de ADN amplificado por meio de PCR, que continha a região mutada da cristalina gama-II, foi cindido com as enzimas de restrição Sfi I e Bst EII. Para a ligação dos produtos de PCR no fagemídeo anteriormente preparado pGCKT 8-3, utilizaram-se no total 440 ng de fagemídeo e 110 ng do produto de PCR. As ligações foram efectuadas com um total de 44 unidades de ligase de ADN T4 (Firma GIBCO BRL) em 20 µL de mistura reaccional a 16 °C durante a noite. Após uma inactivação de 20 minutos da ligase a 70 °C, dessalinizaram-se as reacções de ligação durante 1 h por meio de diálise de gota. Cada 30 µL de células de *E. coli* TG1 electrocompetentes foram transformados com 15 µL cada da ligação dialisada. A preparação das células electrocompetentes e a transformação efectuaram-se como descrito no manual do *kit* de PRAS. As células transformadas foram depositadas sobre as placas SOBAG que continham glucose e ampicilina (100 µg/mL) (ver manual do *kit* PRAS, Firma Pharmacia-Biotech) e incubadas durante a noite a 30 °C. O banco GCUC-1 preparado abrangeu 250.000 clones originais. Os clones foram isolados com meio 2 x YT (ver manual dos *kits* de PRAS) que continha 1% de glucose e 20% de glicerol, divididos em alíquotas e conservados a -80 °C. O factor de amplificação do banco foi

determinado com 7×10^6 . A fracção de clones recombinantes no banco GCUC-1 perfez 97%. Por sequenciação dos clones seleccionados ocasionalmente, verificou-se que nas posições de aminoácidos submetidos a processo aleatório foram utilizados os codões com a variância esperada. Por meio de análise de Western-Blot foram detectados no banco taxas de expressão de 30-60%.

Para as experiências de controlo, amplificou-se o ADN da cristalina gama-II com os iniciadores GCFORNOT (5' GAGTCATTCTGCGGCCGCATAAAAATCCATCACCCGTCTTAAAGAACC 3') e GCBACKSFI (5' CATGCCATGACTCGCGGCCAGCCGGCCATGGGGAAGATCACTTTTTACGAGGAC 3') e o plasmídeo PGII (Mayr *et al.*, 1994) como molde. O produto de PCR sequenciado foi clonado após cisão com as endonucleases de restrição Not I e Sfi I no fagemídeo pCANTAB 5E igualmente cortado com Sfi I/Not I.

Construção do Phage Display e selecção de propriedades de ligação de novo tipo

Para a selecção de mutantes de cristalina gama quanto a propriedades de ligação, utilizou-se o sistema de *Phage Display* PRAS disponível no comércio da Firma Pharmacia-Biotech. No fagemídeo utilizado pCANTAB 5E (cristalina gama-II de tipo selvagem) e pGCKT 8-3 (mutantes cristalina forma) estão fundidos o terminal em N da cristalina gama com o peptídeo de sinal G3 e o terminal em C com um E-Tag, que possibilita a detecção imunológica das proteínas (Fig. 5). Em função da estirpe bacteriana utilizada, o codão *stop* âmbar (HB 2151 de *E. coli*) que se segue ao E-Tag é reconhecido e as cristalinas gamas são segregadas, após cisão do peptídeo de sinal, no periplasma ou não é lido (TG 1 de *E. coli*) e as cristalinas gamas são

sintetizadas como fusão numa proteína *minor coat* do fago filamentosso M13 e, após cisão do peptídeo de sinal, ancoradas na membrana plasmática interna das células de *E. coli*. Após adição de um fago auxiliar, foi possível formar fagos recombinantes que expõem à sua superfície as variantes da cristalina gama-II.

Optimização das condições de cultura para o banco GCUC-1 e os fagos de cristalina gama-II de tipo selvagem

Sob as condições de cultura descritas no manual de PRAS, não se obteve qualquer fago recombinante, em que tivesse sido possível detectar por meio de análise de Western-blot a proteína de fusão esperada (cristalina gama-II/proteína 3). Em primeiro lugar, por meio de adição de glutatião reduzido (GSH) durante a formação de fagos, foi alterado o estado de redox no periplasma das células bacterianas e, deste modo, foram produzidas condições favoráveis para a montagem de fagos. Com a utilização do clone de cristalina gama-II, foi possível detectar fagos recombinantes que possuíam a proteína de fusão apenas com adição de GSH. Com uma concentração de GSH mais elevada, aumentou também a fracção dos fagos de cristalina gama-II. A concentração óptima de GSH foi determinada com 8 mM. Uma causa para a má expressão da cristalina gama na superfície dos fagos sem adição de GSH podia ser a elevada fracção de cisteínas reduzidas (7) na cristalina gama. Com a presença de cristalina gama parcialmente desdobrada no periplasma poderia, sob as condições oxidativas aí prevalecentes, ocorrer uma dobragem deficiente e a formação de agregados por meio da formação de pontes de dissulfureto. Deste modo poderia também ser reduzida a montagem de fagos. Com a utilização de proteínas com cisteínas reduzidas no sistema de

Phage Display pode-se possivelmente em geral por meio de adição de GSH melhorar a formação de fagos recombinantes.

Processo de selecção com o banco de Phage Display GCUC1

Para a busca no banco GCUC-1, esterilizaram-se todos os aparelhos de vidro utilizados durante 4 h a 200 °C e o material de plástico com Helipur durante 1 h. A lavagem de bacia do banco GCUC-1 foi efectuada com BSA-17-hemissuccinato de beta-estradiol (Firma Sigma) como antigénio. Para a lavagem de bacia foram utilizadas como fase sólida placas de microtitulação (Maxisorp da Firma NUNC). O rigor do passo de lavagem foi aumentado no decurso das 3 fases de lavagem de bacia. Para a primeira cultura, inocularam-se 100 mL de meio 2 x YT com 2% de glucose e ampicilina (100 µg/mL) com 50 µL do banco GCUC-1. As bactérias foram cultivadas a 37 °C e 300 rpm até uma DO_{600} de 0,4. Em 10 mL desta cultura bacteriana foram adicionados 800 µL de fago auxiliar M13K07 (1×10^{11} pfu/mL, GIBCO BRL). Seguiu-se uma incubação a 37 °C durante 30 min sem agitação orbital e durante mais 30 min com ligeira agitação orbital (50 rpm). O agregado bacteriano foi obtido por meio de centrifugação durante 20 min, 1.500 rpm (Rotor Sorvall SS 34) à temperatura ambiente e retomado em 100 mL de meio 2 x YT com GSH 8 mM, 100 µg/mL de ampicilina e 50 µg/mL de canamicina. A formação dos fagos recombinantes foi efectuada por meio de cultura durante a noite a 30 °C e 300 rpm. O sobrenadante com os fagos recombinantes foi obtido por meio de centrifugação de 15 minutos por duas vezes a 10.800 g e uma filtração final (dimensão dos poros 0,45 µm). A concentração dos fagos foi efectuada por meio de adição de 1/5 de solução PEG/NaCl (20% de PEG-8000, NaCl 2,5 M) ao sobrenadante, uma incubação de uma

move sobre gelo, bem como centrifugação de 30 minutos em duas vezes a 4 °C e 3.300 g. O agregado de fagos obtido foi suspenso em 4 mL de PBS a pH 7,2 e os componentes celulares residuais foram removidos por meio de uma centrifugação (10 min, 11.600 g, temperatura ambiente). Para o processo de selecção (lavagem em bateia), misturou-se 1 mL dos fagos concentrados com 1 mL de uma solução a 6% de BSA (BSA a 6% em PBS, pH 7,2) e incubou-se durante 10 min à temperatura ambiente. Cada 100 µL dos fagos assim tratados foram adicionados aos poços de uma placa de microtitulação revestidos com antigénio previamente preparados como se segue. Revestiram-se placas de microtitulação NUNC-Maxisorp durante a noite com o antigénio BSA-17-hemissuccinato de beta-estradiol. No total, trataram-se 10 poços com 100 µL cada um da solução de antigénio (100 µg/mL em PBS pH 7,6). Os poços revestidos à temperatura ambiente durante a noite foram lavados três vezes com PBS, pH 7,6. A insaturação das posições de ligação livres foi efectuada por enchimento dos poços com uma solução de BSA a 3%/PBS, pH 7,2 durante 2 h à temperatura ambiente. Antes da adição dos fagos tratados com BSA, os poços foram lavados duas vezes com uma solução de PBS (pH 7,2). A lavagem em bateia foi efectuada por meio de movimentação ligeira durante 30 minutos da placa de microtitulação (20 rpm) e uma incubação subsequente de 90 minutos sem agitação à temperatura ambiente. Os fagos ligados de modo inespecífico foram removidos por meio de lavagem por 10 vezes com PBS, pH 7,2/0,1% de Tween-20 e lavagem por 10 vezes com PBS, pH 7,2. Os fagos ligados foram eluídos por meio de adição e incubação durante 10 minutos à temperatura ambiente de 100 µL de trietilamina 100 mM (preparada de fresco) por cada poço. Uma neutralização dos fagos básicos eluídos (1 mL) foi efectuada por meio de adição de 500 µL de tris-HCl 1 M a pH 7,4. Utilizaram-se 750 µL destes fagos para a infecção de 9 mL de células TG-1 depositadas sobre placas

com meio mínimo com uma DO_{600} de 0,4 - 0,5. Para este fim, as bactérias foram incubadas com os fagos durante 30 min a 37 °C. Foi possível confirmar ligações especialmente fortes, que não tinham sido removidas das placas de microtitulação por meio do tratamento com trietilamina, por meio de infecção directa de células TG-1. Para este fim, adicionaram-se a cada poço 100 μ L das células TG-1 recolhidas. Após uma incubação de 30 minutos a 37 °C, retomaram-se as células TG-1 infectadas e uniu-se a infecção com os fagos eluídos com as mesmas. As bactérias infectadas foram depositadas sobre placas SOBAG de 16 x 16 cm e incubadas durante a noite a 30 °C. Utilizaram-se alíquotas de 1 μ L dos fagos concentrados e eluídos para a determinação do título. Os clones bacterianos obtidos foram removidos das placas SOBAG com 12,5 mL de 2 x YT com 20% de glicerol. As 2^a e 3^a lavagens de bacia foram efectuadas de modo análogo ao da primeira com as alterações seguintes. A nova cultura de fagos foi efectuada com 20 μ L do banco recolhido em 20 mL de meio. Utilizaram-se 2 mL da cultura bacteriana recolhida para a infecção com o fago auxiliar (proporção bactérias/fagos: 1/20). A lavagem das placas de microtitulação foi efectuada na 2^a lavagem de bacia em primeiro lugar 15 vezes com PBS/Tween-20 e em seguida 10 vezes com PBS e na 3^a lavagem de bacia em primeiro lugar 20 vezes com PBS/Tween-20 e em seguida 10 vezes com PBS.

ELISA para a verificação da concentração e da ligação específica

A detecção da concentração de fagos que se ligam de modo específico ao antigénio foi efectuada com uma ELISA de fagos policlonais. Para além dos fagos eluídos, ensaiaram-se fagos do

banco de partida GCUC-1 e da cristalina gama-II de tipo selvagem como comparação. Revestiram-se placas NUNC- Maxisorp com 100 μ L de BSA-17-hemissuccinato de estradiol ou BSA numa concentração de 2 μ g/mL de PBS a pH 7,6 durante a noite à temperatura ambiente. Após lavagem por 3 vezes dos poços com PBS a pH 7,6, efectuou-se um bloqueamento durante 2 h a 37 °C com 3% de leite em pó seco (Glücksklee)/PBS a pH 7,2 e novamente lavagem (3 x) com PBS a pH 7,6. Os fagos não concentrados, recombinantes isolados após a cultura fágica foram em primeiro lugar bloqueados durante 1 h à temperatura ambiente (mistura 1 : 1 com leite em pó seco a 6% (Marvel) / PBS a pH 7,6. Carregaram-se 100 μ L dos fagos bloqueados por poço e incubaram-se durante 1 h a 37 °C. Após uma lavagem tripla de cada poço com PBS/Tween-20 e PBS, efectuou-se uma incubação com o conjugado anticorpo anti--M13-POD (Firma Pharmacia-Biotech, diluição 1 : 5000 em 3% de Glücksklee/PBS) durante 1 h a 37 °C. Após lavagem das placas realizou-se a detecção do anticorpo ligado a enzima com 100 μ L de substrato Immuno-Pure-TMB (Firma Pierce). A reacção corada foi feita parar por meio de adição de 100 μ L de H₂SO₄ 2 M e a extinção foi determinada a 450 nm. O resultado da concentração de fagos depois da 3^a lavagem em bacia, que se liga ao conjugado BSA-estradiol, está representado na Fig. 6.

Isolamento e caracterização de fagos individuais com ligação específica ao conjugado

A partir dos clones bacterianos obtidos após a 3.^a lavagem em bacia, seleccionaram-se 80 clones individuais. A partir dos clones, isolaram-se fagos e ensaiaram-se individualmente em ELISA de fagos monoclonais no que se refere à sua ligação a antigénios. A cultura de clones bacterianos individuais foi

efectuada em 100 μ L de meio YT x 2 com 2% de glucose e 100 μ g/mL de ampicilina durante a noite com ligeira agitação orbital (100 rpm) em placas de microtitulação de polipropileno (Firma NUNC). Diluíram-se 2 μ L desta cultura bacteriana 1 : 100 no mesmo meio e cultivou-se a 100 rpm até uma DO_{600} de 0,4 a 37 °C. Foram obtidos fagos, como descrito para o processo de selecção. Para a cultura de fagos, utilizaram-se placas de microtitulação de polipropileno de poços profundos da Firma TECAN. Para a ELISA, bloquearam-se 200 μ L do sobrenadante de fagos obtido após centrifugação (não concentrado) com 40 μ L de 6xPBS/Marvel a 18% durante 1 h à temperatura ambiente. Dos 80 clones ensaiados, 30 apresentavam uma ligação nítida dos fagos recombinantes a BSA-17-estradiol e não a BSA ensaiado em paralelo. Os fagos com a cristalina gama-II de tipo selvagem não apresentavam numa experiência de controlo qualquer ligação a BSA-17-estradiol. Sequenciaram-se 14 ligantes seleccionados com os iniciadores marcados com IRD 800 pCANR1LAB (5' CCATGATTACGCC-AAGCTTTGGAGCC 3') e GCLISEQ (5' CTGAAAGTGCCGGTGTGTTGC 3'). A sequenciação deu apenas num caso uma variante de cristalina gama (Mu 12A), que estava exclusivamente mutada nas oito posições de aminoácidos submetidas a processo aleatório. Uma série de clones apresentava transposições no quadro de leitura, que, com efeito, apresentavam alterações teóricas para uma proteína funcional, na realidade não exclusivamente na região esperada da cristalina gama. Estes mutantes *frame shift* não foram mais observados.

Caracterização do mutante em folha plissada beta 12A

A expressão da proteína de fusão proteína 3 *minor coat* Mu 12A sobre a superfície dos fagos recombinantes bem como a expressão de Mu 12A na estirpe de *E. coli* HB 2151 foi detectada

por meio de análises de Western-Blot com utilização do anticorpo anti-G3P ou do anticorpo anti-E-Tag (Firma Pharmacia-Biotech). A sequência de ADN do mutante 12A no fagemídeo pGCKT 8-3 e na cristalina gama-II de tipo selvagem está representada na Fig. 7. A sequência de ADN começa com o local de corte Sfi I, que já existia no fagemídeo de partida pCANTAB 5E, e termina no caso de pGCKT 8-3 com o local Bst EII introduzido de novo no gene da cristalina gama-II ou na sequência original no caso da cristalina gama-II de tipo selvagem. Na Fig. 8 estão representadas as sequências de aminoácidos daí derivadas. O processo aleatório de códons na posição de aminoácidos 36 não leva a uma alteração do aminoácido arginina nesta posição. A modelação informática do mutante 12A mostra que a permuta de aminoácidos não provoca grandes alterações na estrutura proteica em comparação com a proteína de partida. Com efeito, ocorre uma deslocação positiva da carga líquida:

Expressão de Mu 12A em pET-20b

Para uma caracterização pormenorizada do mutante 12A, foi efectuada uma transclonagem do ADN no plasmídeo pET-20b (Firma Novagen). O plasmídeo possibilita uma elevada expressão do ADN recombinante na estirpe de *E. coli* BL 21 bem como uma purificação fácil das proteínas estranhas. Os genes são aqui expressos sem peptídeo de sinal com uma fusão C-terminal de 6 resíduos de histidina. Os ADNs do mutante 12A e da cristalina gama-II de tipo selvagem foram amplificados por meio de PCR com utilização do correspondente ADN do fagemídeo e do iniciador GC 20bback12A/GC for 20B para o mutante 12A e GC 20bbackWT/GC 20b para o tipo selvagem (Fig. 9). Os fragmentos de PCR foram cindidos com as endonucleases de restrição Nde I e Bam HI e

clonados no vector pET cortado com Nde I/Bam HI. A sequência de aminoácidos teórica do mutante 12 A ou da cristalina gama-II após expressão em pET-20b está representada na Fig. 10. Os primeiros 10 aminoácidos N-terminais do mutante 12 A foram confirmados por meio de sequenciação N-terminal da proteína.

Cultura e purificação do mutante e do tipo selvagem em pET-20b

Para a investigação exacta das propriedades de ligação e da estabilidade dos mutantes, foram preparadas grandes quantidades de proteína do mutante 12A e do tipo selvagem. Transformaram-se células BL 21 com os plasmídeos pET-20b/Mu 12A ou pET-20b/cristalina gama-II. Para a cultura dos clones diluiu-se uma pré-cultura a 1 : 100 com meio LB/100 µg/mL de ampicilina e agitou-se a cultura a 37 °C até uma DO₆₀₀ de 0,5 a 200 rpm. A expressão da cristalina gama-II foi induzida por meio de adição de IPTG (1 mM de concentração final). A continuação da cultura foi efectuada durante a noite a 30 °C e 200 rpm. As células bacterianas foram recolhidas por meio de centrifugação a 4 °C, 6.000 rpm (rotor Sorvall GS3) durante 10 min. O agregado celular foi suspenso em 30 mL de PBS 2 x com adição de 150 µL de PMSF 200 mM e 10 µL de ADNase (Firma Boehringer). Efectuou-se uma dupla desintegração das células com a prensa Gaulin a 5,5 - 6,9 MPa (800 - 1000 psig). O sobrenadante com as proteínas solúveis foi obtido após centrifugação da suspensão celular durante 1 h a 4 °C e 20.000 rpm (rotor Sorval SS 34). A purificação da cristalina gama fundida com 6 resíduos de histidina foi efectuada através de cromatografia de afinidade a 4 °C. Equilibraram-se 8 mL de Ni-NTA com 50 mL de PBS 2 x/imidazole 10 mM. O sobrenadante com as proteínas solúveis foi então agitado

lentamente num agitador de rolos no processo descontínuo com o material da coluna equilibrado durante a noite. Após transvasar a suspensão para uma coluna de cromatografia, efectuou-se uma lavagem com PBS 2 x/imidazole 10 mM/NaCl 300 mM. A eluição da proteína ligada foi efectuada com PBS 2 x/imidazole 250 mM. À proteína eluída adicionou-se DTT (concentração final 10 mM). Por fim efectuaram-se 2 passos de diálise a 4 °C durante 8 h cada: 1° com tampão de fosfato de Na 100 mM a pH 6,0/EDTA 1 mM/DTT 1 mM e 2° com tampão de fosfato de Na 10 mM a pH 6,0/EDTA 1 mM. O sobrenadante obtido, após uma centrifugação final (4 °C, 30 min, 20.000 rpm com rotor Sorvall SS) continha a proteína purificada (Mu 12A ou cristalina gama-II), que foi utilizada para investigações de ligação e de estabilidade.

Para o ensaio da ligação específica do mutante 12A ao conjugado BSA-17-hemissuccinato de estradiol, efectuou-se uma ELISA, em que se utilizou concentrações crescentes da proteína purificada do mutante 12A-His-Tag. Como controlos utilizaram-se quantidades crescentes de cristalina gama-II de tipo selvagem (igualmente com His-Tag) bem como a ligação de ambas as proteínas purificadas em BSA. A ELISA dependente da concentração foi efectuada com placas NUNC-Tm. O revestimento de antigénio com o conjugado BSA-17-hemissuccinato de estradiol ou o BSA foi efectuado durante a noite à temperatura ambiente. O revestimento foi efectuado com 100 µL de antigénio em cada caso numa concentração de 20 µg/mL de PBS a pH 7,6. Após lavagem (2 x PBS a pH 7,6) e bloqueio das placas (3% de Marvel/PBS durante 2 h a 37 °C), adicionaram-se em cada caso 1 a 13 µL da solução mãe de proteína (concentração 0,63 mg/mL) a Mu 12A purificado ou cristalina gama-II no total de 100 µL de solução reaccional (PBS, 3% de Marvel, x µL de proteína) e incubou-se nos poços durante 2 h a 37 °C. Como anticorpos secundários utilizaram-se

os anticorpos tetra His da Firma Qiagen numa diluição de 1 : 3000 e o anticorpo anti-ratinho-POD (Firma Sigma) numa diluição de 1 : 2000. Os anticorpos foram diluídos com uma solução a 3% de Marvel/PBS, adicionaram-se 100 µL aos poços e incubou-se em cada caso durante 1 h a 37 °C. A reacção do substrato foi efectuada como descrito para a ELISA dos fagos policlonais. O resultado desta ELISA na Fig. 11 mostra claramente que apenas com concentrações crescentes do mutante 12A foram medidas extinções crescentes. Não se verificou qualquer subida com a cristalina gama-II. Igualmente não se observou qualquer reacção com BSA. Deste modo mostra-se a ligação específica do mutante 12A em comparação com a proteína de partida.

Para as investigações para a estabilidade, estabeleceram-se curvas de desnaturação por guanidina do mutante 12 A bem como da cristalina gama-II. Para este fim, incubaram-se as proteínas purificadas numa concentração final de 20 µg/mL com concentrações crescentes de guanidínio durante um e durante três dias a 20 °C. No total utilizaram-se 15 concentrações de guanidínio na gama de 0 - 5,5 M numa solução de DTT 1 mM/tampão de fosfato de Na 0,1 M a pH 6,0. De cada mistura reaccional estabeleceu-se após um ou três dias um espectro de fluorescência-emissão de 300 - 400 nm. O comprimento de onda de estimulação perfez 280 nm. Na Fig. 12 apresentam-se os máximos de emissão manifestados contra a concentração de guanidínio. A estabilidade da cristalina gama-II é mais elevada do que a do mutante 12A tanto a um como a três dias. Em comparação com as moléculas de anticorpos, o mutante 12A apresenta, no entanto, um estabilidade muito mais elevada.

Alteração das propriedades de fluorescência do mutante 12A

A fim de verificar se o mutante 12A apresentava propriedades de fluorescência alteradas em comparação com a proteína de tipo selvagem, foram recolhidos espectros de fluorescência. Para este fim, foram estimuladas alíquotas de 100 µg/mL de proteína de tipo selvagem ou do mutante 12A (em fosfato de Na 50 mM, a pH 6,0) a 280 nm e mediu-se a fluorescência num intervalo de comprimentos de onda de 300 e 400 nm numa cubeta com 1 cm de espessura de percurso óptico. A largura de fenda tanto para a estimulação como também para a emissão foi de 5 nm.

O sinal de fluorescência detectado apresentou tanto para o tipo selvagem como também para o mutante 12A um máximo a 329 nm. No entanto, a intensidade da fluorescência no mutante 12A, com apenas 86% de intensidade de sinal, era nitidamente inferior comparada com a cristalina gama do tipo selvagem (100%) (ver Fig. 13A).

O número total de fluoróforos é idêntico no mutante 12A e no tipo selvagem. No entanto, as alterações de sequência no mutante (Y → K na posição 8 e C → Y na posição 15) provocam uma alteração do sinal de fluorescência. A diferença na intensidade da fluorescência pode ser considerada consequência de o resíduo de tirosina na posição 8 ou 15 apresentar propriedades de fluorescência diferentes.

Literatura citada:

Bird, R. E., Hardman, K. D., Jacobson, J. W., Johnson, S., Kaufman, B. M., Lee, S.-M., Lee, T., Pope, H. S., Riordan, G. S. and Whitlow, M. (1988): Single-chain antigen-binding proteins. *Science* **242**, 423-426.

Brinkmann, U., di Carlo A., Vasmatzis, G., Kurochkina, N., Beers, R., Byungkook, L. and Pastan, I. (1997): Stabilization of a recombinant Fv fragment by base-100p interconnection and VH-VL permutation. *J. Mol. Biol.* **268**, 107-117.

Choo, Y. and Klug, A. (1995): Designing DNA-binding proteins on the surface of filamentous phage. *Curr. Opin. Biotechnol.* **6**, 431-436.

Colcher, D., Pavlinkova, G., Beresford, G., Booth, B. J., Choudhury, A. and Batra, S. K. (1998): Pharmacokinetics and biodistribution of genetically-engineered antibodies. *Q. J. Nucl. Med.* **42**, 225-241.

Cortese R., Monaci, P., Luzzago, A., Santini, C., Bartoll, F., Cortese, I., Fortugno, P., Galfre, G., Nicosia, A. and Felici, F. (1995): Selection of biologically active peptides by phage display of random peptide libraries. *Curr Opin. Biotechnol.* **6**, 73-80.

Cumber, J. A., Ward, E. S., Winter, G., Parnell, G. D. and Wawrzynczak, E. J. (1992): Comparative stabilities in vitro and in vivo of a recombinant mouse antibody FvCys fragment and a bisFvCys conjugate. *J. of Immunology* **149**, 120-126.

Glockshuber, R., Malia, M., Pfitzinger I. and Plückthun, A. (1990): A comparison of strategies to stabilize immunoglobulin Fv-fragments. *Biochemistry* **29**, 1362-1367.

Haaparanta T. and Huse W. D. (1995): A combinatorial method for constructing libraries of long peptides displayed by filamentous phage. *Mol. Diversity* **1**, 39-52.

Hanes, J. et al. (1997): *In vitro* selection and evolution of functional proteins by using ribosome display. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **94**, 4937-42.

Hazes, B. and Hol, W. G. J. (1992): Comparison of the hemocyanin β -barrel with other greek key β -barrels: possible importance of the " β -zipper" in protein structure and folding. *Proteins: Struct., Funct. Gen.* **12**, 278-298.

Hemmingsen, J. M., Gernert, K. M., Richardson, J. S. and Richardson, D. C. (1994): The tyrosine corner: a feature of most greek key β -barrel proteins. *Prot. Science* **3**, 1927-1937.

Holliger, H. and Winter G. (1993): Engineering bispecific antibodies. *Curr. Opin. Biotech.* **4**, 446-449.

de Kruif, J., Boel, E. and Logtenberg, T. (1995): Selection and application of human single chain Fv antibody fragments from a semi-synthetic phage antibody display library with designed CDR3 regions. *J. Mol. Biol.* **248**, 97-105.

Ku, J. and Schultz, P. G. (1995): Alternate protein frameworks for molecular recognition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 6552-6556.

Mayr, E.-M., Jaenicke, R. and Glockshuber, R. (1994): Domain interactions and connecting peptides in lens crystallins. *J. Mol. Biol.* **235**, 84-88.

Mandal, K., Chakrabart, B., Thomson, J. and Siezen, R. J. (1987): Structure and stability of β -crystallins. Denaturation and proteolysis behaviour. *J. Biol. Chem.* **262**, 8096-8102.

McConnell S. and Hoess R. H. (1995): Tendamistat as a scaffold for conformationally constrained phage peptide libraries. *J. Mol. Biol.* **250**, 460-470.

McConnell, S. J., Uveges, A. J., Fowlkes, D. M. and Spinella, D. G (1996): Construction and screening of M13 phage libraries displaying long random peptides. *Mol. Diversity* **1**, 165-176.

Nissim, A., Hoogenboom, H. R., Tomlinson, I. M., Flynn, G., Midgley, C., Lane, D. and Winter, G. (1994): Antibody fragments from a 'single pot' phage display library as immunochemical reagents. *EMBO J.* **13**, 692-698.

Nord K., Gunneriusson, E., Ringdahl, J., Stahl, S., Uhlen, M. and Nygren, P. A. (1997): Binding proteins selected from combinatorial libraries of an β -helical bacterial receptor domain. *Nat. Biotechnol.* **8**, 772-777.

Pack, P. and Plückthun, A. (1992): Miniantibodies: use of amphipathic helices to produce functional, flexibly linked dimeric Fv fragments with high avidity in *Escherichia coli*. *Biochemistry* **31**, 1579-1584.

Pantoliano, M. W., Bird, R. E., Johnson, S., Asel, E. D., Dodd, S. W., Wood, J. F. and Hardman, K. D. (1991): Conformational stability, folding, and ligand-binding affinity of single chain Fv immunoglobulin fragments expressed in *Escherichia coli*. *Biochemistry* **30**, 10117-10125.

Richardson, J. S., Richardson, D. C., Tweedy, N. B., Gernert, K. M., Quinn, T. P., Hecht, M. H., Erickson, B. W., Yan, Y., McClain, R. D., Donlan, M. E. and Surles, M. C. (1992): Looking at proteins: representations, folding, packing and design. *Biophys. J.* **63**, 1186-1209.

Riddle, D. S., Santiago, J. V., Bray-Hall, S. T., Doshi, N., Grantcharova, Q. Y and Baker, D. (1997): Functional rapidly folding proteins from simplified amino acid sequences. *Nature structural biology* **4**, 805-809.

Rudolph, R., Siebendritt, R., Nesslerer, G., Sharma, A. and Jaenicke, R. (1990): Folding of an all- β protein: independent domain folding in GammaBII-crystallin from calf eye lens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 4625-4629.

Slingsby, C. (1985): Structural variation in lens crystallins. *TIBS* **10**, 281-284.

Smith, G. P (1985): Filamentous Fusion Phage: Novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* **228**, 1315-1317.

Stahl, S. and Uhlen, M. (1997): Bacterial surface display: trends and progress. *TIBTECH* **15**, 185-192.

Wistow, G. J. and Piatigorsky, J. (1988): Lens crystallins: the evolution and expression of proteins for a highly specialized tissue. *Ann. Rev. Biochem.* **57**, 479-504.

Wistow, G. J., Turnell, B., Summers, L., Slingsby, C. Moss, D., Miller, L., Lindley, P. and Blundell, T. (1983): X-ray analysis of the eye lens protein γ -II-crystallin at 1.9 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **170**, 175-202.

Young, N. M., MacKenzie, C. R., Narang, S. A., Oomen, R. P. and Baenziger, J. E. (1995): Thermal stabilization of a single chain Fv antibody fragment by introduction of a disulphide bond. *FEBS Lett.* **377**, 135-139.

Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidmann, J. G., Smith, J. A. and Struhl, K. (1994): *Current protocols in molecular biology*. John Wiley & Sons, Inc.

Cramer, A., Dawes, G., Rodriguez, E., Jr., Silver, S. and Stemmer, W. P. (1997): Molecular evolution of an arsenate detoxification pathway by DNA shuffling. *Nat. Biotechnol.* **5**, 436-438.

Kuchner, O. and Arnold, F. H. (1997): Directed evolution of enzyme catalysts. *TIBTECH* **15**, 523-530.

Pannekoek, H., von Meijer M., Schleef, R. R., Loskutoff, d.J. and Barbas, C. F. (1993): Functional display of human plasminogen-activator inhibitor 1 (PAI-1) on phages: Novel perspectives for structure-function analysis by error prone DNA synthesis. *Gene* **128**, 135-140.

Sambrook, J., Maniatis, T. and Fritsch, E. F. (1989): *Molecular Cloning: A laboratory manual*. Cold spring Harbor. Cold Spring Harbour Laboratory Press, Nova Iorque.

Stemmer, W. P. C. (1994): Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling. *Nature* **370**, 389-391.

You, L. and Arnold, F. H. (1996): Directed evolution of subtilisin E in *Bacillus subtilis* to enhance total activity in aqueous dimethylformamide. *Protein Eng.* **1**, 77-83.

Zhang, J. H., Dawas, G. and Stemmer, W-P. (1997): Directed evolution of a fucosidase from a galctosidase by DNA shuffling and screening. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 4504-4509.

PROTOCOLO DE SEQUÊNCIAS

<110> Fiedler, Dr. Ulrike
Rudolph, Prof. Dr.
Rainer

<120> Projecto de proteínas em folhas plissadas beta com
propriedades de ligação específicas

<130> P12389

<140>

<141>

<150> DE 199 32 688.6

<151> 1999-07-13

<160> 22

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 45

<212> ADN

<213> Sequência sintética

<220>

<223> Descrição da sequência
sintética: oligonucleótido

<400> 1

cgcgcgcgtc tcacaaagat acatgcatg actcgcgcc cagcc

45

<210> 2

<211> 50

<212> ADN

<213> Sequência sintética

<220>

<223> Descrição da sequência sintética:
oligonucleótido

<400> 2

gccgcaggaa gtactggtga ccctggtagt tggggcgctc atacagcatc

50

<210> 3

<211> 41

<212> ADN

<213> Sequência sintética

<220>

<223> Descrição da sequência sintética:
oligonucleótido

<400> 3

ccatcagccc catcagcgaa ctttgccgca ggaagtactg g

41

<210> 4

<211> 48

<212> ADN

<213> Sequência sintética

<220>

<223> Descrição da sequência sintética:
oligonucleótido

<400> 4

gagtcattct gcggccgcat aaaaatccat caccgtctt aaagaacc

48

<210> 5

<211> 59

<212> ADN

<213> Sequência sintética

<220>

<223> Descrição da sequência sintética:
oligonucleótido

<400> 5
gcggcccagc cggccgctgc tggatgctgt atgagcgccc caactaccag ggtcaccag 59

<210> 6

<211> 55

<212> ADN

<213> Sequência sintética

<220>

<223> Descrição da sequência sintética:
oligonucleótido

<400> 6

catgccatga ctcgcgggccc agccggccat ggggaagatc actttttacg aggac 55

<210> 7

<211> 26

<212> ADN

<213> Sequência sintética

<220>

<223> Descrição da sequência sintética:
oligonucleótido

<400> 7

ccatgattac gccaaagcttt ggagcc 26

<210> 8

<211> 21

<212> ADN

<213> Sequência sintética

<220>

<223> Descrição da sequência sintética:
oligonucleótido

<400> 8
 ctgaaagtgc cgggtgtgttg c 21

<210> 9
 <211> 176
 <212> ADN
 <213> Bos sp.

<400> 9
 ggcccagccg gccatgggga ggatcaagtt taaagaggac cggggcttcc agggccacta 60
 ttacagttgc aatagcgact gcccacact gcagccctat ttcagccgct gtaactccat 120
 caggggtgctg agcggctgct ggatgctgta tgagcgcccc aactaccagg gtcacc 176

<210> 10
 <211> 176
 <212> ADN
 <213> Bos sp.

<400> 10
 ggcccagccg gccatgggga agatcacttt ttacgaggac cggggcttcc agggccactg 60
 ctacgagtgc agcagcagct gcccacact gcagccctat ttcagccgct gtaactccat 120
 ccgctgggac agcggctgct ggatgctgta tgagcgcccc aactaccagg gccacc 176

<210> 11
 <211> 54
 <212> ADN
 <213> Sequência sintética

<220>
 <223> Descrição da sequência sintética:
 oligonucleótido

<400> 11
 ccccatggcc ggctgggccc cgagtcattg catgtatctt tgtgagacgc gcgcg 54

<210> 12
 <211> 36
 <212> ADN

<213> Sequência sintética

<220>

<223> Descrição da sequência sintética:
oligonucleótido

<400> 12
ggccatgggg nnkatcnkt ttnkgagga ccgggg 36

<210> 13

<211> 24

<212> ADN

<213> Sequência sintética

<220>

<223> Descrição da sequência sintética:
oligonucleótido

<400> 13
gtggccctgg aagccccggt cctc 24

<210> 14

<211> 44

<212> ADN

<213> Sequência sintética

<220>

<223> Descrição da sequência sintética:
oligonucleótido

<400> 14
cttccagggc cacnktacn nktgcnnkag cgactgcccc aacc 44

<210> 15

<211> 20

<212> ADN

<213> Sequência sintética

<220>

<223> Descrição da sequência sintética:
oligonucleótido

<400> 15
tgcagcccta tttcagccgc 20

<210> 16
<211> 47
<212> ADN
<213> Sequência sintética

<220>
<223> Descrição da sequência sintética:
oligonucleótido

<400> 16
gatggagtta cagcggctga aatagggctg caggttgggg cagtcgc 47

<210> 17
<211> 45
<212> ADN
<213> Sequência sintética

<220>
<223> Descrição da sequência sintética:
oligonucleótido

<400> 17
tgtaactcca tcnnkgtggn kagcggctgc tggatgctgt atgag 45

<210> 18
<211> 37
<212> ADN
<213> Sequência sintética

<220>
<223> Descrição da sequência sintética:
oligonucleótido

<400> 18
cgcccccaact accaggggtca ccagtacttc ctgcggc

37

<210> 19
<211> 198
<212> PRT
<213> Bos sp.

<400> 19

Ala Ala Gln Pro Ala Met Gly Arg Ile Lys Phe Lys Glu Asp Arg Gly
1 5 10 15
Phe Gln Gly His Tyr Tyr Ser Cys Asn Ser Asp Cys Pro Asn Leu Gln
20 25 30
Pro Tyr Phe Ser Arg Cys Asn Ser Ile Arg Val Leu Ser Gly Cys Trp
35 40 45
Met Leu Tyr Glu Arg Pro Asn Tyr Gln Gly His Gln Tyr Phe Leu Arg
50 55 60
Arg Gly Asp Tyr Pro Asp Tyr Gln Gln Trp Met Gly Phe Asn Asp Ser
65 70 75 80
Ile Arg Ser Cys Arg Leu Ile Pro Gln His Thr Gly Thr Phe Arg Met
85 90 95
Arg Ile Tyr Glu Arg Asp Asp Phe Arg Gly Gln Met Ser Glu Ile Thr
100 105 110
Asp Asp Cys Pro Ser Leu Gln Asp Arg Phe His Leu Thr Glu Val His
115 120 125
Ser Leu Asn Val Leu Glu Gly Ser Trp Val Leu Tyr Glu Met Pro Ser
130 135 140
Tyr Arg Gly Arg Gln Tyr Leu Leu Arg Pro Gly Glu Tyr Arg Arg Tyr
145 150 155 160
Leu Asp Trp Gly Ala Met Asn Ala Lys Val Gly Ser Leu Arg Arg Val
165 170 175
Met Asp Phe Tyr Ala Ala Ala Gly Ala Pro Val Pro Tyr Pro Asp Pro
180 185 190
Leu Glu Pro Arg Ala Ala
195

<210> 20
 <211> 198
 <212> PRT
 <213> Bos sp.

<400> 20

Ala Ala Gln Pro Ala Met Gly Lys Ile Thr Phe Tyr Glu Asp Arg Gly
 1 5 10 15
 Phe Gln Gly His Cys Tyr Glu Cys Ser Ser Asp Cys Pro Asn Leu Gln
 20 25 30
 Pro Tyr Phe Ser Arg Cys Asn Ser Ile Arg Val Asp Ser Gly Cys Trp
 35 40 45
 Met Leu Tyr Glu Arg Pro Asn Tyr Gln Gly His Gln Tyr Phe Leu Arg
 50 55 60
 Arg Gly Asp Tyr Pro Asp Tyr Gln Gln Trp Met Gly Phe Asn Asp Ser
 65 70 75 80
 Ile Arg Ser Cys Arg Leu Ile Pro Gln His Thr Gly Thr Phe Arg Met
 85 90 95
 Arg Ile Tyr Glu Arg Asp Asp Phe Arg Gly Gln Met Ser Glu Ile Thr
 100 105 110
 Asp Asp Cys Pro Ser Leu Gln Asp Arg Phe His Leu Thr Glu Val His
 115 120 125
 Ser Leu Asn Val Leu Glu Gly Ser Trp Val Leu Tyr Glu Met Pro Ser
 130 135 140
 Tyr Arg Gly Arg Gln Tyr Leu Leu Arg Pro Gly Glu Tyr Arg Arg Tyr
 145 150 155 160
 Leu Asp Trp Gly Ala Met Asn Ala Lys Val Gly Ser Leu Arg Arg Val
 165 170 175
 Met Asp Phe Tyr Ala Ala Ala Gly Ala Pro Val Pro Tyr Pro Asp Pro
 180 185 190
 Leu Glu Pro Arg Ala Ala
 195

<210> 21
 <211> 197
 <212> PRT
 <213> Bos sp.

<400> 21

Met Gly Arg Ile Lys Phe Lys Glu Asp Arg Gly Phe Gln Gly His Tyr
1 5 10 15
Tyr Ser Cys Asn Ser Asp Cys Pro Asn Leu Gln Pro Tyr Phe Ser Arg
20 25 30
Cys Asn Ser Ile Arg Val Leu Ser Gly Cys Trp Met Leu Tyr Glu Arg
35 40 45
Pro Asn Tyr Gln Gly His Gln Tyr Phe Leu Arg Arg Gly Asp Tyr Pro
50 55 60
Asp Tyr Gln Gln Trp Met Gly Phe Asn Asp Ser Ile Arg Ser Cys Arg
65 70 75 80
Leu Ile Pro Gln His Thr Gly Thr Phe Arg Met Arg Ile Tyr Glu Arg
85 90 95
Asp Asp Phe Arg Gly Gln Met Ser Glu Ile Thr Asp Asp Cys Pro Ser
100 105 110
Leu Gln Asp Arg Phe His Leu Thr Glu Val His Ser Leu Asn Val Leu
115 120 125
Glu Gly Ser Trp Val Leu Tyr Glu Met Pro Ser Tyr Arg Gly Arg Gln
130 135 140
Tyr Leu Leu Arg Pro Gly Glu Tyr Arg Arg Tyr Leu Asp Trp Gly Ala
145 150 155 160
Met Asn Ala Lys Val Gly Ser Leu Arg Arg Val Met Asp Phe Tyr Ser
165 170 175
Asp Pro Asn Ser Ser Ser Val Asp Lys Leu Ala Ala Ala Leu Glu His
180 185 190
His His His His His
195

<210> 22

<211> 197

<212> PRT

<213> Bos sp.

<400> 22

Met Gly Lys Ile Thr Phe Tyr Glu Asp Arg Gly Phe Gln Gly His Cys

1																			
				5						10									15
Tyr	Glu	Cys	Ser	Ser	Asp	Cys	Pro	Asn	Leu	Gln	Pro	Tyr	Phe	Ser	Arg				
			20					25					30						
Cys	Asn	Ser	Ile	Arg	Val	Asp	Ser	Gly	Cys	Trp	Met	Leu	Tyr	Glu	Arg				
		35					40					45							
Pro	Asn	Tyr	Gln	Gly	His	Gln	Tyr	Phe	Leu	Arg	Arg	Gly	Asp	Tyr	Pro				
	50					55					60								
Asp	Tyr	Gln	Gln	Trp	Met	Gly	Phe	Asn	Asp	Ser	Ile	Arg	Ser	Cys	Arg				
65					70					75					80				
Leu	Ile	Pro	Gln	His	Thr	Gly	Thr	Phe	Arg	Met	Arg	Ile	Tyr	Glu	Arg				
				85					90					95					
Asp	Asp	Phe	Arg	Gly	Gln	Met	Ser	Glu	Ile	Thr	Asp	Asp	Cys	Pro	Ser				
		100						105					110						
Leu	Gln	Asp	Arg	Phe	His	Leu	Thr	Glu	Val	His	Ser	Leu	Asn	Val	Leu				
		115					120					125							
Glu	Gly	Ser	Trp	Val	Leu	Tyr	Glu	Met	Pro	Ser	Tyr	Arg	Gly	Arg	Gln				
	130					135					140								
Tyr	Leu	Leu	Arg	Pro	Gly	Glu	Tyr	Arg	Arg	Tyr	Leu	Asp	Trp	Gly	Ala				
145					150					155					160				
Met	Asn	Ala	Lys	Val	Gly	Ser	Leu	Arg	Arg	Val	Met	Asp	Phe	Tyr	Ser				
			165						170					175					
Asp	Pro	Asn	Ser	Ser	Ser	Val	Asp	Lys	Leu	Ala	Ala	Ala	Leu	Glu	His				
			180					185					190						
His	His	His	His	His															
		195																	

Lisboa, 3 de Novembro de 2006

REIVINDICAÇÕES

1. Processo para a preparação de uma proteína com estrutura em folha plissada β e propriedade de ligação semelhante à de anticorpos frente a um parceiro de ligação com os seguintes passos:
 - a) selecção de uma proteína com estrutura cristalina ou estrutura proteica em 3D conhecida a partir do grupo de cristalinas, esferulinas, proteínas de *stress* térmico, proteínas de choque hipotérmico, fibronectinas e proteínas em hélice β ;
 - b) selecção de um parceiro de ligação;
 - c) determinação dos aminoácidos expostos à superfície da proteína do passo a);
 - d) mutagénese do ADN que codifica para a proteína com estrutura em folha plissada β por meio de substituição, eliminação e/ou inserção de aminoácidos expostos à superfície em pelo menos duas cadeias β expostas à superfície de uma folha plissada β exposta à superfície, em que a estrutura em folha plissada β se conserva inalterada;
 - e) expressão dos mutantes obtidos no passo d) num sistema de expressão adequado;
 - f) contacto das proteínas obtidas no passo e) com um parceiro de ligação do passo b);
 - g) selecção e isolamento de proteínas mutadas, que se ligam aos parceiros de ligação seleccionados no passo b) com formação de uma propriedade de ligação nova ou melhorada semelhante às dos anticorpos,

em que por nova propriedade de ligação semelhante às dos anticorpos frente a um parceiro de ligação se deve entender que a proteína do passo a) sem a substituição, eliminação e/ou inserção não apresenta qualquer propriedade de ligação semelhante às dos anticorpos frente ao parceiro de ligação de b) e após a substituição, eliminação e/ou inserção apresenta uma nova propriedade de ligação semelhante às dos anticorpos frente ao parceiro de ligação de b), ou que a proteína do passo a) antes da substituição, eliminação ou inserção apresenta uma propriedade de ligação semelhante às dos anticorpos e após a substituição, eliminação ou inserção possui uma outra propriedade de ligação frente ao parceiro de ligação de b) nova ou melhorada.

2. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por serem submetidos a mutagénese aminoácidos expostos à superfície em, pelo menos, duas ou três cadeias beta expostas à superfície, ou por serem submetidas a mutagénese quatro ou mais cadeias beta expostas à superfície, ou por serem submetidos a mutagénese em 1 cadeia beta exposta à superfície um ou vários aminoácidos, ou por serem submetidos a mutagénese aminoácidos em mais do que 1 folha plissada β .
3. Processo de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado por serem submetidos a mutagénese aminoácidos expostos à superfície em três cadeias beta expostas à superfície em duas folhas plissadas beta antiparalelas expostas à superfície.

4. Processo de acordo com uma ou várias das reivindicações anteriores, caracterizado por se utilizar um cristalino de vertebrado, de preferência roedores, aves ou peixes.
5. Processo de acordo com uma ou várias das reivindicações anteriores, caracterizado por se utilizar uma cristalina alfa, beta ou gama, de um modo preferido uma cristalina gama.
6. Processo de acordo com uma ou várias das reivindicações anteriores, caracterizado por se utilizar uma proteína cristalina gama-II.
7. Processo de acordo com uma ou várias das reivindicações anteriores, caracterizado por a proteína ser submetida a mutagénese numa região da folha plissada beta acessível a solvente e/ou a um parceiro de ligação.
8. Processo de acordo com uma ou várias das reivindicações anteriores, caracterizado por a proteína ser submetida a mutagénese numa estrutura em folha plissada β de um domínio ou de uma subunidade da proteína.
9. Processo de acordo com uma ou várias das reivindicações anteriores, caracterizado por se utilizar uma cristalina gama-II, que foi obtida por meio de substituição, eliminação ou inserção de um ou vários dos aminoácidos Lys 2, Thr 4, Tyr 6, Cys 15, Glu 17, Ser 19, Arg 36 e Asp 38 na cristalina gama-II.
10. Processo de acordo com a reivindicação 9, caracterizado por a proteína apresentar uma especificidade de ligação para

estradiol ou para o respectivo conjugado BSA-17-hemissuccinato de β -estradiol.

11. Processo de acordo com uma ou várias das reivindicações anteriores, caracterizado por a proteína apresentar uma especificidade de ligação para estradiol ou para o respectivo conjugado BSA-17-hemissuccinato de β -estradiol, com a sequência de aminoácidos: SEQ ID NO. 19 ou SEQ ID N°. 21.
12. Processo de acordo com uma ou várias das reivindicações anteriores, caracterizado por se combinar com outras proteínas ou com substâncias não proteicas.
13. Processo de acordo com uma ou várias das reivindicações anteriores, caracterizado por a mutagénese abranger uma mutagénese de posições de aminoácidos específicas (mutagénese específica de um local) ou posições de aminoácidos inespecíficas (mutagénese aleatória) na folha plissada beta.
14. Processo de acordo com uma ou várias das reivindicações anteriores, caracterizado por os mutantes serem expressos no passo e) em células procarióticas ou eucarióticas, num sistema isento de células sob a forma de complexo com ribossomas ou sobre a superfície de células vegetais ou animais, células de leveduras ou fagos, vírus ou bactérias.
15. Processo de acordo com uma ou várias das reivindicações anteriores, caracterizado por no passo h), o gene que codifica para a proteína mutada do passo g) ser multiplicado e a proteína ser expressa.

16. Proteína com estrutura em folha plissada beta com uma especificidade de ligação para estradiol ou para o respectivo conjugado BSA-17-hemissuccinato de β -estradiol, em que a proteína, cuja estrutura cristalina é conhecida, ser uma cristalina gama-II, que foi obtida na por meio de substituição, eliminação ou inserção de um ou vários dos aminoácidos Lys 2, Thr 4, Tyr 6, Cys 15, Glu 17, Ser 19, Arg 36 e Asp 38 cristalina gama-II.

17. Proteína de acordo com a reivindicação 16, caracterizada por apresentar uma especificidade de ligação para estradiol ou para o respectivo conjugado BSA-17-hemissuccinato de β -estradiol, com a sequência de aminoácidos SEQ ID N°. 19 ou SEQ ID No. 21.

Lisboa, 3 de Novembro de 2006

GCLIE1B: Biotina-
 CGCGCGCGTCTCACAAAGATACATGCCATGACTCGCGGCCAGCC
 GCLIE2P: P-
 CCCCATGGCCGGCTGGGCCGCGAGTCATGGCATGTATCTTTGTGAGACGCGCGCG
 GCLIE3P: P- GGCCATGGGGNNKATCANNKTTTNNKGAGGACCGGG
 GCLIE4P: P- GTGGCCCTGGAAGCCCCGGTCCTC
 GCLIE5P: P-
 CTTCCAGGGCCACNNKTACNNKTGCNNKAGCGACTGCCCCAACC
 GCLIE6P: P- TGCAGCCCTATTTTCAGCCGC
 GCLIE7P: P-
 GATGGAGTTACAGCGGCTGAAATAGGGCTGCAGGTTGGGGCAGTCGC
 GCLIE8P: p-
 TGTAACTCCATCANNKGTGNNKAGCGGCTGCTGGATGCTGTATGAG
 GCLIE9P: P- CGCCCCAACTACCAGGGTCACCAGTACTTCCTGCGGC
 GCLIE10:
 GCCGCAGGAAGTACTGGTGACCCTGGTAGTTGGGGCGCTCATAACAGCATC
 GCLIA11B: Biotina- CCATCAGCCCCATCAGCGAACTTTGCCGCAGGAAGTACTGG

P: Fosfato N: A/C/G/T, K: T/G

Fig. 2

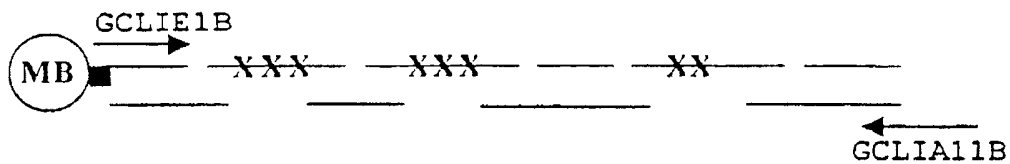


Fig. 3

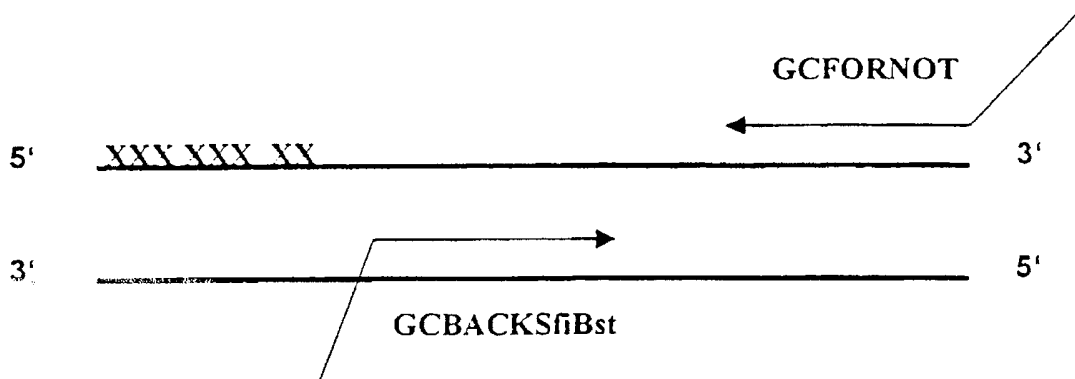


Fig. 4

GCFORNOT: 5' GAGTCATTCTGCGGCCGCATAAAAATCCATCACCCGTCTTAAAGAACC
3'

GCBACKSfiBst: 5'
GCGGCCAGCCGGCCGCTGCTGGATGCTGTATGAGCGCCCCAACTACCAGGGTCACC
AG 3'

Fig.5

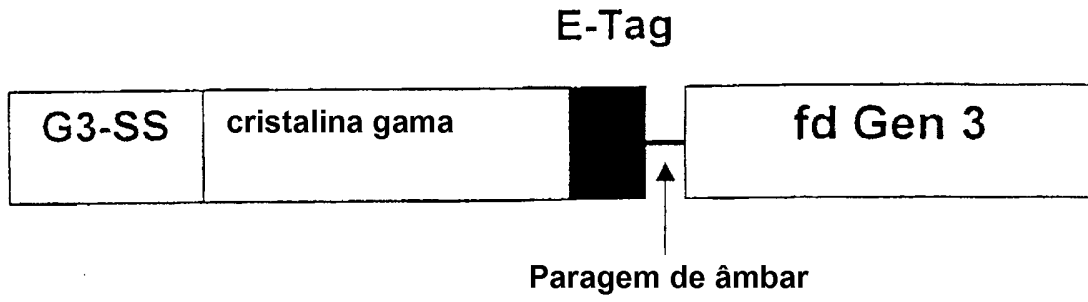


Fig. 6

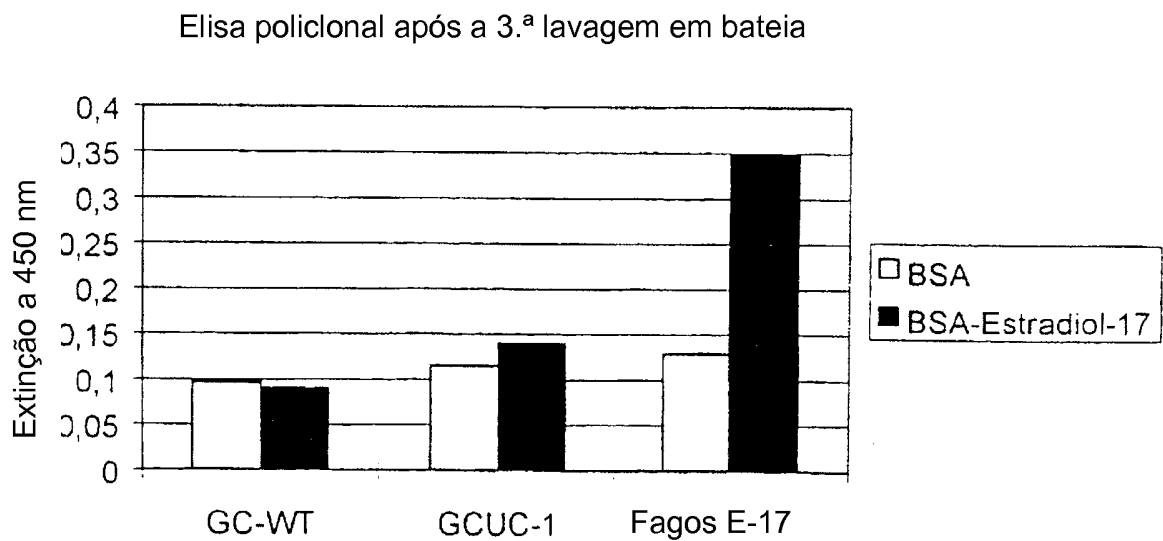


Fig. 7**Mu 12A:**

GGCCCAGCCGGCCATGGGGAGGATCAAGTTTTAAAGAGGACCGGGGCTTCCAGGGCCA
CTATTACAGTTGCAATAGCGACTGCCCAACCTGCAGCCCTATTTTCAGCCGCTGTAAC
CCATCAGGGTGCTGAGCGGCTGCTGGATGCTGTATGAGCGCCCCAACTACCAGGGTCA
CC

WT:

GGCCCAGCCGGCCATGGGGAAAGATCACTTTTTTACGAGGACCGGGGCTTCCAGGGCCA
CTGCTACGAGTGCAGCAGCGACTGCCCAACCTGCAGCCCTATTTTCAGCCGCTGTAAC
TCCATCCGCGTGGACAGCGGCTGCTGGATGCTGTATGAGCGCCCCAACTACCAGGGC
CACC

Fig. 8**Mu 12A:**

AAQPAMGRIKFKEDRGFQGHYSCNSDCPNLQPYFSRCNSIRVLSGCWMLYERP NYQGH
QYFLRRGDYDPDYQQWMGFNDSIRSCRLIPQHTGTFRMRIYERDDFRGQMSEITDDCPSLQ
DRFHLTEVHSLNVLEGSWWLYEMPSYRGRQYLLRPGEYRRYLDWGAMNAKVGLRRVMD
FYAAAGAPVPYPDPLEPRAA

WT:

AAQPAMGKITFYEDRGFQGHHCYECSSDCPNLQPYFSRCNSIRVDSGCWMLYERP NYQGH
QYFLRRGDYDPDYQQWMGFNDSIRSCRLIPQHTGTFRMRIYERDDFRGQMSEITDDCPSLQ
DRFHLTEVHSLNVLEGSWWLYEMPSYRGRQYLLRPGEYRRYLDWGAMNAKVGLRRVMD
FYAAAGAPVPYPDPLEPRAA

Fig. 9

GC 20backWT: 5' GGG AATTCCATATGGGGAAAGATCACTTTTTTACG 3'
 GC 20back12A: 5' GGG AATTCCATATGGGGAGGATCAAGTTTTAAAG 3'
 GC for 20b: 5' CGCGGATCCGAATAAAAATCCATCACCCG 3'

Fig. 10

Mu 12A-HIS:

MGRIKFKEDRGFQGHY^{SC}NSDCPNLQPYFSRCNSIRVLSGCWMLYERP^{NY}QGHQYFLR
 RGDY^{PDY}QQWGMGFNDSIR^{SC}RLIPQHTGTFRMRIYERDDFRGQMSEITDDCPSLQDRFHL
 TEVHSLNVLEGSWVLYEMP^{SYR}RGRQYLLRPGEYRRYLDWGAMNAKVGSLRRVMDFY^{SDP}
NSSSVDKLAAALEHHHHHH

WT-HIS:

MGKITFYEDRGFQGH^{CYE}CSSDCPNLQPYFSRCNSIRVDSGCWMLYERP^{NY}QGHQYFLR
 RGDY^{PDY}QQWGMGFNDSIR^{SC}RLIPQHTGTFRMRIYERDDFRGQMSEITDDCPSLQDRFHL
 TEVHSLNVLEGSWVLYEMP^{SYR}RGRQYLLRPGEYRRYLDWGAMNAKVGSLRRVMDFY^{SDP}
NSSSVDKLAAALEHHHHHH

Fig. 11

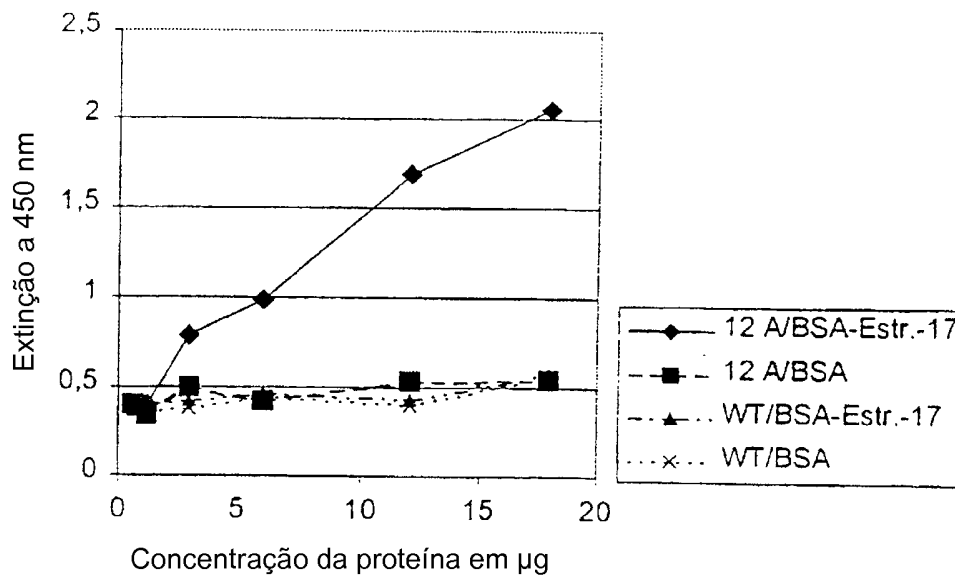


Fig. 12 A

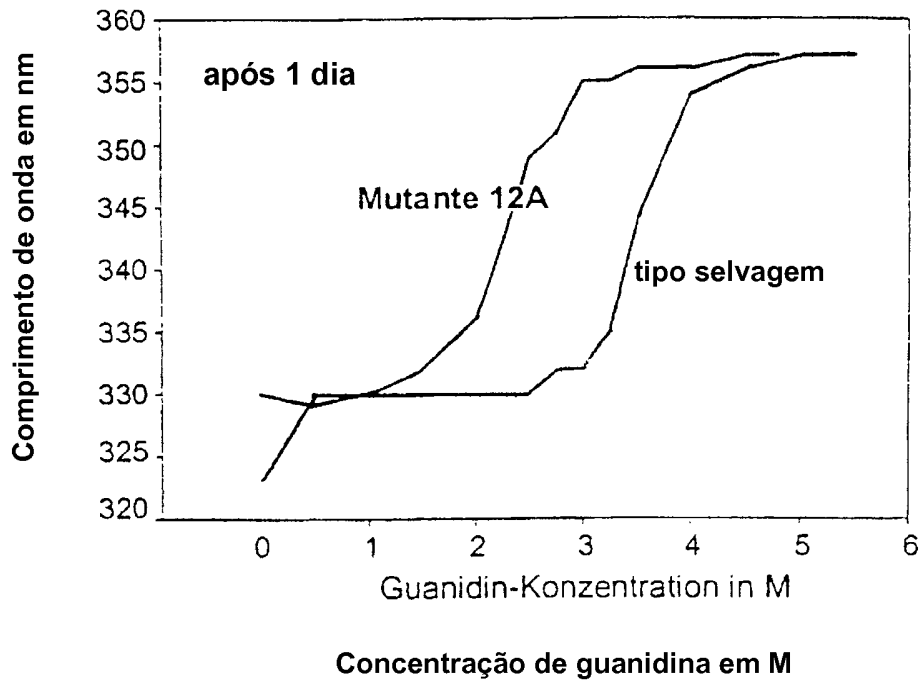


Fig. 12 B

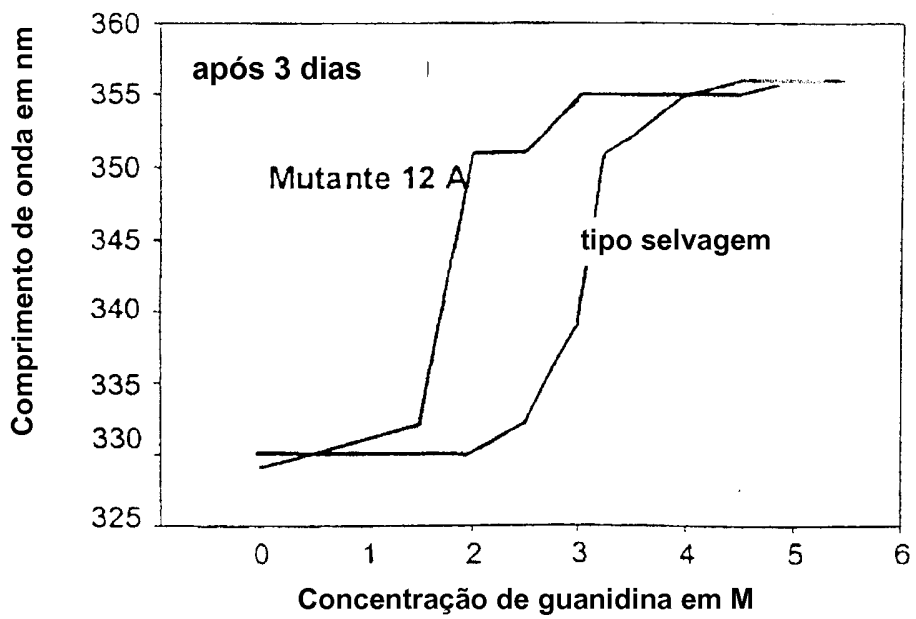


Fig. 13A

Espectros de fluorescência

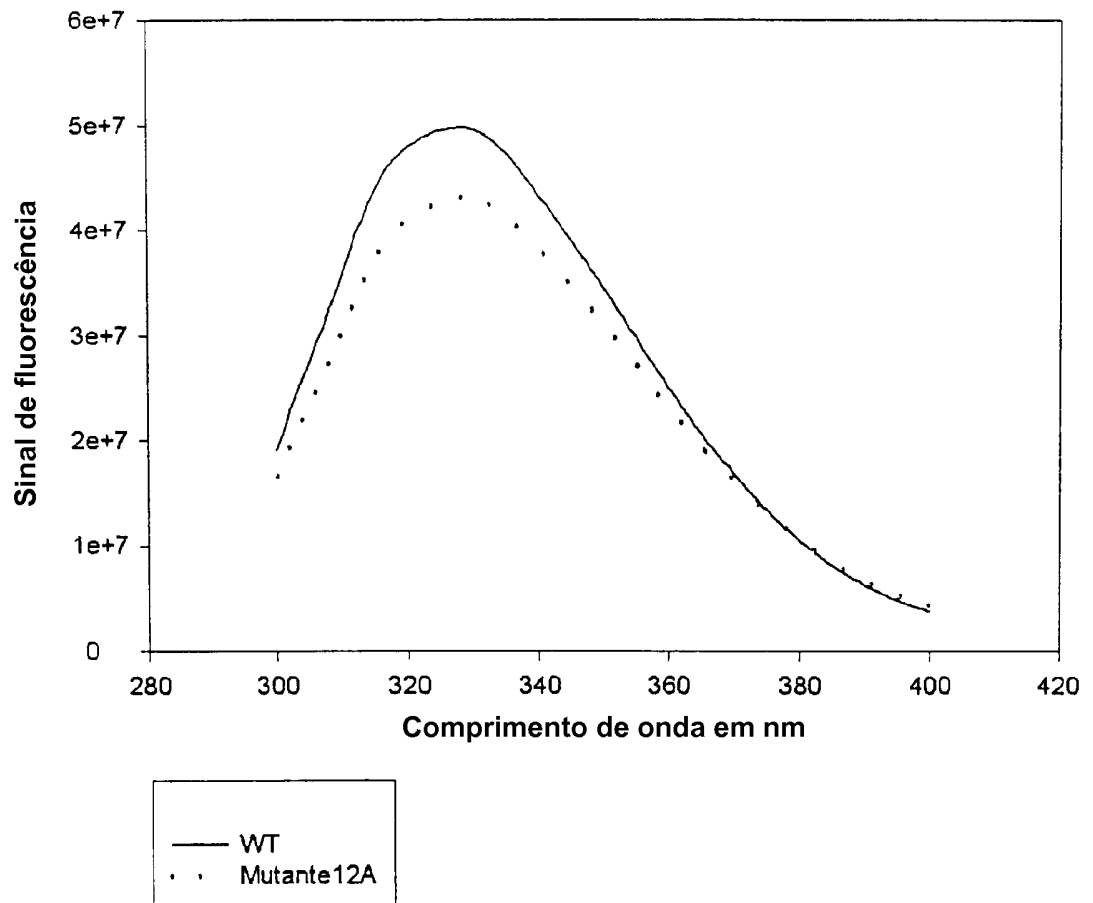


Fig. 13B

