



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 290 556**

51 Int. Cl.:

G01N 33/94 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01)

C07G 11/00 (2006.01)

C07K 14/00 (2006.01)

G01N 33/58 (2006.01)

G01N 33/533 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **03811464 .1**

86 Fecha de presentación : **27.10.2003**

87 Número de publicación de la solicitud: **1565754**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **24.08.2005**

54

Título: **Nuevos usos de proteínas codificadas por genes ble y antibióticos de la familia bleomicina.**

30

Prioridad: **25.10.2002 GB 0224872**
20.12.2002 GB 0229640
31.03.2003 GB 0307379

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.02.2008

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.02.2008

73

Titular/es: **SENSE PROTEOMIC LIMITED**
Unit 4, The Switchback, Gardner Road
Maidenhead, Berkshire SL6 7RJ, GB

72

Inventor/es: **Hart, Darren;**
Godber, Ben;
Blackburn, Jonathan M. y
McAndrews, Mike

74

Agente: **Sugrañes Moliné, Pedro**

ES 2 290 556 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Nuevos usos de proteínas codificadas por genes ble y antibióticos de la familia bleomicina.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a nuevos usos para la familia de genes “ble”, por ejemplo, Sh ble, Tn5 ble y Sa ble, y la familia de proteínas expresadas por estos genes que son capaces de unirse reversiblemente a la familia de antibióticos de la bleomicina. La familia de antibióticos de la bleomicina son glicopéptidos que escinden ADN e incluyen bleomicina, fleomicina, talisomicina, pepleomicina y fleomicina D1. La invención también se refiere a nuevos usos de estos antibióticos. Más particularmente se refiere a proteínas de fusión que comprenden una proteína ble y a herramientas, procedimientos y productos que dependen de la especificidad entre la proteína ble y los antibióticos de la familia de la bleomicina.

15 Cuando estos genes ble se expresan junto con otra proteína en forma de proteínas de fusión o los productos del gen ble están fusionados o unidos de otra forma a otras moléculas, particularmente proteínas, se pueden usar, por ejemplo, para unir fuerte o débilmente la proteína de fusión a una superficie, tal como una matriz, particularmente una micromatriz, un porta de vidrio o una placa de microvaloración (en los que generalmente se desea una unión fuerte) así como a, por ejemplo, perlas u otras formas similares que se usan en purificación de afinidad (en la que generalmente se desea una unión débil).

No obstante la invención se refiere no sólo al uso de este emparejamiento en la unión de moléculas a superficies, particular aunque no esencialmente superficies que pueden formar matrices, sino también al uso de una proteína de fusión ble adicionalmente en forma de marcador de plegamiento y solubilidad. También se refiere al uso de antibióticos “marcados” de la familia de la bleomicina que debido a su especificidad por las proteínas ble los hacen útiles como marcadores de localización celular.

Antecedentes de la invención

30 La expresión de proteínas humanas en sistemas heterólogos tales como bacterias, levaduras, células de insecto o células de mamífero puede dar como resultado la producción de proteínas plegadas incorrectamente, dando como resultado la formación de agregados insolubles y/o un bajo rendimiento de proteínas expresadas. Para todo trabajo proteómico funcional es esencial la producción de proteínas plegadas correctamente o nativas y a menudo se realiza una gran cantidad de trabajo para optimizar la expresión de proteínas individuales.

35 A continuación se exponen dos áreas en las que el plegamiento incorrecto o la mala solubilidad pueden ser importantes:

Insolubilidad problemática de proteínas de ingeniería genética

40 La manipulación de la función de proteínas por ingeniería genética es un campo de estudio importante con un gran empuje comercial y académico. Las características deseadas buscadas en proteínas de ingeniería genética incluyen especificidad de sustrato alterada, nueva función catalítica, especificidad de unión mejorada y tolerancia térmica o al pH mejorada. No obstante, las mutaciones primarias introducidas en la proteína frecuentemente dan como resultado la pérdida de expresión soluble y normalmente las mutaciones de compensación para restaurar la solubilidad son imposibles de predecir.

Insolubilidad problemática de proteínas expresadas de manera recombinante en hospedadores heterólogos

50 A menudo se prefiere la expresión de proteínas recombinantes en *Escherichia coli*, especialmente para la producción de proteínas en masa (por ejemplo, enzimas industriales, cristalografía de rayos X), debido a la facilidad de fermentación, ausencia de modificaciones post-traduccionales heterogéneas, simplicidad de las posteriores etapas de procesamiento y altos rendimientos de material. No obstante un problema frecuente encontrado, especialmente con proteínas eucariotas, es que el material recombinante se expresa de manera insoluble y por tanto es inactivo. Esas proteínas problemáticas se pueden expresar de manera soluble en sistemas más complicados (por ejemplo, *Pichia pastoris*, baculovirus), pero los menores rendimientos y un procedimiento más caro pueden dar como resultado un producto comercialmente menos atractivo.

60 En ambos casos, tiene una gran utilidad un procedimiento para generar formas solubles de una proteína insoluble. Una aproximación es la mutagénesis aleatoria de la proteína para generar una biblioteca de variantes seguida de la selección o cribado para la expresión soluble. A menudo esto se denomina “evolución dirigida”. Los requerimientos de ese cribado son que se pueden valorar muchos clones variantes en paralelo puesto que las bibliotecas involucradas son grandes (a menudo $> 10^6$ miembros). En algunos casos la actividad de la proteína diana se puede someter a ensayo directamente. No obstante, esto es relativamente raro y a menudo requiere el lisado de cada clon en los pocillos de una placa de microvaloración y a menudo las proteínas no tienen actividad que se pueda someter a ensayo.

65 Un procedimiento más eficaz es fusionar la proteína a una segunda proteína “informadora” con un fenotipo que se puede someter a ensayo visualmente. Puesto que las dos proteínas están físicamente unidas, la solubilidad de

la proteína informadora (y por tanto la presencia del fenotipo observable) depende de la solubilidad de la otra. Se han presentado varios de esos sistemas informadores. Preferentemente el fenotipo se puede observar sin etapas de procesamiento (es decir, cuando los clones aún están creciendo como colonias sobre placas de agar) permitiendo un análisis de producción elevado.

5

La expresión a gran escala de proteínas recombinantes para la fabricación de matrices de proteínas es un área de la proteómica que supone la caracterización funcional de proteínas de manera paralela. Es necesario expresar varios miles de proteínas de una manera soluble y plegada. Normalmente se emplean bibliotecas de expresión por lo que los genes se ponen bajo el control de un promotor y a continuación se induce la expresión del gen. La siguiente etapa es valorar qué clones expresan la proteína recombinante plegada. En un aspecto individual, esto normalmente se consigue fraccionando los lisados celulares en componentes solubles e insolubles por centrifugación y el análisis posterior de las fracciones por electroforesis en gel. Esta aproximación tiene una producción muy baja y el aumento de escala al nivel necesario para cribar bibliotecas es logísticamente inviable. Así, existe la necesidad de un procedimiento para cribar bibliotecas de expresión para clones que producen proteínas solubles y plegadas que se puedan usar posteriormente para estudios funcionales. La fusión de las proteínas recombinantes a una proteína informadora permite la determinación simple de su solubilidad.

10

15

Antes de considerar qué se ha realizado hasta la fecha es necesario hacer una distinción importante entre un “cribado” en la que todos los miembros de una colección se valoran con un subgrupo de acuerdo con las características deseadas a aislar, y una “selección” en la que sólo son observables los miembros de interés.

20

Las selecciones son más potentes que los cribados cuando se trata con números muy grandes puesto que existen limitaciones prácticas asociadas a la manipulación y análisis de un gran número de clones. Los ejemplos de cribados habituales usados en biología molecular son selección azul/blanco y fluorescencia GFP.

25

Los informadores de solubilidad/plegamiento dan como resultado un cribado basado en el color (visual) que se ha descrito con el uso de β -galactosidasa (Wigley, W. C., Stidham, R. D., Smith, N. M., Hunt, J. F. & Thomas, P. J. Protein solubility and folding monitored *in vivo* by structural complementation of a genetic marker protein. *Nat. Biotechnol.* 19, 131-135 (2001); y green fluorescent protein (GFP). (Waldo, G. S., Standish, B. M., Berendzen, J. & Terwilliger, T. C. Rapid protein-folding assay using green fluorescent protein. *Nat. Biotechnol.* 17, 691-695 (1999)).

30

La optimización de la solubilidad de proteínas por evolución dirigida para su uso en estudios estructurales también se ha llevado a cabo usando GFP. (Pedelacq, J. D. y col. Engineering soluble proteins for structural genomics. *Nat. Biotechnol.* 20, 927-932 (2002)).

35

En la bibliografía existen varios ejemplos de aprovechamiento de marcadores de fusión como indicadores del plegamiento y la solubilidad de proteínas. El principio que subyace en estos sistemas es la observación de que el plegamiento y la solubilidad de proteínas están estrechamente correlacionados puesto que proteínas mal plegadas normalmente forman agregados insolubles o son profusamente proteolisadas por la célula hospedadora. Por tanto se asume que si una proteína se expresa de manera soluble en una forma no proteolisada, está en su forma plegada correctamente. Si se lleva a cabo una fusión entre una proteína y otra, el plegamiento y la solubilidad de un dominio están unidos a los del otro. Esto se muestra en la Figura 1 que ilustra el principio de un marcador de plegamiento para valorar la solubilidad del producto de expresión del gen X. Sólo cuando el producto proteína del gen X es soluble el fenotipo de la fusión es aparente. En este caso, la fusión da como resultado colonias verdes fluorescentes que se pueden identificar claramente.

40

45

Se ha descrito una selección vivo o muerto para la solubilidad y el plegamiento empleando cloranfenicol acetil transferasa (CAT) (Maxwell, K. L., Mittermaier, A. K., Forman-Kay, J. D. & Davidson, A. R. A simple *in vivo* assay for increased protein solubility. *Protein Sci.* 8, 1908-1911 (1999)).

50

Los procedimientos de cribado que implican la generación de una proteína quimérica que comprende una región de una proteína inestable unida a una región de un producto de un gen marcador se presentaron en la solicitud de patente de EE.UU. 2003/0022151.

55

Definiciones

Como se define en el presente documento genes los “ble” son una familia de genes que expresan proteínas que se unen reversiblemente a los antibióticos glicopéptidos de la familia de la bleomicina, e incluyen, pero no están limitados a Sh ble, Tn5 ble y Sa ble. En general estos genes (o de manera más precisa los productos génicos codificados por estos genes) confieren a su hospedador resistencia a los antibióticos glicopéptidos de la familia de la bleomicina.

60

La “familia de antibióticos de la bleomicina” son glicopéptidos que escinden ADN e incluyen, pero no están limitados a, bleomicina, fleomicina, talisomicina, pepleomicina y fleomicina D1.

65

El término “proteínas”, como se usa en el presente documento, se usa para incluir tanto proteínas completas, polipéptidos, como subunidades o sus dominios.

ES 2 290 556 T3

Una “proteína de fusión”, como se usa en el presente documento, se refiere a una proteína que comprende una “marca” en el N y/o C-terminal que se une a miembros de la familia de antibióticos bleomicina. La proteína de fusión se puede expresar como una proteína de fusión de una construcción genética conteniendo el gen ble o se puede formar por corte y empalme mediado por inteína de, por ejemplo, dos polipéptidos separados o mediante la unión química de dos de esos péptidos según procedimientos conocidos en la materia.

A continuación la “marca” se usa como componente de señalización y/o medio para manipular posteriormente la proteína de fusión. Así, se puede usar para unir la proteína de fusión a una superficie o a otra molécula, tal como por ejemplo una molécula indicadora visual, como una molécula fluorescente, o para indicar una característica de la proteína de fusión, por ejemplo, que está plegada de manera que es probable que sea funcional.

Los términos relativos “aglutinante fuerte” y “aglutinante débil” y “densidad elevada” y “baja densidad” se usan en el presente documento para distinguir funcionalmente entre ejemplos en los que es deseable conseguir una unión sustancialmente irreversible y la situación en la que está previsto que la unión se revertirá tal como en purificación de afinidad. Así, debido a que por ejemplo la proteína Sh ble es un dímero que puede unir cooperativamente dos moléculas de bleomicina (la primera afinidad es de ~600 nM mientras que la segunda afinidad es de ~100 nM) es posible usar las características de unión de proteínas ble de una manera selectiva. Por ejemplo, si uno tiene una superficie (por ejemplo, una perla) cubierta con bleomicina a baja densidad, entonces se esperaría de media que un dímero de Sh ble estuviese unido por una molécula de bleomicina. En contraste, si uno tiene una superficie (por ejemplo, una perla) cubierta con bleomicina a una densidad elevada, entonces se esperaría de media que un dímero de Sh ble estuviese unido por dos moléculas de bleomicina (cada una unida a una de las dos subunidades del dímero), particularmente si las moléculas de bleomicina están ellas mismas unidas a enlazadores flexibles (por ejemplo, polímeros de polietilenglicol (PEG)). Puesto que en este último caso las dos moléculas de bleomicina están eficazmente unidas juntas a través de la superficie, la segunda afinidad de unión ahora será varios órdenes de magnitud mayor que cuando las dos moléculas no están unidas juntas. En otras palabras, la afinidad de unión se potenciará significativamente por un efecto quelato. Este efecto se puede utilizar como ventaja puesto que se pueden querer diferentes afinidades de unión en, por ejemplo, una matriz (cuando se quiere una unión sustancialmente irreversible) y un sistema de captura reversible tal como una perla.

Así, controlando la densidad superficial del antibiótico, tal como, bleomicina, debería ser posible controlar fácilmente si las fusiones de Sh ble se unen débil o fuertemente a la superficie. Las uniones débiles serían apropiadas para purificaciones de afinidad mientras que las uniones fuertes serían apropiadas para inmovilización en matrices.

Como alternativa a la inmovilización de las moléculas de bleomicina sobre una superficie, uno puede acoplarlas covalentemente a, por ejemplo, colorantes fluorescentes amino-reactivos, tales como fluoresceína activada con NHS, Cy3, Cy5, y rodamina. A continuación debe ser posible difundir los derivados de bleomicina fluorescentes en células enteras (ya sean células procariotas o eucariotas), tras lo cual los derivados se unirán selectivamente a las proteínas de fusión Sh ble. De esta forma la marca Sh ble se puede usar como marcador de localización celular (de la misma forma que se usa actualmente la GFP). Esto también permitirá usar la marca Sh ble tanto como marcador que se puede seleccionar (es decir, vivo o muerto) como marcador que se puede cribar (es decir, basado en fluorescencia).

En un aspecto de la invención el soporte toma la forma de una sonda que es capaz de actuar como diana en análisis por espectroscopia de masas de desorción/ionización con láser, por ejemplo, desorción/ionización con láser asistida con matriz (MALDI). La sonda lleva los analitos, por ejemplo proteínas, durante esos procedimientos e interactúa con la lente reflectora del ensamblaje ión-óptico localizado en espectrómetros de masas de tiempo de vuelo (TOF) de desorción/ionización con láser de la técnica, de manera que los analitos se convierten en iones gaseosos para permitir el análisis. Por ejemplo, las sondas de la invención pueden proceder de dianas para análisis MALDI como es sabido en la materia, que se tratan de manera que un resto de unión de la proteína de afinidad elevada, por ejemplo, bleomicina D1, esté presente sobre la superficie de la sonda que une las proteínas de fusión Sh ble para el análisis posterior. Por ejemplo, se pueden usar dianas MALDI de vidrio u oro convencionales.

Como se define en el presente documento un “micromatriz” es una matriz en la que el tamaño de las áreas diana discretas, es decir, las áreas individuales exploradas por un láser, son del orden de micrómetros o inferiores. Aunque en el extremo superior de la escala, 1000 micrómetros de diámetro aproximadamente, pueden ser visibles a simple vista, en el extremo inferior de la escala las áreas diana discretas no se distinguirán claramente a simple vista.

Las “matrices” normalmente estarán dispuestas en matrices que comprenden varias filas y columnas. El número de áreas diana discretas dependerá de qué está siendo cribado, aunque generalmente es deseable tener una densidad elevada de estas áreas discretas sobre la superficie de la sonda puesto que esto facilitará el cribado de una producción elevada. Normalmente una sonda comprenderá al menos 10, preferentemente al menos 100, más preferentemente al menos 1000 y hasta 10.000 o más áreas diana producidas sobre ella. (Normalmente una superficie de una sonda tendrá un área de 10.000 mm² aproximadamente - una sonda Bruker tiene un área de 10.292 mm² aunque no hay requerimientos para usar toda la sonda y la micromatriz se puede aplicar en una o más matrices sobre ella). La densidad real en una matriz dada dependerá del tamaño del área diana discreta (que normalmente estará impresa como un punto) y del espacio entre puntos adyacentes. Así, las áreas diana discretas normalmente estarán presentes a una densidad superior a 1 área diana discreta por mm² dentro de cualquier matriz.

Las “moléculas enlazadoras” son moléculas que funcionan como sugiere su nombre. Son moléculas comprendiendo grupos funcionales que permiten que se formen puentes entre diferentes moléculas.

Resumen de la invención

El producto de la proteína de, por ejemplo, el gen Sh ble codifica una proteína que cuando se expresa por una célula, confiere resistencia a antibióticos de la familia de la bleomicina, incluyendo fleomicina D1, uniéndose al antibiótico y secuestrándolo. (Gatignol, A., Durand, H. & Tiraby, G. Bleomycin resistance conferred by a drug-binding protein. *FEBS Lett.* 230, 171-175. (1988)).

Estos antibióticos en otras circunstancias inducen la rotura de la cadena de ADN. Cuando, por ejemplo, el gen Sh ble está fusionado en tándem con un segundo gen de interés, codificando así una proteína de fusión, la expresión de la proteína de fusión también confiere resistencia a fleomicina D1. Si el gen de interés codifica una proteína insoluble o un fragmento de proteína, no se observa el fenotipo que confiere resistencia a fleomicina D1 puesto que la proteína de fusión es insoluble e incapaz de unir el antibiótico. Esto forma la base de una nueva selección vivo o muerto para proteínas plegadas y solubles.

Adicionalmente, puesto que, por ejemplo, la proteína Sh ble se une fuerte y cooperativamente a fleomicina D1 los inventores han demostrado que se puede usar como marcador de afinidad si se proporciona una superficie que está derivatizada con, por ejemplo, fleomicina D1 o un análogo.

Además, uniendo, por ejemplo, un indicador visual al antibiótico y permitiendo al antibiótico marcado unir la proteína de fusión a través de la marca debería ser posible usar la proteína de fusión ble como, por ejemplo, marcador para la localización celular.

Según un primer aspecto de la presente invención se proporciona un procedimiento de inmovilización de una proteína a una superficie en el que la proteína se proporciona a la superficie en forma de proteína de fusión ble y la superficie es una superficie derivatizada con un antibiótico de la familia de la bleomicina.

En una forma de realización preferida la proteína de fusión ble se usa como marcador de expresión y plegamiento y marca de afinidad.

Los antibióticos de la familia de la bleomicina incluyen, pero no están limitados a, bleomicina, fleomicina, talisomicina, pepleomicina y fleomicina D1. Los miembros preferidos incluyen bleomicina A2, bleomicina A5, bleomicina A6, bleomicina B2 y fleomicina D1.

Una ventaja con la bleomicina A5 y A6 es que comprenden un grupo amina primaria terminal que se puede usar para acoplar la proteína a, por ejemplo, una superficie amino-reactiva. Los grupos típicos usados para producir una superficie amino-reactiva incluyen, pero no están limitados a: aldehídos, epóxidos, N-hidroxisuccinamidas, e isotionatos. Naturalmente se pueden usar otros grupos funcionales presentes sobre los antibióticos para acoplar los antibióticos a una superficie, y esto será evidente para la persona experta en la materia.

En un ejemplo preferido el acoplamiento se puede conseguir haciendo reaccionar el grupo amina con una superficie amino-reactiva, tal como, por ejemplo, una superficie derivatizada con polietilenglicol (PEG) activado con NHS.

En una forma de realización preferida la superficie es la superficie de una matriz, más particularmente una micromatriz, y todavía más particularmente una matriz MALDI aunque podría ser una placa de microvaloración, un porta de vidrio (siendo la superficie la superficie de una sonda), o una perla (siendo la superficie aquella de un medio de purificación).

Así, según un segundo aspecto de la presente invención se proporciona una sonda caracterizada porque tiene una superficie diana que comprende una matriz con una pluralidad de áreas diana discretas presentando uno o más restos de captura de analitos que comprenden un antibiótico de la familia de la bleomicina.

Esa superficie diana normalmente tiene un recubrimiento de densidad elevada del antibiótico de manera que el analito diana es capturado con una afinidad elevada, preferentemente inferior a 400 nM, más preferentemente inferior a 200 nM, aún más particularmente inferior a 150 nM. En el ejemplo específico indicado la Sh ble tiene una afinidad del orden de 100 nM o inferior cuando están unidas dos moléculas de bleomicina.

Según un tercer aspecto de la presente invención se proporciona un medio de purificación comprendiendo una superficie diana presentando uno o más restos de captura de analitos comprendiendo un antibiótico de la familia de la bleomicina.

Esa superficie diana normalmente tiene un recubrimiento de baja densidad del antibiótico de manera que el analito diana es capturado con una baja afinidad, normalmente del orden de superior a 400 nM, y más preferentemente superior a 500 nM. En el ejemplo específico indicado la Sh ble tiene una afinidad del orden de 600 nM cuando está unida una única molécula de bleomicina. Idealmente la afinidad estará en el intervalo de μM , pero suficiente para que las proteínas se unan.

En cualquier caso, el antibiótico puede estar unido a la superficie a través de un enlazador flexible tal como polietilenglicol activado (PEG).

ES 2 290 556 T3

Según un cuarto aspecto de la presente invención se proporciona un antibiótico de la familia de la bleomicina caracterizado porque está marcado con un marcador.

5 Preferentemente, el marcador es un marcador visual tal como, por ejemplo, un marcador fluorescente. Alternativamente, podría estar marcado con un isótopo radiactivo. Los marcadores fluorescentes preferidos incluyen, pero no están limitados a fluoresceína activada con NHS, Cy3, Cy5, y rodamina.

10 Una herramienta para la producción de las proteínas de fusión es un vector constituido esencialmente de un gen ble aguas abajo de un ADN enlazador que durante su uso se escinde y es reemplazado con un ADN codificando una proteína para ser expresada como proteína de fusión ble.

15 En una forma de realización el vector ble se proporciona como uno de los componentes de un kit para la preparación de una matriz junto con una superficie que se ha derivatizado con un antibiótico de la familia de la bleomicina o los componentes para la fabricación de esa superficie derivatizada.

Según un quinto aspecto de la presente invención se proporciona un procedimiento para la generación de formas solubles de una proteína insoluble que comprende:

- 20 i) generación de una biblioteca de variantes de proteínas; y
- ii) selección de colonias respecto a la presencia de una proteína soluble expresando la proteína en forma de proteína de fusión ble y seleccionando sobre un antibiótico de la familia de la bleomicina;
- 25 iii) crecimiento de las colonias seleccionadas en cultivo líquido, lisado e impresión de un lisado en bruto sobre una superficie derivatizada con un antibiótico de la familia de la bleomicina, donde el procedimiento comprende adicionalmente y de manera preferente el lavado de la superficie marcada para retirar los materiales no unidos.

30 Se conoce una selección vivo o muerto previa utilizando cloranfenicol acetil transferasa (CAT), pero no es muy eficaz (Maxwell, K. L., Mittermaier, A. K., Forman-Kay, J. D. & Davidson, A. R. A simple *in vivo* assay for increased protein solubility. *Protein Sci.* 8, 1908-1911 (1999)) debido a su estrecha ventana de toxicidad, es decir, la concentración de antibiótico que mata células sin CAT está próxima a aquella que permite la supervivencia de células con CAT. Además, no permite directamente la purificación o inmovilización posterior aguas abajo de la proteína expresada puesto que la CAT destruye enzimáticamente el antibiótico y no se une al producto con una afinidad significativa.

35 Según un sexto aspecto de la presente invención se proporciona un procedimiento de purificación de una proteína de fusión Sh ble a partir de un extracto en bruto comprendiendo la etapa de su inmovilización sobre una superficie mediante un antibiótico de la familia de la bleomicina y opcionalmente su liberación de ella.

40 Según un séptimo aspecto de la invención se proporciona un procedimiento de identificación de la localización celular de una proteína que comprende

- 45 i) la expresión de la proteína en forma de proteína de fusión ble en una célula,
- ii) la introducción de un antibiótico marcado de la familia de la bleomicina en la célula, y la detección del antibiótico marcado.

50 El procedimiento puede ser cualitativo o cuantitativo, en cuyo caso el procedimiento comprende una etapa de cuantificación adicional del antibiótico marcado. Esto se puede realizar midiendo la intensidad de fluorescencia cuando el antibiótico marcado está marcado fluorescentemente.

Breve descripción de los dibujos

55 Los diversos aspectos de la invención se describen a continuación sólo a modo de ejemplo con referencia a las siguientes Figuras y Ejemplos en los que:

60 La Figura 1 es un esquema que demuestra el principio de uso de un marcador de plegamiento para valorar la solubilidad de un producto de expresión del "gen X". Sólo cuando el producto proteína del gen X es soluble el fenotipo de la fusión es aparente. En este caso, la fusión da como resultado colonias verdes fluorescentes que se pueden identificar claramente;

La Figura 2 es un vector según un aspecto de la invención incorporando un gen Sh ble;

65 Las Figuras 3a y b ilustran la purificación de una proteína de fusión Sh ble sobre bleomicina-sefarosa

A) es un gel con tinción Coomassie, y

B) es una transferencia Western explorada con estreptavidina-HRP.

ES 2 290 556 T3

Los carriles 1-6 están cargados como sigue:

- 1) lisado,
- 2) bleomicina-sefarosa después de la incubación con el lisado,
- 3) lisado no unido después de la incubación con bleomicina-sefarosa,
- 4) elución de la bleomicina,
- 5) bleomicina-sefarosa después de la elución de la bleomicina, y
- 6) lisado no unido después de la incubación con bleomicina-sefarosa.

La Figura 4 ilustra la inmovilización de las proteínas de fusión Sh ble sobre una placa de microvaloración derivatizada con bleomicina. Se añadieron lisados de 2 clones de proteínas de fusión Sh ble diferentes a pocillos de una placa de microvaloración derivatizados con bleomicina y control en presencia y ausencia de bleomicina en competición;

La Figura 5 ilustra la purificación de proteínas de fusión Sh ble inmovilizadas sobre micropocillos recubiertos con bleomicina; (la proteína de fusión Sh ble capturada de los lisados sobre micropocillos derivatizados con bleomicina se corrió en SDS-PAGE. También se corrieron los lisados de entrada para su comparación. Los lisados de entrada eran una serie con una dilución de 2 veces, con el carril 1 representando el lisado no diluido y el carril 7 representando una dilución de 1 en 64).

La Figura 6 muestra la tasa de inmovilización de la proteína de fusión Sh ble sobre un micropocillo derivatizado con bleomicina; (los lisados clarificados del clon 1 de la proteína de fusión Sh ble se incubaron durante tiempos variables en un micropocillo derivatizado con bleomicina. A) La SDS-PAGE con tinción con plata muestra la cantidad de proteína de fusión inmovilizada. B) Las bandas se cuantificaron y se representaron frente al tiempo).

La Figura 7 ilustra la retención de la proteína de fusión Sh ble sobre micropocillos derivatizados con bleomicina; (el clon 1 de la proteína de fusión Sh ble se unió a los micropocillos derivatizados con bleomicina. Después del lavado los micropocillos se incubaron durante tiempos variables en tampón.

A) SDS-PAGE con tinción Coomassie mostrando la cantidad de proteína de fusión restante inmovilizada.

B) Las bandas se cuantificaron y se representaron frente al tiempo).

La Figura 8 ilustra la retención de la proteína de fusión Sh ble sobre micropocillos derivatizados con bleomicina; (el clon 1 de la proteína de fusión Sh ble se unió a los micropocillos derivatizados con bleomicina. Después del lavado los micropocillos se incubaron durante tiempos variables en tampón conteniendo bleomicina en exceso. A) SDS-PAGE con tinción Coomassie mostrando la cantidad de proteína de fusión restante inmovilizada. B) Las bandas se cuantificaron y se representaron frente al tiempo).

La Figura 9 ilustra la inmovilización de la proteína de fusión Sh ble sobre un porta de micromatriz derivatizada con bleomicina. (Se puso 1 μ l de lisados clarificados del clon 2 de la proteína de fusión Sh ble sobre un porta de micromatriz derivatizada con bleomicina en presencia o ausencia de bleomicina libre en exceso. A) Después de la exploración para la proteína de fusión usando un anticuerpo anti-Flag y anti-ratón secundario marcado con Cy3 se visualizó el fluoróforo Cy3. B) La intensidad de fluorescencia de las manchas totales se representó en un histograma para manchas en presencia y ausencia de bleomicina en exceso).

Descripción detallada de la invención

1.0. Uso de Sh como marca de afinidad

Una biblioteca de ADNc se ligó a un vector de expresión *E. coli* modificado (comparar a la Figura 2) de manera que el gen se podía marcar en ambos N y C términos con una marca FLAG en el N-término y Sh ble, BCCP (dominio biotinilado de *E. coli* ACCB) y una marca Myc en el C-término.

Después de la transformación en XL10 Gold, los clones se seleccionaron creciendo sobre LB Agar conteniendo 50 μ g/ml de fleomicina D1.

Se seleccionaron dos clones resistentes a fleomicina D1, crecidos en LB-amp a una DO_{600} de 0,4 aproximadamente, tiempo tras el cual los clones se indujeron con 100 μ g/ml de IPTG durante 4 h a 30°C. Los pocillos se recogieron por centrifugación, 4000 g durante 15 min a 4°C, y se almacenaron en alícuotas a -20°C para ser usadas para un trabajo posterior. Estos se denominan "Clon 1" y "Clon 2".

Se prepararon lisados frescos de *E. coli* antes de cada experimento.

ES 2 290 556 T3

A cada alícuota de células (a partir de 40 ml de cultivo de inducción) se le añadió 300 μ l de tampón de lisis (Tris pH 8 200 mM, EDTA 100 mM, cóctel inhibidor de proteasas 1x (Roche), mercaptoetanol 10 mM, 200 μ g/ml de lisozima) y las células se resuspendieron. Después de 15 min de incubación a 4°C las células se diluyeron con 1,7 ml de tampón (inhibidores de proteasas 1x, MgCl₂ 20 mM, 50 μ g/ml de ADNsa) y se incubaron a 4°C durante 30 minutos más. Se obtuvieron lisados clarificados después de la centrifugación a 20.000 g durante 10 min a 4°C.

1.1. Derivatización de sefarosa con bleomicina y su uso en purificación de afinidad

Se acopló bleomicina A6 (2 mg/ml) a una columna de sefarosa activada con NHS Pharmacia 1 ml HiTrap según las instrucciones del fabricante.

Después del acoplamiento la sefarosa se extrajo de la columna y se usó para la purificación en discontinuo de las proteínas de fusión Sh ble.

A 6 μ l de una suspensión de bleomicina-sefarosa (50% aproximadamente de perlas dilatadas) en PBS-Tween, se le añadió 4 μ l del lisado del Clon 1 (preparado como anteriormente) y se incubó a 4°C durante 30 min con agitación. Después de centrifugar brevemente se retiró el sobrenadante y las perlas se lavaron tres veces en 10 μ l de PBS-Tween. Un lote tratado de manera similar de proteína unida a bleomicina-sefarosa se eluyó incubando las perlas en 10 μ l de PBS-Tween conteniendo 300 μ g/ml de bleomicina A6 a 4°C durante 10 min mientras se agitaba.

A continuación las muestras se llevaron a ebullición en tampón de muestras SDS y se cargaron sobre dos placas idénticas de SDS-PAGE de Tris glicina al 10-20%. Después de la electroforesis un gel se tiñó con Coomassie y el otro se transfirió a una membrana de nitrocelulosa y se exploró con estreptavidina-HRP antes de la visualización de las bandas usando DAB (Figura 3).

En referencia a la Figura 3 se puede observar claramente que la proteína de fusión Sh ble se ha unido a la bleomicina-sefarosa en el gel con tinción Coomassie y en la transferencia Western blot (Figura 3A y B, carril 2). También se puede observar que la proteína de fusión Sh ble unida es muy pura produciendo sólo una banda sobre el gel con tinción Coomassie. La proteína no sólo ha demostrado estar unida específicamente y estar significativamente agotada en el lisado de la proteína de fusión, sino que también se puede eluir específicamente con bleomicina libre (Figura 3A y B, carril 4) proporcionando así evidencias de tanto especificidad de interacción como también un medio de elución. No obstante, en estas condiciones sólo se eluyó una proporción de la proteína de fusión Sh ble de la bleomicina-sefarosa.

1.2. Derivatización de placas de microvaloración con bleomicina

Se adquirieron bandas de 8 pocillos de microvaloración recubiertos con PEG con un término amino-reactivo (placas "inmovilizadoras de proteína") en Exiqon. Las placas se recubrieron con bleomicina A6 de manera eficaz según el protocolo del fabricante. Resumiendo, se disolvió la bleomicina A6 en tampón KPO₄ 100 mM a pH 8 a una concentración de 1 mg/ml. Se añadió 100 μ l de una disolución de bleomicina a cada pocillo, los pocillos se sellaron y se incubaron a 4°C durante 18 h. Después de eso la disolución de bleomicina se extrajo de los pocillos y los pocillos se lavaron con PBS-Tween durante 5 minutos tres veces. Se prepararon pocillos control como anteriormente con la omisión de la bleomicina A6.

1.3. Uso de superficies de bleomicina en inmovilización de afinidad

A pocillos recubiertos con bleomicina y control, se les añadieron 50 μ l de dos lisados de clones de proteína de fusión Sh ble diferentes (lisados del Clon 1 y Clon 2 preparados como anteriormente) en presencia y ausencia de 5 mg/ml de bleomicina. Los lisados se incubaron en los pocillos durante 30 min a temperatura ambiente con agitación suave, tiempo tras el cual el lisado se aspiró de los pocillos y los pocillos se lavaron tres veces con PBS-Tween durante 5 minutos cada lavado.

Las proteínas se eluyeron de la superficie mediante la adición de 50 μ l de tampón de carga de muestras en SDS y los pocillos se calentaron en un bloque térmico a 100°C durante 10 minutos. 20 μ l de cada muestra se corrió en SDS-PAGE de Tris glicina al 10-20%. El gel se transfirió a una membrana de nitrocelulosa y se exploró usando el conjugado de estreptavidina-HRP. La transferencia se visualizó usando ECL (Amersham) y película fotográfica mostrada en la Figura 4.

De la Figura 4 es claro que ambas proteínas de fusión Sh ble sólo se inmovilizan sobre micropocillos derivatizados con bleomicina y además que esta interacción puede competir por pre-incubación de los lisados con bleomicina libre en exceso.

1.4. Análisis de una proteína de fusión Sh ble purificada e inmovilizada sobre micropocillos derivatizados con bleomicina

Se añadieron 50 μ l de lisados clarificados a diferentes diluciones del Clon 1 de fusión Sh ble preparado como anteriormente a micropocillos derivatizados con bleomicina. Después de incubar durante 40 minutos a temperatura ambiente los pocillos se lavaron tres veces con PBS-Tween. La proteína se eluyó de los pocillos calentando en un bloque térmico a 100°C durante 10 minutos en tampón de muestras SDS y 15 μ l se sometieron a electroforesis en

ES 2 290 556 T3

SDS-PAGE con cantidades equivalentes de lisados de entrada. Después de la electroforesis los geles se visualizaron usando un protocolo de tinción con plata normal.

5 Los resultados se ilustran en la Figura 5 que muestra la purificación de proteínas de fusión Sh ble inmovilizadas sobre micropocillos recubiertos con bleomicina. La proteína de fusión Sh ble capturada de los lisados sobre micropocillos derivatizados con bleomicina se corrió sobre SDS-PAGE. También se corrieron los lisados de entrada para su comparación. Los lisados de entrada eran una serie con una dilución de 2 veces, con el carril 1 representando el lisado no diluido y el carril 7 representando una dilución de 1 en 64.

10 La Figura 5 demuestra que hay predominantemente una banda principal de proteína de fusión Sh ble de longitud completa purificada capturada sobre los micropocillos. Es probable que otras bandas secundarias observadas representen productos de la proteólisis de la proteína de fusión Sh ble como se muestra por comparación a un experimento similar con la transferencia Western mostrada en la Figura 4.

15 1.5. *Velocidad de unión de una proteína de fusión Sh ble a micropocillos derivatizados con bleomicina*

Se añadieron 50 μ l de lisado clarificado del Clon 1 de fusión Sh ble a micropocillos derivatizados con bleomicina. Después de 5, 10, 20, 30, 40, 50 y 60 minutos de incubación a temperatura ambiente los pocillos se lavaron tres veces con PBS-Tween. La proteína se eluyó de los pocillos calentando sobre un bloque térmico a 100°C durante 10 minutos
20 en tampón de muestras SDS y 15 μ l se sometieron a electroforesis en SDS-PAGE. Después de la electroforesis los geles se visualizaron usando un protocolo de tinción con plata normal (Figura 6A). Las bandas Sh ble sobre la imagen del gel se cuantificaron y se representó la densidad media (Figura 6B). Estos datos muestran que la mayor parte de la proteína está inmovilizada después de 40 minutos de incubación aproximadamente.

25 1.6. *Estabilidad de la interacción de la proteína fusión Sh ble con micropocillos derivatizados con bleomicina*

Se añadieron 50 μ l de lisado clarificado del Clon 1 de fusión Sh ble a micropocillos derivatizados con bleomicina. Después de incubar durante 1 h a temperatura ambiente los pocillos se lavaron tres veces con PBS-Tween. Después de lavar los pocillos se llenaron con PBS-Tween y se incubaron durante el tiempo deseado para generar un recorrido de
30 tiempos. Esto también se repitió con un grupo duplicado de pocillos, que después de lavar los pocillos se incubaron en bleomicina 0,5 mM en PBS-Tween. Después de este recorrido de tiempos, la proteína se eluyó de los pocillos calentando sobre un bloque térmico a 100°C durante 10 minutos en tampón de muestras SDS y 15 μ l se sometieron a electroforesis en SDS-PAGE con cantidades equivalentes de lisados de entrada. Después de la electroforesis los geles se visualizaron usando tinción Coomassie (Figuras 7A y 8A).

35 Las bandas de la proteína de fusión Sh ble sobre la imagen del gel se cuantificaron y se representó la densidad media (Figuras 7B y 8B).

La proteína de fusión Sh ble inmovilizada permaneció mayormente unida al micropocillo derivatizado con bleomicina después de una incubación de hasta 24 h en PBS-Tween (Figuras 7). La inclusión de bleomicina libre en exceso en el tampón se anticipó para incrementar la velocidad de disociación de la proteína de fusión del micropocillo, no obstante incluso en presencia de bleomicina libre en exceso (Figura 8) se observó poca pérdida de proteína de fusión Sh ble inmovilizada.

45 1.7. *Uso de la proteína de fusión Sh ble para la inmovilización de proteínas sobre micromatrices*

En este estudio se usaron portaobjetos Exiqon Euray que tienen un recubrimiento superficial que es esencialmente aquel encontrado en los pocillos de las placas de microvaloración usadas previamente, en las que se usa una molécula de PEG con un término amino-reactivo para recubrir el portaobjetos. La derivatización de estos portas se realizó como
50 para los pocillos de las placas de microvaloración con 400 μ l de 3 mg/ml de bleomicina A6 aplicados a la superficie bajo una cámara de hibridación del portaobjetos para microscopio.

Los lisados clarificados del Clon 1 de la proteína de fusión Sh ble se diluyeron 1 en 2, 1 en 4 y 1 en 8 con tampón KPO₄ 100 mM. Los lisados se transfirieron a una placa de microvaloración de 384 pocillos para el ensayo con la micromatriz. Un diseño de los lisados de 6 por 6 se sometió a ensayo con la micromatriz sobre un portaobjetos derivatizado con bleomicina y uno que se había recubierto de manera similar con etanolamina. El ensayo con la micromatriz se llevó a cabo usando un robot Genetix Qarray equipado con puntas sólidas de 300 micrómetros. Las micromatrices se incubaron en una cámara húmeda durante 1 h a temperatura ambiente. Después del lavado en PBS-Tween los portaobjetos se exploraron con un anticuerpo anti-FLAG de ratón seguido de anticuerpo IgG anti-ratón
60 marcado con Cy3. Después del secado en una corriente de nitrógeno, los portaobjetos se visualizaron usando un escáner de matrices Affymetrix 428 equipado con láser y un filtro apropiado para detectar el fluoróforo Cy3 (Figura 9A). Se cuantificó la fluorescencia total y se tomaron y representaron medias de manchas idénticas (Figura 9B).

Los datos de la Figura 9 demuestran que una proteína de fusión Sh ble está inmovilizada específicamente sobre un portaobjetos de microscopio derivatizado con bleomicina. Esto indica que la Sh ble es adecuada para su uso como
65 marca de afinidad para la inmovilización de proteínas en un formato de micromatrices.

ES 2 290 556 T3

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un procedimiento de inmovilización de una proteína a una superficie, en el que la proteína se proporciona a la superficie en forma de proteína de fusión Ble y la superficie es una superficie derivatizada con un antibiótico de la familia de la bleomicina.
2. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que Ble dentro de una proteína de fusión Ble también se usa como marcador de expresión y plegamiento.
- 10 3. El procedimiento según la reivindicación 1 o reivindicación 2 en el que la proteína de fusión Ble es el producto de expresión de un gen Sh ble, Tn5 ble o Sa ble.
- 15 4. Un procedimiento según la reivindicación 1 en el que el antibiótico de la familia de la bleomicina se selecciona del grupo constituido por bleomicina, fleomicina, talisomicina, pepleomicina y fleomicina D1.
5. Un procedimiento según la reivindicación 4 en el que el antibiótico de la familia de la bleomicina se selecciona del grupo constituido por bleomicina A2, bleomicina A5, bleomicina A6, bleomicina B2 o fleomicina D1.
- 20 6. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1-5 en el que se usa un grupo funcional sobre el antibiótico para unirlo a la superficie.
7. Un procedimiento según la reivindicación 6 en el que se usa un grupo amino presente sobre el antibiótico para acoplar el antibiótico a la superficie.
- 25 8. Un procedimiento según la reivindicación 7 en el que el antibiótico se acopla a una superficie derivatizada con polietilenglicol (PEG) a través de un grupo amino.
9. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1-8 en el que la superficie es la superficie de una matriz, una placa de microvaloración, un portaobjetos o una perla.
- 30 10. Un procedimiento según la reivindicación 9 en el que la matriz es una micromatriz.
11. Un procedimiento según la reivindicación 10 en el que la matriz es una matriz MALDI.
- 35 12. Un procedimiento según la reivindicación 9 que comprende adicionalmente la retirada de la proteína de fusión Ble de la superficie.
13. Una sonda, **caracterizada** porque tiene una superficie diana que comprende una matriz con una pluralidad de áreas diana discretas presentando uno o más restos de captura del analito comprendiendo un antibiótico de la familia de la bleomicina.
- 40 14. Una sonda según la reivindicación 13 en la que el antibiótico se proporciona sobre la superficie diana a una densidad superficial elevada de manera que se esperarí que de media un dímero Sh ble estuviera unido por dos moléculas de bleomicina.
- 45 15. Una sonda según la reivindicación 14 en la que los restos de captura tienen una afinidad por el resto que están destinados a capturar inferior a 400 nM, y preferentemente inferior a 200 nM.
- 50 16. Una sonda según cualquiera de las reivindicaciones 13-15 en el que el antibiótico de la familia de la bleomicina se selecciona del grupo constituido por bleomicina, fleomicina, talisomicina, pepleomicina y fleomicina D1.
17. Una sonda según la reivindicación 16 en el que el antibiótico de la familia de la bleomicina se selecciona del grupo constituido por bleomicina A2, bleomicina A5, bleomicina A6, bleomicina B2 o fleomicina D1.
- 55 18. Un medio de purificación que comprende una superficie diana presentando uno o más restos de captura del analito comprendiendo un antibiótico de la familia de la bleomicina.
19. Un medio de purificación según la reivindicación 18 que es una perla.
- 60 20. Un medio de purificación según la reivindicación 18 ó 19 en el que el antibiótico se proporciona sobre una superficie diana a una baja densidad superficial de manera que se esperarí que de media un dímero Sh ble estuviera unido por una molécula de bleomicina.
- 65 21. Un medio de purificación según la reivindicación 20 en el que los restos de captura tienen una afinidad por el resto que están destinados a capturar superior a 400 nM y preferentemente superior a 500 nM.

ES 2 290 556 T3

22. Un medio de purificación según cualquiera de las reivindicaciones 18-21 en el que el antibiótico de la familia de la bleomicina se selecciona del grupo constituido por bleomicina, fleomicina, talisomicina, pepleomicina y fleomicina D1.

5 23. Un medio de purificación según cualquiera de las reivindicaciones 18-22 en el que el antibiótico de la familia de la bleomicina se selecciona del grupo constituido por bleomicina A2, bleomicina A5, bleomicina A6, bleomicina B2 o fleomicina D1.

10 24. Un medio de purificación según cualquiera de las reivindicaciones 18-23 en el que el antibiótico está unido a la superficie a través de una molécula enlazadora flexible.

25. Un medio de purificación según la reivindicación 24 en el que la molécula enlazadora flexible es un polietilenglicol (PEG).

15 26. Un procedimiento para generar formas solubles de una proteína insoluble que comprende: i) la generación de una biblioteca de variantes de proteínas; ii) la selección de colonias respecto a la presencia de una proteína soluble expresando la proteína en forma de proteína de fusión Ble y seleccionando sobre un antibiótico de la familia de la bleomicina; y iii) el crecimiento de las colonias seleccionadas, lisándolas y uniendo la proteína de fusión a una superficie derivatizada con un antibiótico de la familia de la bleomicina.

20 27. El procedimiento de la reivindicación 26, que comprende adicionalmente el lavado de la superficie marcada para retirar los materiales no unidos.

25 28. Un procedimiento de purificación de una proteína de fusión Ble a partir de un extracto en bruto comprendiendo la etapa de su inmovilización sobre una superficie mediante un antibiótico de la familia de la bleomicina y opcionalmente liberándola de ella.

30 29. Un procedimiento de identificación de la localización celular de una proteína que comprende i) la expresión de la proteína en forma de proteína de fusión Ble en una célula, ii) la introducción de un antibiótico marcado de la familia de la bleomicina en la célula, y iii) la detección del antibiótico marcado.

30. Un procedimiento según la reivindicación 29 en el que el antibiótico es un antibiótico de la familia de la bleomicina **caracterizado** porque está marcado con un marcador.

35 31. Un procedimiento según la reivindicación 30 en el que el marcador es un marcador visual.

32. Un procedimiento según la reivindicación 31 en el que marcador visual es un marcador fluorescente.

40 33. Un procedimiento según la reivindicación 32 en el que el marcador fluorescente se selecciona entre fluoresceína activada con NHS, Cy3, Cy5, o rodamina.

34. Un kit para la producción de una matriz que comprende un vector ble y una superficie derivatizada con un antibiótico de la familia de la bleomicina o los componentes para la preparación de dicha superficie derivatizada.

45

50

55

60

65

FIG. 1

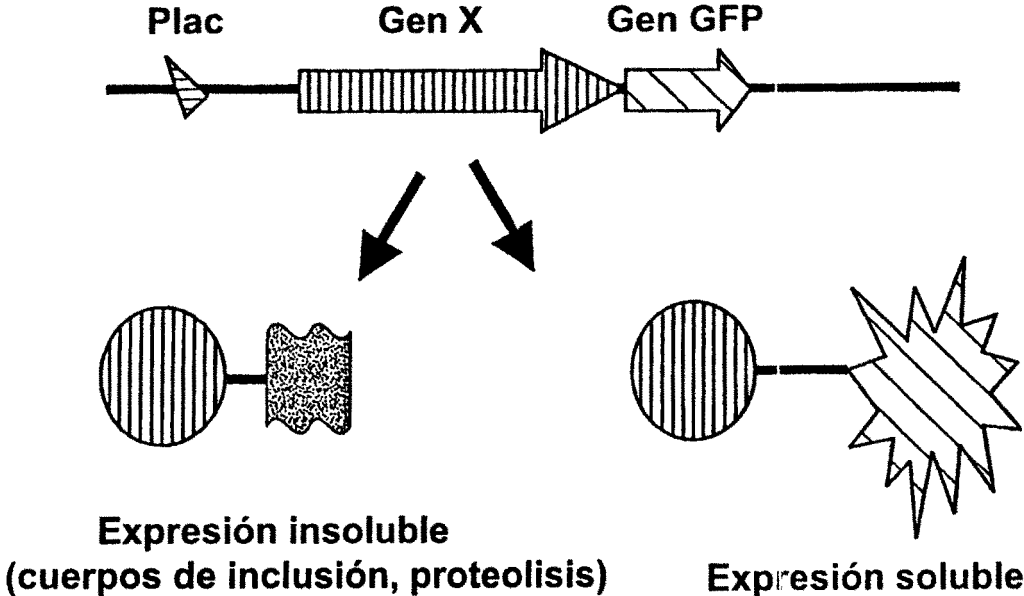


FIG. 2



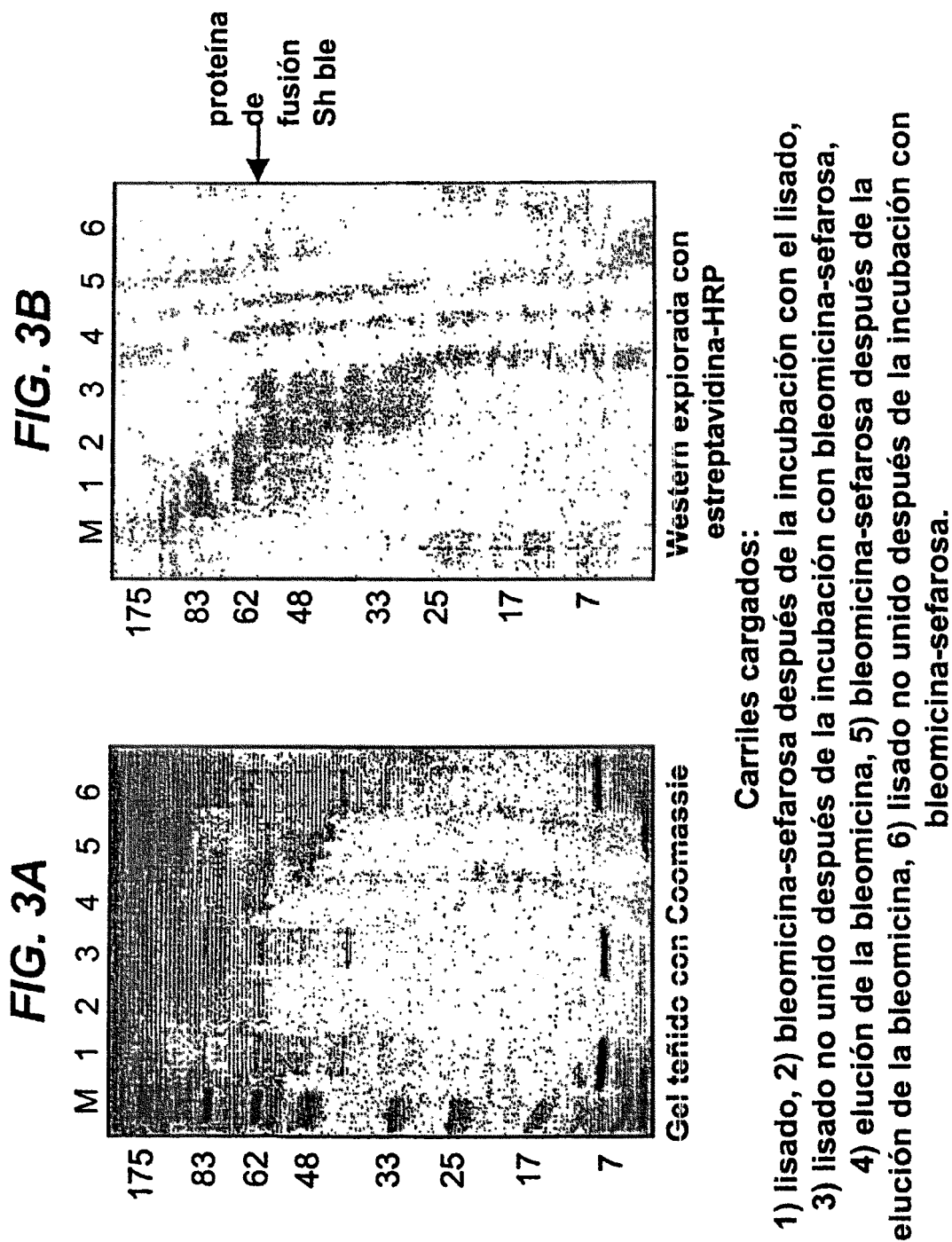


FIG. 4

Clon N°	1	1	1	1	2	2	2	2
recubierto con ble	-	-	+	+	-	-	+	+
comp. ble	-	+	-	+	-	+	-	+

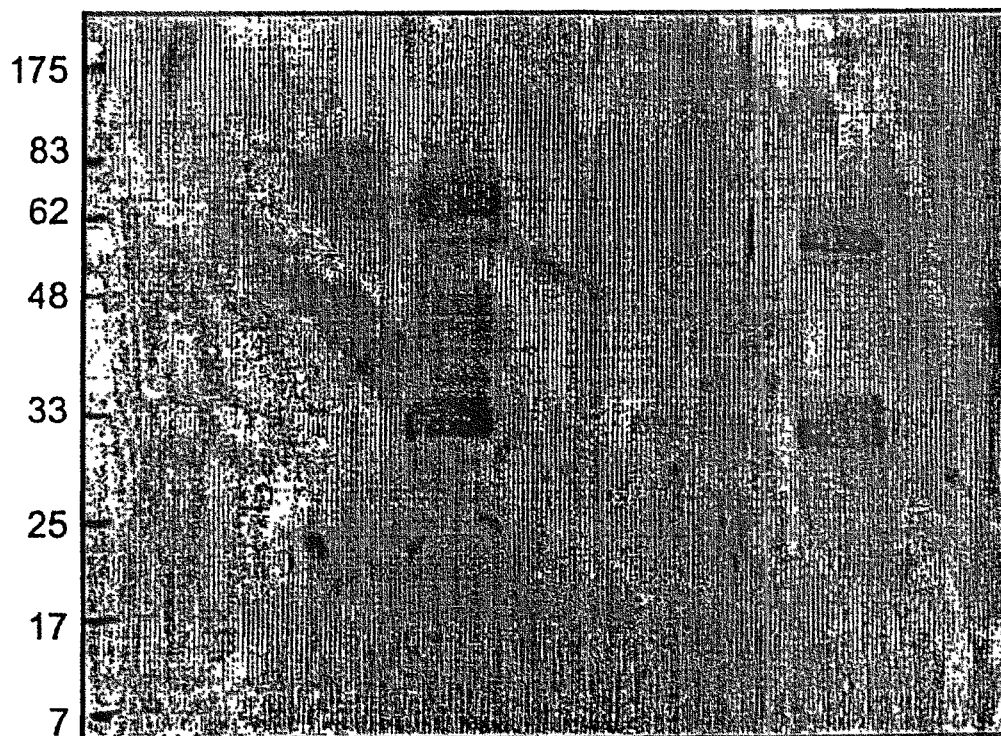


FIG. 5

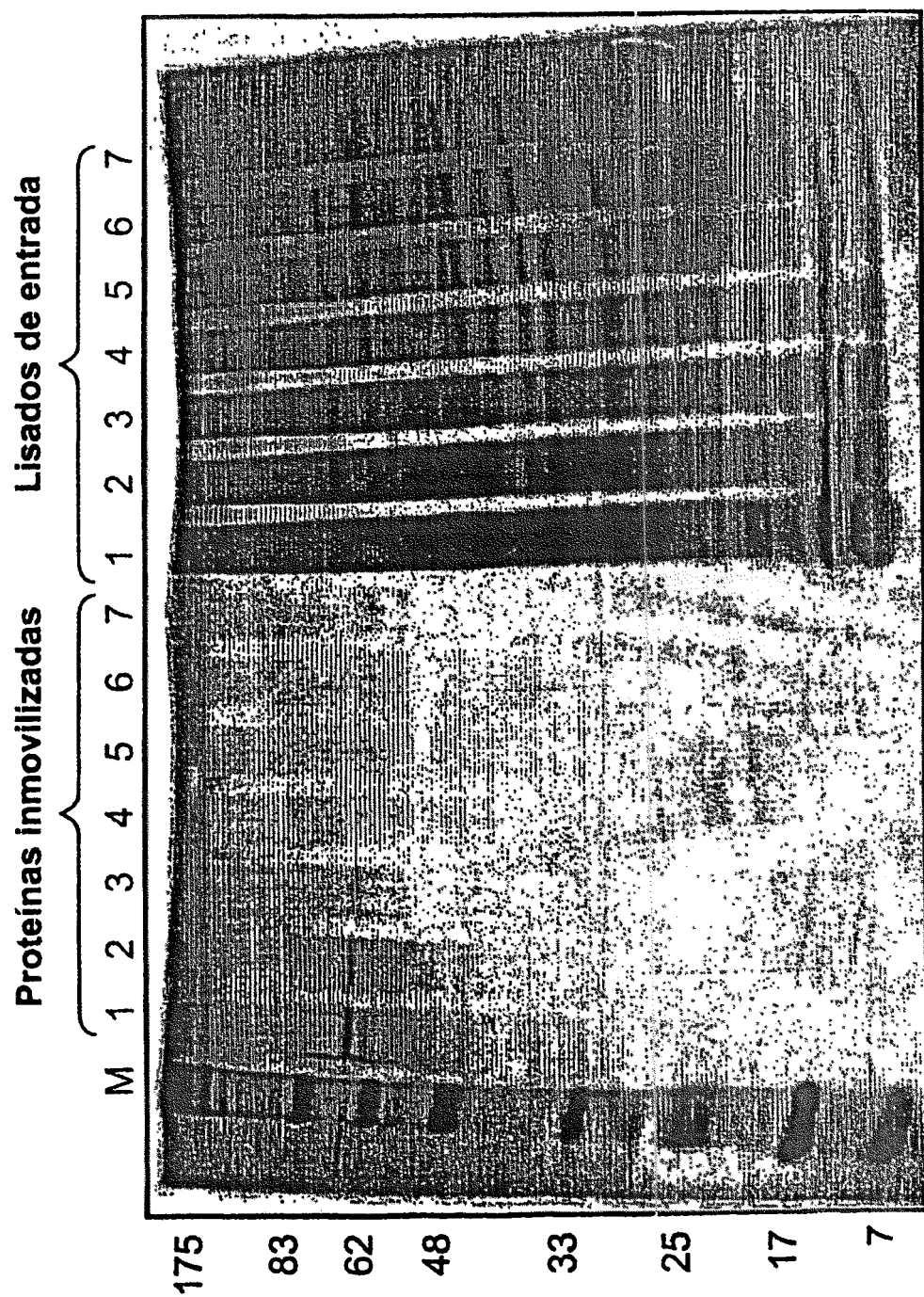


FIG. 6A

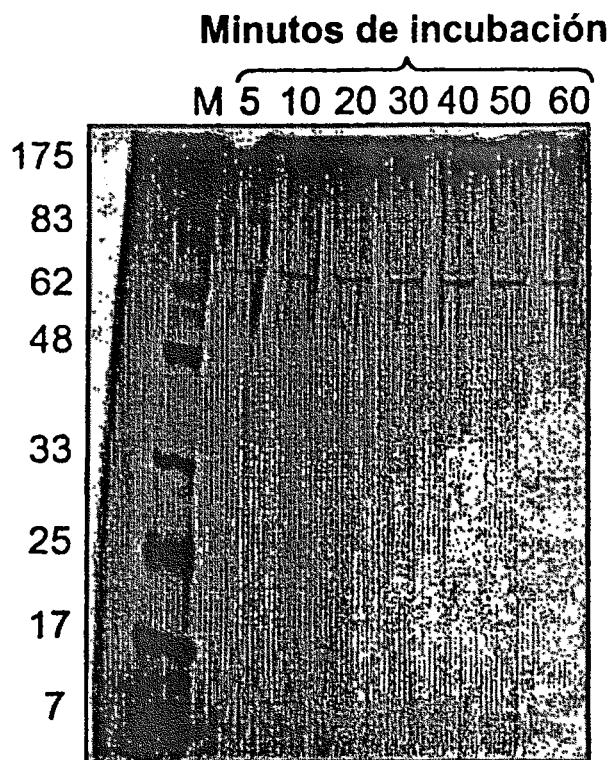


FIG. 6B

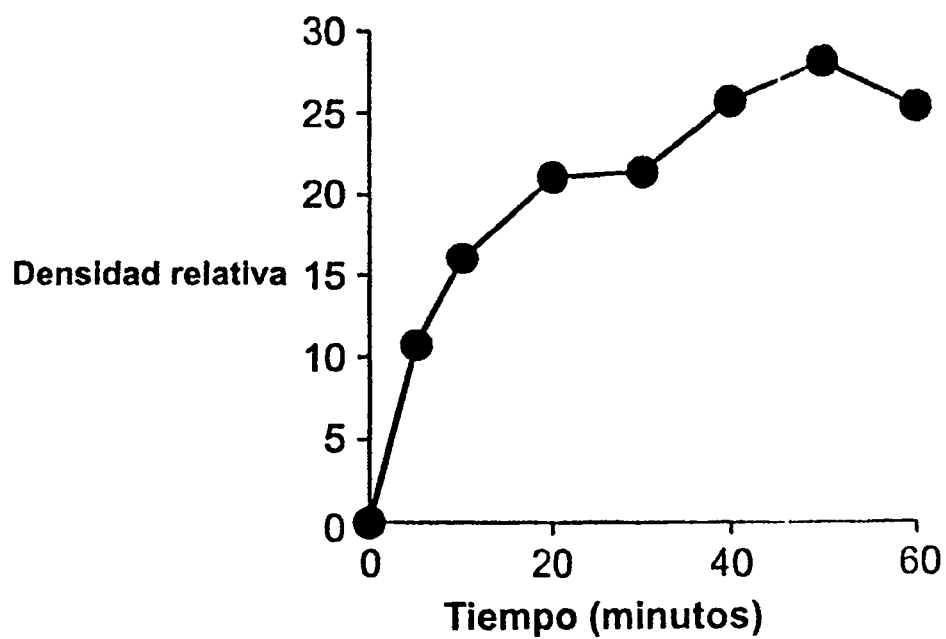


FIG. 7A

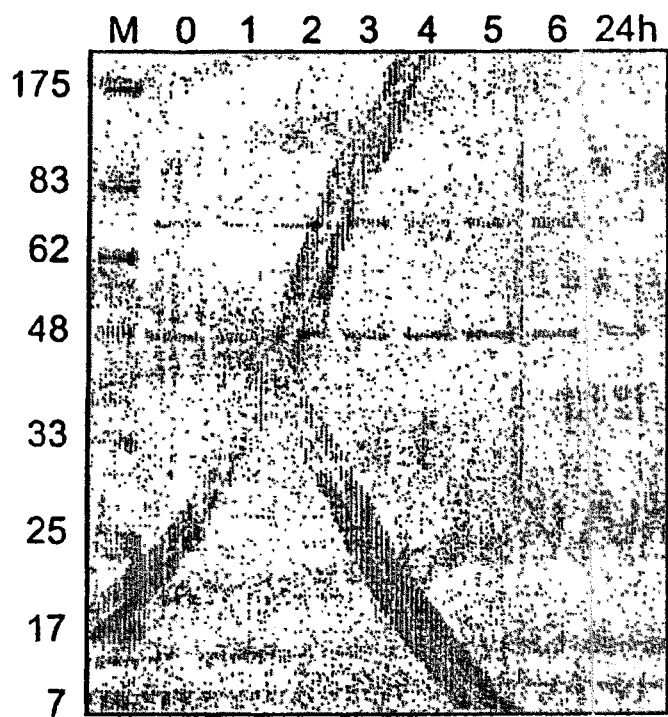


FIG. 7B

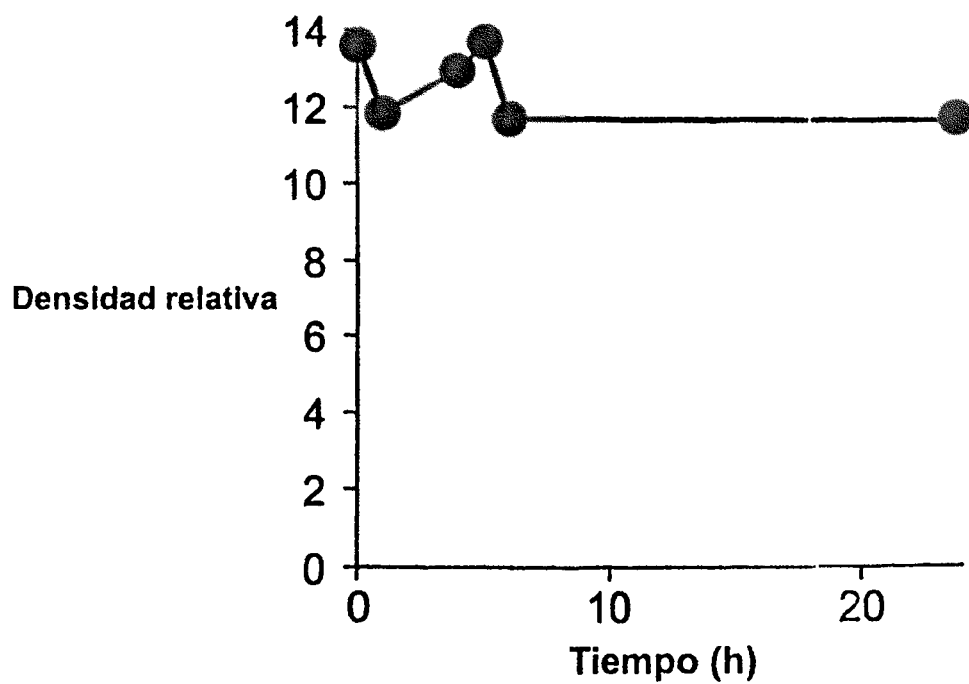


FIG. 8A

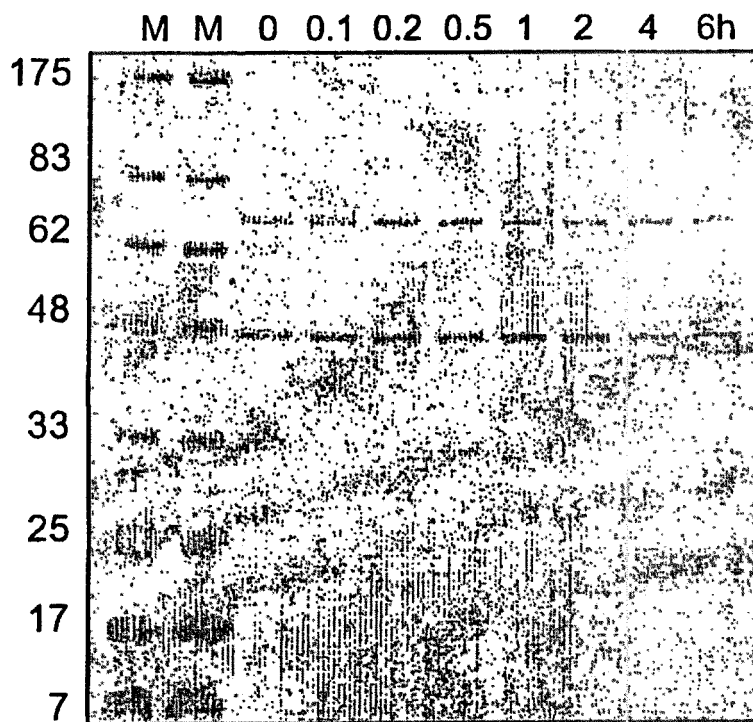


FIG. 8A

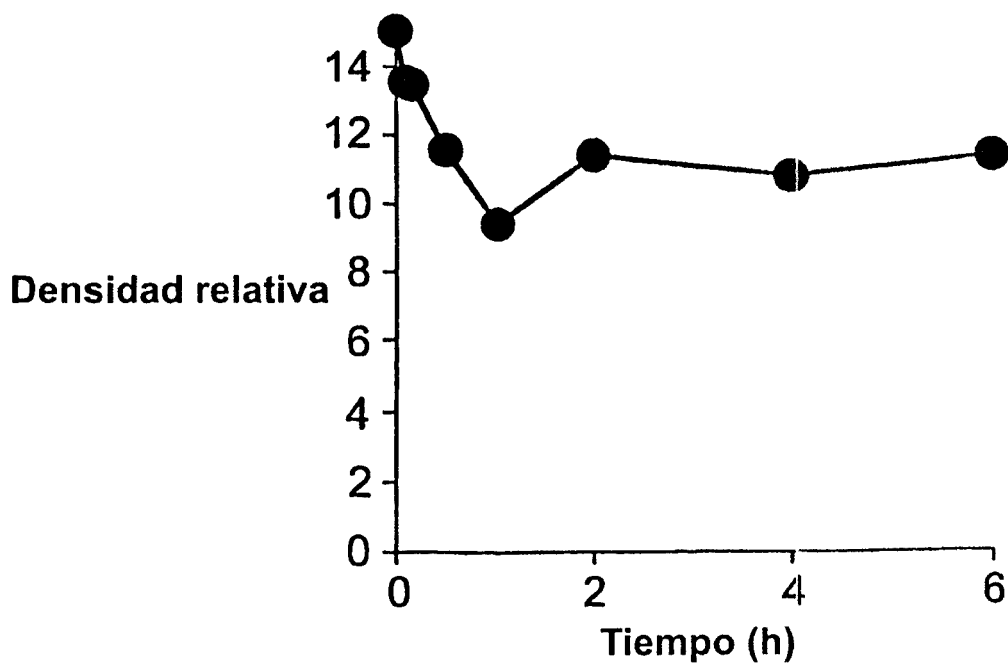


FIG. 9A

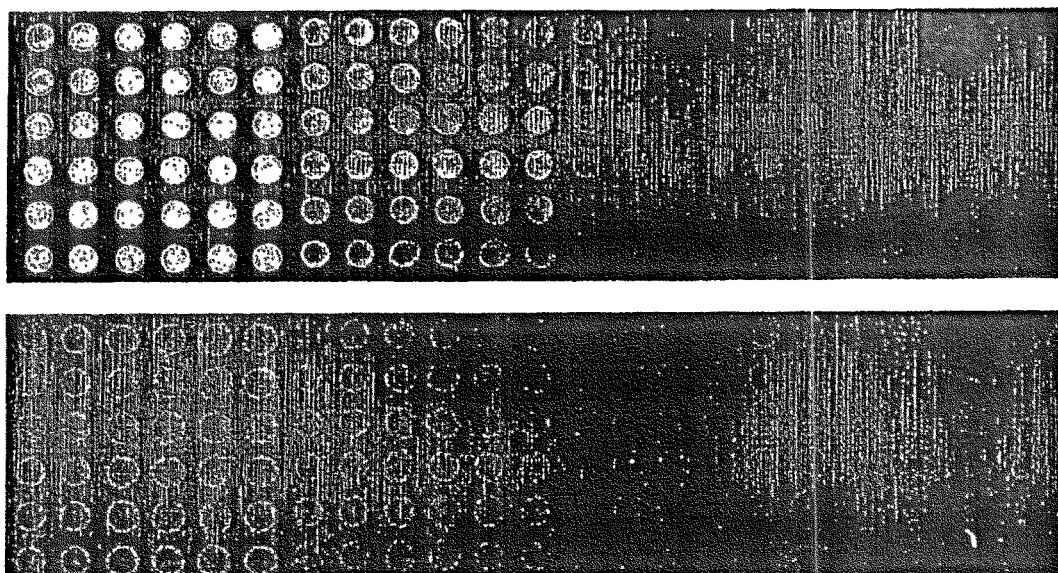


FIG. 9B

