



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 355 973**

51 Int. Cl.:
C12N 15/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03793896 .6**

96 Fecha de presentación : **05.09.2003**

97 Número de publicación de la solicitud: **1534830**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **01.06.2005**

54 Título: **Banco de expresión de péptidos *in vitro*.**

30 Prioridad: **06.09.2002 GB 0220759**
27.02.2003 GB 0304521
28.02.2003 GB 0304657

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.04.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.04.2011

73 Titular/es: **ISOGENICA LIMITED**
Stuart House City Road
Peterborough PE1 1QF, GB

72 Inventor/es: **McGregor, Duncan;**
Odegrip, Richard;
Fitzgerald, Kevin;
Hederer, Rosemarie;
Eldridge, Bill;
Ullman, Chris;
Kuhlman, Philip y
Coomber, David

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 355 973 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).

DESCRIPCION

Campo de la Invención

5 La presente invención se refiere generalmente a la tecnología de ADN recombinante y, más concretamente, a métodos *in vitro* para construir y escrutar genotecas de ADN en busca de secuencias de ADN que codifican moléculas biológicamente activas.

Antecedentes de la Invención

10 Aislar una gen desconocido que codifica un péptido deseado de una genoteca de ADN recombinante puede ser una tarea difícil. El uso de sondas de hibridación puede facilitar el procedimiento, pero su uso depende generalmente del conocimiento de al menos una porción de la secuencia del gen que codifica la proteína. Cuando la secuencia no se conoce, las genotecas de ADN se pueden expresar en un vector de expresión, y se han utilizado anticuerpos para escrutar placas o colonias en busca del antígeno proteico deseado. Este procedimiento ha sido útil en el escrutinio de genotecas pequeñas, pero se pueden pasar por alto fácilmente secuencias de escasa aparición que están representadas en menos de aproximadamente 1 en 15 10^5 clones, como es el caso de las moléculas de ADNc o de péptidos sintéticos de escasa aparición, haciendo el escrutinio de genotecas mayores de 10^6 en el mejor de los casos laborioso y difícil. El escrutinio de genotecas más grandes ha requerido el desarrollo de métodos diseñados para dirigir el aislamiento de secuencias de escasa aparición, que se basan en la selección simultánea de moléculas, junto con los ADN que las codifican. Se han desarrollado métodos *in vivo* para escrutar genotecas grandes, tales como la presentación en fagos y "péptidos sobre plásmidos" utilizando fusiones de péptidos *lacI*.

20 La presentación en fagos se basa en genotecas de ADN fusionadas al extremo N-terminal de las proteínas de la envoltura de bacteriófagos filamentosos y su expresión en un anfitrión bacteriano, dando como resultado la presentación de péptidos foráneos sobre la superficie de la partícula de fago con el ADN que codifica la proteína de fusión empaquetado en la partícula de fago (Smith G. P., 1985, Science 228: 1315-1317). Las proteínas de fusión incorporadas en el fago, pueden ser seleccionadas después en busca de miembros de unión contra dianas de interés (ligandos). Luego se puede permitir que el fago unido re-infecte bacterias *Escherichia coli* (*E. coli*) y después se amplifique y se repita la selección, dando como resultado el reclutamiento de miembros de unión (Parmley, S.F., y Smith, G. P. 1988., Gene 73: 305-318; Barrett R. W. et al., 1992, Analytical Biochemistry 204: 357-364 Williamson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 4141-4145; Marks et al., 1991, J. Mol. Biol. 222: 581-597).

30 La presentación en plásmidos de fusión *lacI* se basa en la capacidad de unión al ADN del represor *lac*. Las genotecas de péptidos al azar se fusionan al extremo C-terminal de la proteína represora *lacI*. La unión de la fusión *LacI*-péptido a su ADN codificante se produce por medio de las secuencias *lacO* del plásmido, formando un complejo péptido-*LacI*-péptido estable. Estos complejos son liberados de su bacteria anfitriona mediante lisis celular, y los péptidos de interés son aislados mediante purificación por afinidad sobre una diana receptora inmovilizada. Los plásmidos aislados de ese modo pueden ser re-introducidos en *E. coli* mediante electroporación para amplificar la población seleccionada para rondas adicionales de escrutinio (Cull, M. G. et al. 1992. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 89: 1865-1869).

40 Estos métodos bacterianos están limitados por el tamaño de la genoteca que se puede crear mediante los métodos actuales de introducción de ADN en la bacteria anfitriona, la toxicidad celular potencial de los péptidos expresados introducidos, y por la incapacidad para introducir modificaciones post-traduccionales, o para incorporar aminoácidos novedosos al péptido expresado.

45 Se ha descrito un sistema de ribosomas completamente *in vitro* basado en la conexión de péptidos al ARN que los codifica por medio del ribosoma (documento W091/05058). También se ha utilizado la presentación en ribosomas para la selección de fragmentos de anticuerpo Fv de cadena sencilla (scFv) (Matheakis, L. C. et al., 1994 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91: 9022- 9026; Hanes, J. y Pluckthun, A. 1997 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94: 4937-4942). Este método adolece de una menor estabilidad del material genético de ARN y un aumento de la degradación en ciertas condiciones de selección en las que es probable que esté presente la ARNasa.

50 El método *in vitro* descrito por Griffiths y Tawfik (documentos WO 99/02671 y WO 00/40712) trata algunos de estos asuntos mediante la compartimentalización de ADN antes de la expresión de los péptidos, que después modifican el ADN en el compartimento. Los péptidos susceptibles de modificaciones, resultantes de la actividad enzimática de interés, son seleccionados después en una etapa posterior. Sin embargo, no es posible la selección directa de la actividad de unión al péptido tanto del péptido como del ADN sin modificación del ADN que codifica ese péptido, y mediante liberación del ADN modificado del compartimento.

55 Otro método de la técnica anterior, la tecnología de presentación covalente, o CDT, se describe en el documento W09S37186. Este método se basa en el enlace covalente de la proteína al ADN para conservar la conexión del genotipo con el fenotipo, por medio de la acción *cis* de la proteína de entrecruzamiento. Este método ilustra que son necesarios dos requerimientos para un uso exitoso de esta técnica. En primer lugar, se

requieren proteínas que interaccionen *in vitro* con la secuencia de ADN que las codifica (acción cis), y en segundo lugar, dichas proteínas deben establecer un enlace covalente con su propio ADN molde. Este método adolece del hecho de que el ADN está modificado químicamente, lo que puede evitar la recuperación e identificación del péptido de unión de interés.

- 5 Sigue existiendo la necesidad de métodos *in vitro* más versátiles para construir genotecas peptídicas además de los métodos descritos más arriba, que puedan permitir la selección directa de la actividad de unión, así como la actividad enzimática, y que permitan la producción eficaz de estructuras peptídicas complejas, a la vez que permiten aún la recuperación del material genético intacto que codifica el péptido de interés.

Compendio de la invención

- 10 La presente invención proporciona por lo tanto un método para producir una genoteca de expresión de péptidos *in vitro* que comprende una pluralidad de péptidos, donde cada péptido está conectado a un constructo de ADN que codifica el péptido, que comprende las etapas de:

(a) proporcionar un constructo de ADN que comprende:

(i) una secuencia diana de ADN;

- 15 (ii) ADN que codifica un péptido miembro de la genoteca; y

(iii) ADN que codifica un péptido capaz de unirse no covalentemente

directa o indirectamente a dicha secuencia diana de ADN

de (ii);

donde dichos constructo de ADN y proteína codificada se seleccionan

- 20 para que tengan actividad cis;

(b) expresar una pluralidad de constructos de ADN de acuerdo con (a),

donde dichos constructos de ADN codifican una pluralidad de péptidos miembros de la genoteca de manera que cada péptido expresado está unido no covalentemente al ADN del cual fue producido.

- 25 Asimismo se proporciona un método para producir una genoteca de expresión de péptidos *in vitro* que comprende una pluralidad de péptidos, donde cada péptido está conectado al constructo de ADN que codifica el péptido, que comprende las etapas de:

(a) proporcionar un constructo de ADN que comprende:

(i) ADN que codifica un péptido miembro de la genoteca; y

- 30 (ii) ADN que codifica un péptido capaz de unirse no covalentemente a

un agente;

donde dichos constructo de ADN y proteína codificada se seleccionan

para que tengan actividad cis;

(b) unir dicho agente o una etiqueta de ADN capaz de unir un agente a

- 35 dicho constructo de ADN de (a), donde dicho agente es capaz de unirse al péptido codificado por dicho ADN de (ii); y

(c) expresar una pluralidad de constructos de ADN de acuerdo con (b),

donde dichos constructos de ADN codifican una pluralidad de péptidos miembros de la genoteca de manera que cada péptido expresado está conectado por medio de dicho agente al ADN del cual fue producido.

- 40 La presente invención se amplía a las genotecas de péptidos producidas por tales métodos y a los constructos de ADN utilizados en tales métodos.

- 45 La presente invención también proporciona métodos de escrutinio de genotecas de expresión de péptidos *in vitro* de la invención. En un aspecto se proporciona un método de identificación y/o purificación de un péptido que muestra las propiedades deseadas a partir de una genoteca de expresión de péptidos *in vitro* producida de acuerdo con el método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende al

5 menos las etapas de (a) escrutar dicha genoteca y (b) seleccionar y aislar el miembro relevante de la genoteca. En un segundo aspecto, se proporciona un método para identificar un péptido de unión al ligando específico, comprendiendo dicho método al menos las etapas de (a) escrutar una genoteca de expresión de péptidos *in vitro* producida de acuerdo con el método de la invención con moléculas de ligando que están opcionalmente unidas a un soporte sólido; (b) seleccionar y aislar un miembro de la genoteca que se une a dicha molécula diana; y (c) aislar el péptido que se une específicamente a dicha molécula diana. En un tercer aspecto se proporciona un método de identificación y/o purificación de un péptido que tiene la capacidad de unirse a una secuencia diana de ADN específica que comprende al menos las etapas de (a) proporcionar una genoteca de expresión *in vitro* de acuerdo con la invención donde dicho péptido o proteína de (iii) es un péptido miembro de la genoteca que tiene actividad de unión a ADN y donde dicha secuencia diana de ADN de (i) es la secuencia diana de interés; (b) seleccionar y aislar un miembro de la genoteca en el que la proteína codificada se une a dicha secuencia diana; (c) aislar el péptido que se une a dicha secuencia diana.

15 Además de aislar y/o identificar los péptidos específicos de las genotecas de la invención, se pueden utilizar los métodos de escrutinio de la invención para aislar y/o identificar el ADN que codifica los péptidos específicos de la genoteca.

Breve Descripción de las Figuras

La Figura 1 proporciona una representación esquemática de un método por medio del cual se puede conectar un constructo de ADN de la invención al péptido que lo codifica.

20 La Figura 2 proporciona una representación esquemática de un método de la invención por medio del cual la proteína de unión a ADN se puede convertir en una proteína de unión a ADN que actúa *in cis*.

La Figura 3 proporciona una representación esquemática de cómo una proteína de unión a ADN específica de una secuencia diana puede ser aislada de una genoteca de la invención.

25 La Figura 4 proporciona una representación esquemática de cómo una proteína de la genoteca puede ser conectada a su ADN codificante por medio de la acción *in cis* y el uso de una molécula de unión bi-específica.

La Figura 5 demuestra la actividad *in cis*: mezcla 1:1 de dos ADN de entrada de diferente tamaño (CK-RepA o V5-RepA) seleccionados frente a cualquier anticuerpo. 1-ADN Marcador; 2-Amplificación por PCR después de la selección sobre anticuerpo anti-CK humana; 3-Amplificación por PCR después de la selección sobre un anticuerpo anti-péptido V5.

30 La Figura 6 muestra la especificidad de los clones de unión al anticuerpo anti-V5. Escrutinio ELISA, leído a 450 nm, de los siete clones (1-7) que muestran unión específica al anticuerpo anti-V5. Las barras del grupo de cuatro representan la señal ELISA de los clones escrutados de izquierda a derecha; anticuerpo anti-región kappa humana, anticuerpo anti-V5, BSA, y blanco. Asimismo se presenta un control negativo que no expresa CK ni V5 (8).

35 La Figura 7 muestra las señales a una DO a 450 nm del ELISA del sobrenadante de cultivo para los péptidos recuperados después de 5 rondas de selección frente a esporas de *B. globigii* en el Ejemplo 4. A. = clon 1e; B. = clon 1f; C. = clon 1g; D. = clon 8a; E. = clon 10c; F. = clon 10e; G. = control negativo.

40 La Figura 8 muestra las señales de DO a 450 nm para péptidos aislados después de 4 rondas de selección frente a anticuerpo anti-V5 en el Ejemplo 5. A. = P1C12; B. = P2H1; C. = P1B5; D. = P2B8. Se sometieron a ensayo fagos con péptidos frente a anticuerpos anti-V5 y anti-péptido ACTH.

La Figura 9 muestra señales a DO 450 nm para péptidos sintéticos aislados después de 4 rondas de selección frente a ovoalbúmina. A. = C1; B. = C4; C. = C6; D. = C8; E. = control negativo. Los péptidos se sometieron a ensayo frente a ovoalbúmina, anticuerpo anti-V5 y placa bloqueada (plástico).

45 La Figura 10 muestra las recuperaciones por PCR de ADN de scFv tras la selección sobre BSA o BSA-mecoprop. A. scFv anti-mecoprop seleccionado sobre BSA, ox-glutatión 2,5 mM. B. scFv anti-mecoprop seleccionado sobre mecoprop-BSA, ox-glutatión 2,5 mM. C. scFv anti-mecoprop seleccionado sobre BSA, no ox-glutatión. D. scFv anti-mecoprop seleccionado sobre mecoprop-BSA, no ox-glutatión.

Breve Descripción de las Secuencias

Los SEQ ID No 1 a 11, 19 a 23, 26 a 35 y 45 a 47 muestran los cebadores utilizados en los Ejemplos.

50 El SEQ ID NO: 12 muestra la secuencia del constructo TAC-MYC-CK-REPA-CIS-ORI, el SEQ ID NO: 13 muestra la secuencia del constructo TAC-MYC-V5-REPA-CIS- ORI, el SEQ ID NO: 24 muestra la secuencia del constructo TAC-V5-REPA-CIS-ORI- 408 y el SEQ ID NO: 25 muestra la secuencia del constructo TAC-NNB-REPA-CIS- ORI-408.

El SEQ ID NO: 14 muestra la secuencia de reconocimiento de la diana del receptor de estrógenos.

Los SEQ ID NO: 15 y 16 muestran las secuencias de ADN y de aminoácidos del gen repA desde el plásmido R1 del grupo de incompatibilidad incFII. Los SEQ ID Nos 17 y 18 muestran las secuencias del elemento de ADN CIS y la secuencia ori del mismo sistema.

5 Los SEQ ID Nos 36 a 39 muestran las secuencias de péptidos aisladas después de la selección del Ejemplo 5. Los SEQ ID Nos 39 a 43 muestran las secuencias de los clones aislados en el Ejemplo 6.

Descripción Detallada de la Invención

10 La presente invención hace referencia a la construcción y escrutinio de una genoteca en busca de una secuencia de nucleótidos que codifica un péptido de interés *in vitro*. Los constructos que codifican el péptido de interés se diseñan de manera que el péptido expresado muestre actividad cis para el constructo. La actividad cis se define como la capacidad del péptido para unirse al ADN a partir del cual se produjo el péptido, esto es a partir del cual se transcribió y se tradujo. La expresión *in vitro* del constructo da como resultado la unión del péptido al ADN que codifica esa misma molécula de péptido por medio de una interacción no covalente. Esto difiere de lo ilustrado en el documento WO 98/37186, que no cuenta con la posibilidad de interacción no covalente *in vitro* entre la proteína y el ADN que la codifica, y excluye específicamente en efecto que tales interacciones tengan un uso práctico para el escrutinio de la genoteca.

20 La unión no covalente hace referencia a una asociación que se puede romper por métodos bien conocidos por los expertos en la técnica, tales como la adición de un disolvente apropiado, o un cambio en las condiciones iónicas, por ejemplo, la adición de glicina de pH bajo o trietilamina de pH elevado. En el presente caso, un ejemplo típico de unión no covalente sería la interacción no covalente entre una proteína de unión a ADN y una molécula de ADN. Por el contrario, cuando se forma un enlace covalente entre el ADN y el polipéptido codificado, el péptido o la proteína presentados no serán liberados del ADN por condiciones iónicas y disolventes que romperían las interacciones proteína de unión a ADN:ADN no covalentes. Por ejemplo, la proteína de replicación bacteriana repA se une no covalentemente a su secuencia de ADN diana oriR y puede ser liberada de esta secuencia de ADN diana a concentraciones de sal mayores de KCl 0,2 M (Giraldo R. & Diaz R. 1992 J. Mol. Biol. 228: 787-802). Esta concentración de sal no afectaría a un enlace covalente, que requeriría condiciones mucho más rigurosas para liberar la proteína unida covalente, con mayor riesgo de dañar el ADN recuperado.

30 La presente invención describe la actividad cis y la unión no covalente que permite que el péptido o proteína codificados permanezcan asociados con el constructo de ADN con una vida media suficiente para permitir que los péptidos individuales y el ADN asociado que codifica ese péptido con una actividad de interés sean separados de la mezcla resultante de complejos de proteína-ADN. Por ejemplo, la asociación entre la proteína codificada y su ADN puede tener una vida media de hasta 30 minutos, hasta 45 minutos, hasta una hora, hasta 2 horas, hasta 6 horas o hasta 12 horas. Los métodos de escrutinio de la invención se pueden llevar a cabo inmediatamente después de la construcción de la genoteca, o más tarde, por ejemplo hasta una, hasta dos, hasta seis, hasta doce horas o hasta veinticuatro horas o más de veinticuatro horas más tarde.

40 Sorprendentemente, por lo tanto, la invención descrita en la presente memoria demuestra que tales péptidos o proteínas codificados pueden ser expresados *in vitro* y unidos al ADN que codifica ese péptido en presencia de otras secuencias de ADN. La invención también demuestra que no se requiere que la conexión covalente entre la proteína y el ADN mantenga dicha actividad cis, y que una interacción no covalente entre ADN y proteína de unión es suficiente para permitir la selección de péptidos en un sistema de expresión y selección *in vitro*.

45 De acuerdo con la presente invención, los miembros de la genoteca de ADN individuales, cada uno de los cuales codifica un péptido que se va a expresar en la genoteca de expresión de péptidos (péptidos miembros de la genoteca), se colocan en un constructo de ADN adecuado. El constructo de ADN en el cual se coloca el miembro de la genoteca de ADN incluye todas las secuencias necesarias para permitir la expresión del péptido miembro de la genoteca a partir del constructo y para permitir que el péptido codificado por el constructo se una al constructo de ADN que lo codificó. Cada péptido de la genoteca comprenderá típicamente una proteína de fusión que comprenda el péptido miembro de la genoteca fusionado a un péptido implicado en la unión de la proteína de fusión al constructo de ADN relevante. Tales proteínas de fusión pueden comprender secuencias adicionales y dicho péptido de la genoteca puede ser unido a dicho péptido de unión por medio de una secuencia conectora.

55 Una pluralidad de tales constructos, que codifican cada uno una pluralidad de péptidos miembros de la genoteca diferentes forman una genoteca de ADN de la invención. La expresión de tal genoteca de moléculas de ADN da como resultado la unión no covalente de las proteínas codificadas individuales al ADN que las codifica y a partir del cual han sido transcritas y traducidas, en presencia de otras muchas moléculas de ADN que codifican otros miembros de la genoteca. La secuencia que codifica el miembro de la genoteca de péptidos presente en una proteína concreta estará presente por lo tanto en el ADN que se una a esa proteína. Por lo tanto este procedimiento une el péptido miembro de la genoteca, en una forma biológicamente activa (normalmente con actividad de unión) a la secuencia de ADN miembro de la genoteca específica que codifica

ese péptido, permitiendo la selección de péptidos de interés, por ejemplo debido a una actividad de unión concreta, y el posterior aislamiento e identificación del ADN que codifica ese péptido miembro de la genoteca.

5 Para los fines de la invención una genoteca de ADN es por lo tanto una población de constructos de ADN. Cada constructo comprende una secuencia de ADN que codifica un péptido que va a ser expresado como un péptido miembro de una genoteca y contiene cada uno un promotor apropiado, señales de inicio y terminación de la traducción. Una genoteca de ADN de la invención contendrá una pluralidad de tales moléculas de ADN. Se proporciona una pluralidad de constructos de ADN que codifican cada uno un péptido miembro de la genoteca para proporcionar una pluralidad de miembros de la genoteca diferentes. Preferiblemente una genoteca de ADN contendrá al menos 10^4 moléculas de ADN discretas. Por ejemplo, una genoteca de ADN puede contener más de 10^6 , más de 10^8 , más de 10^{10} , más de 10^{12} o más de 10^{14} moléculas de ADN discretas.

15 Una genoteca de expresión de péptidos se define como una población de secuencias peptídicas expresadas a partir de una genoteca de moléculas de ADN. Una genoteca de expresión de péptidos de la presente invención abarca por lo tanto una genoteca de péptidos que están unidos no covalentemente al ADN que los codifica. Por ejemplo, una genoteca de expresión de péptidos de la presente invención puede ser una genoteca de al menos 10^4 proteínas discretas que comprenden cada una una secuencia peptídica de la genoteca, expresada a partir de una genoteca de moléculas de ADN. Una genoteca de expresión de péptidos de la invención puede ser cualquier genoteca formada por la expresión de una genoteca de ADN de la presente invención.

20 Se puede definir un miembro de una genoteca de péptidos como una cadena de aminoácidos de composición variable de al menos dos aminoácidos de longitud, o una parte o la totalidad de una proteína de origen natural tal como una enzima, una molécula de unión tal como un receptor o un anticuerpo o uno de sus fragmentos. Un miembro de una genoteca de péptidos adecuada puede ser un péptido que tenga una composición de aminoácidos al azar. El péptido de composición variable o al azar puede estar flanqueado por secuencias de aminoácidos conocidas en el extremo N y/o C para constreñir la estructura. Estas secuencias conocidas pueden tener una longitud variable. El péptido de composición variable o al azar puede ser insertado en diferentes posiciones en un armazón de proteína conocido, tal como un receptor o anticuerpo u otra proteína o uno de sus fragmentos. El péptido puede ser insertado en el mismo armazón de proteína una vez o más de una vez, por ejemplo dos o más veces.

30 Un constructo de ADN de acuerdo con la presente invención puede comprender ADN que codifica un péptido miembro de la genoteca y los medios para que el péptido codificado se una al constructo de ADN codificante. Además del ADN que codifica un péptido miembro de la genoteca, un constructo de ADN adecuado de la invención comprende al menos una secuencia diana de ADN y ADN que codifica un péptido capaz de unirse directa o indirectamente a la secuencia diana de ADN.

35 De acuerdo con la presente invención, el constructo de ADN y la proteína codificada se seleccionan para que tengan actividad cis. Esto es, la proteína codificada tiene la capacidad de unirse específicamente a la molécula de ADN que la codifica. Por ejemplo, la actividad cis puede funcionar permitiendo que el péptido de unión a ADN codificado se una específicamente (directa o indirectamente) a la secuencia diana del constructo de ADN que lo codificó en lugar de a la secuencia diana de otro constructo de ADN.

40 En algunos casos, se puede proporcionar actividad cis debido a la presencia de un elemento de ADN que dirige la actividad cis, esto es, que permite u obliga a la proteína codificada por el constructo de ADN a tener actividad cis, y por lo tanto se une a su secuencia codificante. En otros casos, un elemento de ADN separado por se puede no ser necesario cuando la naturaleza del ADN codificante confiere inherentemente actividad cis al péptido codificado.

45 Un elemento de ADN que dirige la actividad cis puede ser proporcionado en el constructo de ADN junto con el ADN que codifica un péptido que interacciona con ese elemento cis. Por ejemplo, en el caso del elemento cis del sistema repA comentado más abajo, el ADN que codifica un fragmento de la secuencia repA que comprende al menos 20 aminoácidos del extremo C de repA puede ser proporcionado junto con el elemento de ADN en cis. Puede ser posible conferir actividad cis a un péptido de unión a ADN que normalmente no actúa en cis incluyendo en el constructo de ADN semejante elemento de ADN y cualquier secuencia adicional necesaria para su acción. Por ejemplo, el ADN que codifica un péptido que interacciona con el elemento cis utilizado puede ser incluido en el constructo de ADN.

50 Alternativamente, un péptido que interacciona con el elemento cis puede ser parte del péptido de unión a ADN. Por ejemplo, el péptido de unión a ADN puede ser repA que comprende la secuencia que interacciona con el elemento cis de repA. Alternativamente, el péptido de unión a ADN se puede unir a su ADN codificante en cis sin la necesidad de un elemento cis separado.

55 Un elemento de ADN adecuado puede ser cualquier elemento que permita o dirija la actividad cis. Tal elemento de ADN puede actuar, por ejemplo, interactuando con la maquinaria implicada en la traducción y la transcripción del constructo de ADN para retrasar la producción y liberación del péptido codificado.

5 Cualquier elemento de ADN que permite que el péptido codificado se una específicamente a la molécula de ADN que lo codificó puede ser utilizado como elemento de ADN de acuerdo con la presente invención. Un ejemplo de un elemento de ADN adecuado es el de un sistema repA-cis descrito con más detalle más abajo. En ese sistema, la ARN polimerasa es detenida por bucles en la secuencia cis 5' antes de la terminación de la transcripción dependiente de rho. La acción del elemento de ADN permite por lo tanto que el péptido de unión codificado se una a la secuencia diana de ADN en el constructo del cual fue producido.

10 Preferiblemente, el elemento de ADN cis estará localizado 3' en el constructo de ADN con respecto al péptido miembro de la genoteca y con respecto al péptido o la proteína capaces de unirse a la secuencia de ADN diana. Esto significa que estas secuencias pueden ser transcritas y traducidas antes de que la ARN polimerasa alcance la secuencia que actúa en cis.

15 De acuerdo con la presente invención, el péptido de unión puede ser conectado al constructo de ADN directamente o indirectamente. En el caso de la unión directa, el péptido de unión se une directamente y no covalentemente a la secuencia diana de ADN. En el caso de la unión indirecta, la conexión entre el péptido de unión y el constructo de ADN es proporcionada por una molécula adicional. Semejante molécula, por ejemplo un agente bifuncional como se describe más abajo, se asociará tanto con el péptido como con la secuencia diana de ADN.

Un constructo de ADN adecuado puede comprender secuencias adicionales, por ejemplo secuencias promotoras adecuadas para permitir la expresión del péptido codificado.

20 Un ejemplo de un sistema en el cual existe actividad cis es el sistema de proteínas de replicación de plásmidos del grupo de incompatibilidad que actúan en cis, denominado repA. En la presente invención se pueden utilizar aspectos de este sistema como se explica más abajo.

Numerosos plásmidos incluyen secuencias que codifican repA y elementos de ADN en cis. La secuencia repA y el elemento de ADN en cis presentes un constructo de ADN de la invención se pueden obtener de la misma cepa de plásmido o se pueden obtener de cepas de plásmidos diferentes.

25 Se cree que el sistema repA-cis actúa como se muestra en la Figura 1. En resumen, la ARN polimerasa es detenida por bucles en la secuencia 5'-CIS antes de la terminación de la transcripción dependiente de rho. Esto permite la interacción transitoria del péptido repA C-terminal con CIS, y posiblemente la flexión del ADN. El péptido RepA se une después a ori, que está a una distancia definida del aminoácido terminal de la secuencia codificante de repA (Praskier et al. 2000 J. Bacteriology 182: 3972-3980; Praskier y Pittard 1999 J. Bacteriol. 181:2765-2772; Masai y Arai. 1988 Nucleic Acids Res. 16: 6493-6514).

La compatibilidad de una secuencia RepA de un plásmido con una secuencia cis de otro plásmido se puede determinar fácilmente controlando la interacción de RepA con la secuencia cis seleccionada.

35 Las proteínas repA adecuadas y las secuencias y los elementos de ADN cis incluyen los de los plásmidos del complejo IncI o los plásmidos IncF, IncB, IncK, IncZ e IncL/M, que están lejanamente relacionados a nivel de ADN, pero que controlan la replicación plasmídica a través de la acción de la proteína repA que actúa en cis (Nikoletti et al. 1986 J. Bacteriol. 170: 1311- 1318; Praskier J. et al. 1991 J. Bacteriol. 173: 2393-2397). Los plásmidos específicos que se pueden utilizar para proporcionar estas secuencias incluyen el plásmido RI del grupo de incompatibilidad IncII y el plásmido incB pMU720 (descrito por Praskier J. & Pittard J. 1999 Role of CIS in replication of an IncB plasmid. J. Bacteriol. 181: 2765-2772). Las secuencias de ADN y de aminoácidos de repA derivado del plásmido R1 de IncII se dan en los SEQ ID NO: 15 y 16. La secuencia de ADN de este elemento de ADN cis del plásmido R1 de IncII se da en el SEQ ID NO: 17. Típicamente, el elemento cis tiene de 150 a 200 nucleótidos de longitud. Se pueden utilizar secuencias más cortas o más largas, con tal que la secuencia conserve la capacidad para interactuar con RepA y presentar actividad cis. También se contemplan variaciones minoritarias, tales como sustituciones o deleciones en la secuencia cis tales como modificaciones en 1, 5, 10 hasta 20 nucleótidos en la secuencia cis de tipo salvaje.

45 El elemento cis es necesario para la actividad cis de la proteína repA (Praskier y Pittard 1999 J. Bacteriol. 181: 2765-2772). El elemento de ADN cis también debe estar localizado por lo tanto en 3' en el constructo de ADN con respecto al ADN que codifica la secuencia repA. Al alcanzar esta secuencia cis, la ARN polimerasa será detenida, permitiendo que la proteína codificada se una a la secuencia diana de ADN.

50 En una realización de la presente invención, la propia proteína de unión a ADN comprende RepA o uno de sus fragmentos o variantes capaces de unirse al ADN, incluyendo al menos 20 aminoácidos C-terminales de RepA capaces de unirse al elemento de ADN cis. En esta realización, la secuencia diana de ADN comprende una secuencia ori, por ejemplo la secuencia oriR. En aspectos alternativos de la presente invención, la proteína de unión a ADN es proporcionada por una proteína alternativa con las secuencias diana de ADN relevantes reconocidas por semejante proteína de unión incorporadas a la secuencia. En cada una de estas realizaciones, la unión ADN-proteína es directa ya que el péptido codificado por el constructo de ADN se unirá directamente al constructo de ADN codificante. En aspectos alternativos de la invención, como se

describe con más detalle más abajo, la unión ADN-proteína puede ser indirecta por medio del uso de una etiqueta peptídica-etiqueta de ADN, agente bifuncional y/o conectores adecuados.

5 En un aspecto, la misma secuencia puede proporcionar por lo tanto tanto el péptido capaz de unirse a la secuencia diana de ADN como los aminoácidos C-terminales de repA. Tal secuencia puede ser o puede comprender una secuencia repA completa, o un fragmento o variante de una secuencia repA que conserva la capacidad para unirse a la secuencia diana de ADN utilizada. Cuando repA actúa como una proteína de unión a ADN, se requieren tanto secuencias cis como ori (Praszkier y Pittard 1999 J. Bacteriol. 181 : 2765-2772) para la actividad cis (cis) y la unión al ADN (ori). En este aspecto, por lo tanto, la secuencia diana de ADN es una secuencia ori y el péptido o proteína capaz de unirse a dicha diana es una proteína repA. La posición de ori en los constructos de ADN de la invención puede variar. Como se ha descrito antes, las secuencias repA, cis y ori adecuadas pueden ser proporcionadas por uno o más plásmidos. Por ejemplo, se pueden proporcionar secuencias adecuadas a partir de los plásmidos complejos IncI o los plásmidos IncF, IncB, IncK, IncZ e IncL/M. La secuencia de ADN del ori desde el plásmido RI de IncII se proporciona en el SEQ ID NO: 18. Esta secuencia, o uno de sus fragmentos puede ser incluida en un constructo de ADN de la invención. Un constructo de ADN de la invención puede incluir una secuencia ori completa o puede incluir uno de sus fragmentos que sea capaz de ser unido por la proteína repA que está siendo utilizada.

20 La proteína RepA utilizada de acuerdo con la presente invención también puede comprender un fragmento o variante de RepA, con tal que semejante variante o fragmento de RepA conserve la capacidad para unirse a la secuencia ori seleccionada. Semejante variante o fragmento de RepA puede incluir sustituciones, por ejemplo, en 1, 2, 3 hasta 20 aminoácidos en la secuencia RepA con tal que tales variantes conserven la capacidad para unirse a la secuencia ori. Un fragmento adecuado de RepA es una secuencia de unión ori de RepA. Las secuencias ori incluyen aquellas que están presentes en los plásmidos de tipo salvaje descritos más arriba. Típicamente, semejante secuencia ori tiene de 170 a 220 nucleótidos de longitud. También se pueden utilizar fragmentos y variantes de las secuencias ori de tipo salvaje, con tal que tales secuencias ori conserven la capacidad para ser reconocidas por RepA. Adicionalmente se pueden utilizar los miembros que actúan en cis de la familia de proteínas de RepA. Por ejemplo, la familia de proteínas de RepA se encuentra en plásmidos con una amplia gama de anfitriones, esto es, se puede encontrar un plásmido RepA en diferentes especies bacterianas. El aislamiento de un plásmido de la familia de repA (por ejemplo) de una bacteria termófila, sulfófila, halófila o acidófila, proporcionaría ADN repA- cis-ori que podría ser utilizado en la presente invención a temperaturas elevadas o concentraciones extremas de sal, pH o azufre. Tales miembros de la familia de RepA serían ventajosos en el aislamiento de miembros de la genoteca que se pueden unir a moléculas diana en tales condiciones extremas. Tales secuencias ori adecuadas para su uso combinado con proteínas RepA seleccionadas pueden ser determinadas fácilmente controlando la interacción de RepA con dicha secuencia ori.

35 El principio básico de la invención puede ser descrito por lo tanto con referencia al sistema repA/cis/ori, como se muestra en la Figura 1. Ésta muestra un ejemplo de un constructo de ADN de la invención. Este constructo comprende, de 5' a 3', una secuencia promotora, una secuencia que codifica un péptido miembro de la genoteca, una secuencia que codifica una proteína repA, un elemento de ADN cis y una secuencia ori. En resumen, la secuencia de ADN se transcribe desde el promotor por medio de la ARN polimerasa a ARN. La función de terminación dependiente de rho presente en el elemento de ADN cis hace que la ARN polimerasa se detenga en este paso de la secuencia. Esto permite que la proteína repA y la genoteca de péptidos sean traducidas. Después la proteína repA es capaz de unirse a la secuencia ori, conectando la proteína codificada al constructo de ADN codificante.

45 En una realización preferida, las secuencias de ADN miembros de la genoteca se fusionan al ADN de repA, cis y ori del plásmido IncFII RI (Masai H et al. 1983 Proc Natl Acad Sci USA 80: 6814-6818). En esta realización, las secuencias de ADN miembros de la genoteca de interés pueden estar unidas por una región de ADN que codifica un conector de aminoácidos flexible, al extremo 5' del ADN de repA, bajo el control de un promotor apropiado y secuencias de traducción para la transcripción/traducción *in vitro*. Muchos promotores adecuados son conocidos por los expertos en la técnica, tales como araB, el promotor tac y los promotores de T7, T3 o SP6, entre otros. El promotor debe estar aguas arriba de la secuencia polipeptídica que se va a expresar.

La familia de proteínas repA se utiliza en la presente memoria a modo de ejemplo, no de limitación. Se podrían utilizar en esta invención otras proteínas de unión a ADN que actúan en cis que se unen no covalentemente no relacionadas.

55 En una realización adicional, las proteínas de unión a ADN que no actúan en cis se pueden convertir para que tengan actividad cis (véase la Figura 2). Esto se puede lograr utilizando tales proteínas, capaces de unirse a la secuencia diana de ADN, ya sea directamente o indirectamente, combinadas con secuencias que pueden conferir actividad cis a las mismas. La actividad cis puede ser conferida a una proteína de unión que normalmente no actúa en cis incluyendo en el constructo de ADN un elemento de ADN que dirige la actividad cis tal como el elemento cis del sistema repA. Semejante elemento puede ser incluido para asegurarse de que la unión al ADN por la proteína de unión a ADN es cis, esto es, una proteína de unión a ADN codificada se unirá al constructo de ADN a partir del cual ha sido transcrita y traducida.

En una realización, un constructo de ADN adecuado puede comprender por lo tanto el elemento de ADN que dirige la actividad cis (el elemento de ADN cis) del sistema repA. Tal elemento puede comprender adicionalmente ADN que codifica una porción del extremo C-terminal de RepA, preferiblemente al menos 20 aminoácidos, más preferiblemente 30 aminoácidos, hasta 40, 50, 60 o 70 aminoácidos de la porción C-terminal de repA, donde dicho fragmento de repA es capaz de interactuar con el elemento de ADN del constructo. En un ejemplo adicional, se podrían utilizar proteínas tales como las transposasas que actúan en cis, Tn5 e IS903, entre otras, en la presente invención (McFall E. J. *Bacteriol.* 1986 Aug 167: 429-432; Derbyshire KM & Grindley ND. *Mol Microbiol.* 1996 Sep 1: 1261-72.). Las secuencias codificantes de ADN de la presente invención pueden comprender secuencias de tipo salvaje que codifican el fragmento deseado de RepA, secuencias degeneradas que codifican fragmentos de RepA de tipo salvaje o secuencias que codifican variantes de tales fragmentos de RepA que conservan la capacidad para interactuar con el elemento cis incorporado en el constructo de ADN. Tales variantes pueden incluir la sustitución de 1, 2, 3 o 4 aminoácidos de los 20 aminoácidos del extremo C-terminal de RepA.

La familia repA de proteínas se utiliza en la presente memoria a modo de ejemplo, no de limitación. Se podría utilizar cualquier elemento de ADN capaz de conferir actividad cis a una proteína que no actúa en cis.

De este modo se puede convertir cualquier proteína que no actúa en cis. A modo de ejemplo, no excluyente, se puede convertir el dominio de unión a ADN del receptor de estrógeno (DBD) en una proteína de unión a ADN que actúa en cis. El fragmento del dominio de unión a ADN del receptor de estrógeno (aminoácidos 176-282) ha sido expresado en *E. coli* y se ha demostrado que se une a la secuencia de nucleótidos HRE diana del receptor de estrógeno de ADN de doble hebra específico, con una afinidad similar (0,5 nM) a la de la molécula parental (Murdoch et al. 1990, *Biochemistry* 29: 8377-8385; Mader et al., 1993, *DNAs Research* 21: 1125-1132). En una realización, el ADN que codifica esta secuencia se fusiona, preferiblemente en el extremo 3', al ADN que codifica al menos los últimos 20 aminoácidos de repA, el elemento de ADN cis, y el ADN hasta la secuencia ori seguido de la secuencia de reconocimiento diana del receptor de estrógeno (5'-TCAGG TCAGA GTGAC CTGAG CTAAC ATAAC ACATT CAG-3', SEQ ID NO: 14) que reemplaza la secuencia de reconocimiento repAori. Las secuencias de ADN de interés se pueden empalmar después por medio de una región de ADN que codifica un conector de aminoácidos flexible, al extremo 5' del fragmento de ADN del receptor de estrógeno, bajo el control de un promotor apropiado y secuencias de traducción para la transcripción/traducción *in vitro*. La expresión de este polipéptido dirige la DBD del receptor de estrógeno a su secuencia diana, presente en lugar de la secuencia ori normal, en el ADN que codifica ese polipéptido. Los complejos de proteína-ADN se pueden aislar después por captura sobre una proteína diana. Los complejos de proteína-ADN no unidos se pueden lavar, permitiendo el enriquecimiento en ADN que codifica los péptidos o proteínas de interés, que pueden ser recuperados mediante PCR, y enriquecidos adicionalmente realizando varios ciclos adicionales de expresión *in vitro* y captura del complejo de proteína-ADN utilizando los métodos descritos previamente.

Resultará evidente que este enfoque se aplicará a otras proteínas de unión a ADN utilizando simplemente el elemento de ADN cis y una secuencia que codifique al menos los 20 aminoácidos C-terminales de repA, o elementos equivalentes de un sistema que actúa en cis diferente en los constructos de ADN.

En otra realización, las genotecas de proteínas de unión a ADN aleatorizadas, tales como proteínas en dedo de cinc, proteínas en hélice-bucle-hélice o proteínas en hélice-giro-hélice a modo de ejemplo, pueden ser escrutadas en busca de unión específica a una secuencia diana de interés (véase la Figura 3). En esta realización, la secuencia de reconocimiento ori de repA puede ser reemplazada por una secuencia diana de interés, y la mayoría de la secuencia codificante de repA por una genoteca de proteínas en dedo de cinc aleatorizadas. Las proteínas de unión a ADN actúan por lo tanto como péptidos miembros de la genoteca y como proteínas capaces de unirse a la secuencia diana de ADN en este aspecto. El ADN que codifica cada proteína en dedo de cinc, se puede unir adicionalmente, en el extremo 5', a una secuencia de una etiqueta peptídica que puede ser reconocida por otra proteína de captura tal como un anticuerpo, y en el extremo 3', al ADN que codifica al menos los últimos 20 aminoácidos de repA, el elemento de ADN cis, y el ADN hasta la secuencia ori seguido de la secuencia diana de interés. La expresión de este polipéptido dirige la proteína en dedo de cinc a la secuencia diana de interés, presente en lugar de la secuencia ori normal, en el ADN que codifica ese polipéptido. La unión a la secuencia diana solamente se producirá si el dominio en dedo de cinc aleatorizado es capaz de unirse a la secuencia de interés. Los complejos de proteína-ADN se pueden aislar después mediante la captura con una proteína de unión que reconoce la etiqueta peptídica en el extremo N del polipéptido – proteína de fusión. El ADN no unido se puede lavar, permitiendo el enriquecimiento en ADN que codifica las proteínas en dedo de cinc capaces de unirse a la secuencia diana, que puede ser recuperada mediante PCR, y enriquecida adicionalmente realizando varios ciclos adicionales de expresión *in vitro* y captura del complejo proteína-ADN.

Como se ha explicado más arriba, el péptido de unión se puede unir directamente a la secuencia diana de ADN, por ejemplo en el caso de un par de proteína de unión a ADN-secuencia diana, o se puede unir indirectamente a la secuencia diana de ADN, por ejemplo por medio de un agente bifuncional y opcionalmente una etiqueta de ADN (véase la Figura 4).

En una realización, el ADN que codifica una etiqueta peptídica que no es capaz de unirse directamente a la secuencia diana de ADN se empalma al extremo 5' de la secuencia o las secuencias miembros de las genotecas de interés, opcionalmente por medio de una región de ADN que codifica un conector de aminoácidos flexible, bajo el control de un promotor apropiado y secuencias de traducción para la transcripción/traducción *in vitro*. Esto forma el ADN que codifica el péptido de unión, ya que el péptido codificado está conectado indirectamente a la secuencia diana de ADN. Opcionalmente en el extremo 3' de la secuencia de ADN miembro de la genoteca está el ADN que codifica al menos los últimos 20 aminoácidos de repA y el elemento de ADN cis, pero no la secuencia diana ori de repA. La secuencia diana de ADN puede ser o puede comprender una etiqueta de ADN. Semejante etiqueta de ADN puede ser una única base modificada. Por ejemplo, cuando se prepara el constructo de ADN de la genoteca que contiene los elementos descritos, el ADN puede ser etiquetado en el extremo 3', a modo de ejemplo pero no de limitación, con moléculas tales como fluoresceína o biotina.

Antes de la expresión *in vitro*, se pueden mezclar los fragmentos de ADN de la genoteca con un agente bifuncional, una de cuyas funciones es reconocer y unirse a la secuencia diana que puede estar en el extremo 5' del ADN, a una razón de un fragmento de ADN:una molécula bifuncional. El otro elemento funcional de este agente bifuncional es un agente de unión que puede reconocer y unirse a la etiqueta peptídica que puede estar codificada en el extremo 5' del fragmento de ADN. A modo de ejemplo no excluyente, el agente bifuncional puede estar compuesto por un fragmento Fab que reconoce la etiqueta de fluoresceína o biotina del ADN, y otro fragmento Fab que reconoce la etiqueta peptídica codificada en el ADN. Es evidente para los expertos en la técnica que este agente bifuncional puede ser elaborado mediante muchos métodos diferentes tales como entrecruzamiento químico de los dos elementos, o expresión de los dos elementos como una proteína de fusión, o como un anticuerpo bi-específico. Dichos métodos para crear un agente bifuncional se proporcionan a modo de ejemplo no excluyente.

El agente bifuncional se puede unir al constructo de ADN antes de la expresión del péptido codificado o se puede proporcionar durante la expresión.

La proteína de fusión se transcribe y se traduce después a partir del constructo de ADN a la vez que se une al agente bifuncional. La etiqueta peptídica se traduce primero, y puede ser unida por el segundo elemento del agente bifuncional, antes de la liberación del ARN mensajero o la ARN polimerasa del ADN. Esto crea un complejo de proteína funcional-ADN donde tanto el polipéptido expresado como el ADN que codifica ese péptido están conectados por medio del agente bifuncional. La molécula de la etiqueta peptídica es conectada por lo tanto indirectamente, pero específicamente, a la diana de ADN (etiqueta). Conectando la proteína al constructo de ADN de este modo, es posible escrutar en busca de una proteína que tenga propiedades concretas, como se describe más abajo, y después identificar el ADN codificante que está conectado a esa proteína. Utilizando un agente bifuncional en lugar de la unión covalente entre la proteína y el ADN, el constructo de ADN puede ser separado más fácilmente de la proteína sin el riesgo de dañar el ADN.

Los complejos de proteína-ADN pueden ser aislados después mediante la captura de una proteína diana. Los complejos de proteína no unida-ADN se pueden lavar, permitiendo el enriquecimiento en ADN que codifica péptidos o proteínas de interés, que pueden ser recuperados después mediante PCR, y enriquecidos adicionalmente realizando varios ciclos adicionales de expresión *in vitro* y captura de complejo de proteína-ADN utilizando los métodos descritos previamente.

Adicionalmente, en esta realización, el ADN se puede unir directamente, por ejemplo mediante unión covalente, a un agente bifuncional tal como un polímero. Semejante polímero puede contener más de un elemento de unión que podría reconocer la etiqueta peptídica, permitiendo la presentación multivalente de una molécula de la genoteca de expresión de péptidos en una unidad que contiene el ADN que codifica el péptido presentado. A modo de ejemplo, no de limitación, dichos polímeros pueden estar compuestos por polietileno así como otros compuestos poliméricos, capaces de ser fusionados a ADN. El constructo de ADN de la invención puede ser proporcionado unido a dicho agente bifuncional, o unido a una etiqueta de ADN como se ha descrito antes que es capaz de ser unida por semejante agente bifuncional.

En todas las realizaciones de la invención, los constructos de ADN incluyen un promotor apropiado y secuencias de traducción para la transcripción/traducción *in vitro*. Se puede utilizar cualquier promotor adecuado, tal como el promotor ara B, tac, o los promotores T7, T3 o SP6 entre otros. El promotor se coloca de manera que está conectado operablemente a la secuencias de ADN de la invención de manera que tales secuencias sean expresadas.

El ADN que codifica los péptidos miembros de la genoteca puede ser producido mediante cualquier método disponible. En particular, semejante ADN puede comprender ADN aislado de ADNc, obtenido mediante barajado de ADN, y ADN sintético.

El constructo de ADN también puede codificar conectores de aminoácidos en la proteína de fusión expresada. En particular, se puede incluir un conector de aminoácidos flexible para empalmar el péptido de unión a ADN/RepA al péptido miembro de la genoteca.

De acuerdo con la invención, con referencia a esta realización preferida, las genotecas de expresión de péptidos o proteínas, conectadas al ADN que las codifica, pueden ser generadas y los péptidos con la actividad deseada seleccionados por medio de las siguientes etapas:

Construcción de una genoteca de proteínas de fusión.

- 5 Se puede fusionar una genoteca de ADN de péptidos o proteínas a un ADN que codifica un péptido capaz de unirse a la secuencia diana de ADN, tal como un ADN de una proteína de unión a ADN que actúa en cis, por medio de una región de ADN que codifica un conector de aminoácidos flexible, bajo el control de un promotor apropiado y con un sitio de traducción, o de unión al ribosoma, codones de iniciación y terminación, de una manera adecuada para la expresión *in vitro* de los miembros de la genoteca de péptidos y proteínas de unión. En el ejemplo de la proteína repA, el ADN (los miembros de la genoteca de ADN (tales como el ADN) se fusionan al ADN de la proteína de unión al ADN de repA, o uno de sus fragmentos. Las secuencias cis y ori se pueden incluir en el constructo aguas abajo de los otros elementos. En el caso de una genoteca de ADN, dichos constructos se diseñan para que sean adecuados para la transcripción y la traducción *in vitro*.

Expresión y unión cis de proteínas de fusión de genotecas de ADN

- 15 Con el fin de permitir la actividad cis, se puede utilizar un entorno de transcripción/traducción bacteriano acoplado tal como el sistema del extracto S30 (Zubay, G. 1973. *Arm. Rev. Genet.* 7: 267). La expresión del péptido, tal como la proteína de fusión de péptido miembro de la genoteca de ADN-repA, en este entorno, dará como resultado la unión de la proteína de fusión al ADN que codifica esa proteína de fusión, siempre que ambas secuencias cis y ori estén presentes. Cuando las genotecas de proteínas de fusión de péptido-repA se expresan de esta manera, este procedimiento da como resultado la producción de genotecas de complejos de proteína-ADN donde la proteína anclada al ADN está codificada por aquel fragmento de ADN a partir del cual fue expresada, permitiendo de ese modo la posterior selección de ambos péptidos o proteínas de interés, y el ADN que codifica dichos péptidos. La complejidad de estas genotecas aumenta por la naturaleza *in vitro* del método, se pueden generar fácilmente genotecas de al menos 10^{10} - 10^{14} fragmentos de ADN, si no genotecas aún mayores.

Se pueden añadir compuestos que evitan la actividad nucleasa, o reducen las interacciones ADN-proteína o proteína-proteína no específicas durante esta reacción de transcripción/traducción y unión cis. Los ejemplos de los compuestos adecuados incluyen detergentes y agentes de bloqueo tales como albúmina de suero bovino (BSA).

- 30 *Selección del péptido de interés.*

- Se puede utilizar una genoteca de expresión de péptidos *in vitro* producida mediante un método de la presente invención para escrutar miembros concretos de la genoteca. Por ejemplo, la genoteca puede ser escrutada en busca de péptidos con una actividad concreta o una afinidad de unión concreta. Los complejos de proteína-ADN de interés pueden ser seleccionados de una genoteca, por ejemplo, mediante técnicas de enriquecimiento de la afinidad o la actividad. Esto se puede lograr por medio de un ligando específico para la proteína de interés, tal como un antígeno si la proteína de interés es un anticuerpo. El ligando puede ser presentado sobre una superficie sólida tal como la superficie de un pocillo de una placa de ELISA, o en solución, por ejemplo, con ligando biotinilado seguido de captura sobre una superficie recubierta con estreptavidina o cuentas magnéticas, después de haber incubado una genoteca de complejos de proteína-ADN con el ligando para permitir la interacción ligando-ligando. Después de la incubación en fase sólida o en solución, los complejos no unidos se eliminan lavando, y los complejos unidos se aíslan interrumpiendo las interacciones ligando-ligando mediante alteración del pH del pocillo, o mediante otros métodos conocidos por los expertos en la técnica tales como digestión con proteasas, o liberación del ADN directamente de los complejos mediante calentamiento o extracción con fenol cloroformo para desnaturalizar la unión repA-ADN ori. El ADN también puede ser liberado mediante uno de los métodos anteriores, directamente en tampón para PCR, y amplificado. Alternativamente, el ADN puede ser amplificado por PCR directamente, sin liberación de los complejos. Opcionalmente, el ADN no unido, por ejemplo por la proteína de unión repA, puede ser protegido de la degradación por proteínas de unión a ADN no específicas tales como histonas, a modo de ejemplo. Resultará evidente para un experto en la técnica que se podrían utilizar otras proteínas de unión a ADN no específicas para este propósito. Además, pueden estar presentes compuestos que evitan la actividad nucleasa, o reducen las interacciones ADN-proteína o proteína-proteína no específicas durante el procedimiento de selección. Los ejemplos de los compuestos adecuados incluyen detergentes, proteínas de bloqueo tales como las encontradas en la leche en polvo o la albúmina de suero bovino (BSA), heparina o ácido aurintricarboxílico.

- 55 La recuperación de complejos unidos, la re-amplificación del ADN unido, y la repetición del procedimiento de selección proporcionan un enriquecimiento de los clones que codifican las secuencias deseadas, que pueden ser aisladas para la secuenciación, la clonación adicional y/o la expresión. Por ejemplo, el ADN que codifica el péptido de interés se puede aislar y amplificar, por ejemplo, mediante PCR. En una realización, las rondas repetidas de selección y recuperación de ADN pueden ser facilitadas por el uso de anidación secuencial de cebadores de PCR. Los extremos del ADN resultan dañados generalmente después

de múltiples etapas de PCR. Para recuperar el ADN de tales moléculas dañadas se necesitaba que los cebadores fueran recodificados desde los extremos del constructo de ADN, acortando secuencialmente de ese modo el constructo con cada ronda de selección.

5 En un aspecto, el constructo de ADN y/o la proteína codificada pueden ser configurados para que incluyan una etiqueta. Semejante etiqueta del péptido o ADN, por ejemplo como se ha descrito antes, puede ser utilizada en la separación y aislamiento de un miembro de la genoteca de interés. Semejante etiqueta también puede ser utilizada para sujetar los miembros de la genoteca, por ejemplo, sobre un soporte sólido para su uso en los métodos de escrutinio descritos en la presente memoria.

10 Por lo tanto se puede observar que los métodos de escrutinio de la presente invención pueden incluir la etapa adicional de seleccionar y aislar el péptido miembro de la genoteca relevante, permitiendo que el péptido muestre las propiedades deseadas, y asimismo el ADN que codifica ese péptido, que se va a identificar y purificar.

15 Por lo tanto la invención abarca péptidos y ADN que han sido identificados mediante el método de la invención. Estos péptidos y ADN pueden ser aislados y/o purificados. Los péptidos o ADN aislados mediante el método de la invención pueden ser modificados, por ejemplo mediante delección, adición o sustitución de aminoácidos o nucleótidos. Los péptidos o ADN modificados adecuados pueden mostrar una identidad de secuencia de aminoácidos o nucleótidos de al menos 50%, al menos 75%, al menos 90%, al menos 95% o más con el péptido o ADN aislado mediante el método de la invención. Los péptidos identificados mediante el método de la invención pueden ser modificados con fines de liberación y/o estabilidad. Por ejemplo, tales péptidos pueden ser pegilados (anclados a polietilenglicol) para prolongar la vida media en suero o para evitar el ataque por proteasas. Los péptidos identificados mediante el método de la invención pueden ser modificados en otros sistemas de presentación tales como presentación en fagos o sintetizando y escrutando variantes peptídicas. Una colección de tales secuencias modificadas puede formar una nueva genoteca que se puede incorporar a constructos de la invención y adicionalmente escrutarse para encontrar, por ejemplo, una secuencia variante que muestra una unión mejorada a un ligando concreto. De este modo en una realización, una genoteca de péptidos para su uso en los métodos de la invención puede ser una genoteca de péptidos relacionados estructuralmente.

25 Alternativamente, se puede utilizar una genoteca de secuencias peptídicas esencialmente al azar. Numerosos tipos de genotecas de péptidos fusionados a la proteína de unión a ADN que actúa en cis pueden ser escrutados en esta realización incluyendo:

(i) Secuencias de péptidos al azar codificadas por ADN sintético de longitud variable.

(ii) Anticuerpos o fragmentos de anticuerpos, por ejemplo fragmentos de anticuerpo Fv de cadena sencilla. Estos consisten en dominios de la región variable de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo unidos por un péptido conector flexible para crear una molécula de unión al antígeno de cadena sencilla.

35 (iii) Fragmentos de ADNc al azar de proteínas de origen natural aisladas de una población de células que contienen una actividad de interés.

(iv) Secuencias de péptidos al azar insertadas en, o que sustituyen una región de una proteína conocida, donde la secuencia de la proteína conocida actúa como armazón, que constriñe la secuencia de péptidos al azar. Se han descrito muchos de tales armazones, se ha utilizado a modo de ejemplo, sin exclusión, CTLA-4 (documento WO 00/60070), como armazón para genotecas de péptidos.

40 En otra realización la invención tiene que ver con métodos para el escrutinio de una genoteca de ADN cuyos miembros requieren más de una cadena para la actividad, como requieren, por ejemplo, los fragmentos Fab de anticuerpo para la unión a un ligando. En esta realización, el ADN del anticuerpo de la cadena pesada o ligera se une a una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio de unión a ADN, por ejemplo, de repA. Típicamente las secuencias de la genoteca de ADN de anticuerpos desconocidos para los genes de la cadena pesada (VH y CH1) o ligera (VL y CL) son insertadas en la región 5' del ADN de repA, detrás de un promotor apropiado y de las secuencias de traducción. De este modo, repA fusionado a una proteína codificada por un miembro de la genoteca de ADN es producido unido al ADN que codifica esa proteína. La segunda cadena conocida, que codifica la proteína de cadena ligera o pesada, es expresada por separado:

50 (a) a partir del mismo fragmento de ADN que contiene la genoteca de la proteína de fusión de repA y el primer polipéptido, o

(b) a partir de un fragmento de ADN separado presente en la reacción de transcripción/traducción *in vitro*.

55 La cadena conocida se asocia con la genoteca de proteínas de fusión desconocidas que están fusionadas a la proteína repA y de ese modo unidas al ADN para la cadena desconocida. La genoteca Fab funcional se puede seleccionar después por medio de un ligando específico para el anticuerpo.

- El ADN identificado mediante un método de escrutinio de la invención, p. ej. el ADN que codifica el péptido miembro de la genoteca seleccionada, puede ser clonado en un vector. En una realización, el ADN identificado mediante un método de la invención está conectado operablemente a una secuencia de control que es capaz de proporcionar la expresión de la secuencia codificante por la célula anfitriona, esto es, el vector es un vector de expresión. El término "conectada operablemente" hace referencia a una yuxtaposición en la que los componentes descritos están en una relación que les permite funcionar de la manera pretendida. Una secuencia reguladora, tal como un promotor, "conectada operablemente" a una secuencia codificante se sitúa de tal manera que la expresión de la secuencia codificante se logra en condiciones compatibles con la secuencia reguladora.
- Tales vectores de expresión se construyen rutinariamente en la técnica de la biología molecular y pueden implicar, por ejemplo, el uso de ADN plasmídico e iniciadores, promotores, intensificadores apropiados y otros elementos, tales como por ejemplo señales de poliadenilación que pueden ser necesarias, y que están situadas en la orientación correcta, con el fin de permitir la expresión de la proteína. Otros vectores adecuados serían evidentes para los expertos en la técnica. A modo de ejemplo adicional en este aspecto, los autores de la invención hacen referencia a Sambrook et al. 1989.
- Los vectores pueden ser por ejemplo, vectores plasmídicos, virales o de fagos con un origen de replicación, opcionalmente un promotor para la expresión de dicho ADN y opcionalmente un regulador del promotor. Los vectores pueden contener uno o más genes marcadores seleccionables, por ejemplo un gen de resistencia a ampicilina en el caso de un plásmido bacteriano o un gen de resistencia para vector fúngico. Los vectores pueden ser utilizados *in vitro*, por ejemplo para la producción de ADN o ARN o utilizarlos para la producción de ADN o ARN o utilizarlos para transfectar o transformar una célula anfitriona, por ejemplo, una célula anfitriona de mamífero. Los vectores también pueden ser adaptados para ser utilizados *in vivo*, por ejemplo en un método de terapia génica.
- Los promotores y otras señales de regulación de la expresión pueden ser seleccionados para que sean compatibles con la célula anfitriona para la cual se diseña la expresión. Por ejemplo, los promotores de levadura incluyen los promotores GAL4 y ADH de *S. cerevisiae*, y el promotor *nmt1* y *adh* de *S. pombe*. Los promotores de mamífero incluyen el promotor de metalotioneína que puede ser inducido en respuesta a metales pesados tales como cadmio. También se pueden utilizar promotores virales tales como el promotor del antígeno T grande de SV40 o promotores de adenovirus. Todos estos promotores son fácilmente asequibles en la técnica.
- Se pueden utilizar promotores de mamífero tales como los promotores de p-actina. Son especialmente preferidos los promotores específicos de tejidos. También se pueden utilizar promotores virales, por ejemplo la larga repetición terminal del virus de la leucemia murina de Moloney (MMLV LTR), el promotor LTR del virus del Sarcoma de rous (RSV), el promotor de SV40, el promotor IE de citomegalovirus humano (CMV), adenovirus, promotores de HSV (tales como los promotores IE de HSV), o promotores de HPV, concretamente la región reguladora aguas arriba (URR) de HPV. Los promotores virales son fácilmente asequibles en la técnica.
- El vector puede incluir adicionalmente secuencias que flanquean el polinucleótido de interés dando lugar a polinucleótidos que comprenden secuencias homólogas a secuencias genómicas eucarióticas, preferiblemente secuencias genómicas de mamífero, o secuencias genómicas virales. Esto permitirá la introducción de polinucleótidos de la invención en el genoma de células eucarióticas o virus mediante recombinación homóloga. En particular, se puede utilizar un vector plasmídico que comprende la casete de expresión flanqueada por secuencias virales para preparar un vector viral adecuado para liberar los polinucleótidos de la invención en una célula de mamífero. Otros ejemplos de vectores virales incluyen vectores virales de herpes simplex y retrovirus, incluyendo lentivirus, adenovirus, virus adeno-asociados y virus HPV. Las técnicas de transferencia de genes que utilizan estos virus son conocidas por los expertos en la técnica. Se pueden utilizar, por ejemplo, vectores de retrovirus para integrar establemente el polinucleótido dando lugar al polinucleótido en el genoma del anfitrión. Los vectores de adenovirus de replicación defectuosa, por el contrario, permanecen como episomas y por lo tanto permiten la expresión transitoria.
- Tales vectores de expresión se pueden utilizar para identificar ligandos de interés, esto es, moléculas que se unen al miembro de la genoteca peptídica por medio de análisis de unión convencionales tales como ELISA, o análisis enzimáticos donde los sustratos apropiados proporcionan, por ejemplo, un cambio de color, emisión de luz o fluorescencia. Se podrían utilizar otros análisis funcionales, cuando estuvieran disponibles.
- En una realización alternativa, un ADN identificado mediante un método de la invención puede ser clonado en un vector no de expresión. Tal vector puede ser utilizado para caracterizar adicionalmente el ADN, por ejemplo, mediante secuenciación.
- Alternativamente, se pueden identificar ligandos de interés sin clonación. Los ejemplos de los métodos adecuados incluyen la expresión *in vitro* de secuencias de ADN individuales recuperadas de un método de escrutinio de la invención, y la secuenciación de los ADN individuales recuperados de semejante método de escrutinio. Tales secuencias de ADN individuales pueden ser amplificadas opcionalmente.

La invención también incluye células que han sido modificadas para expresar un péptido identificado mediante un método de la invención, por ejemplo introduciendo un vector de expresión como se ha descrito antes en la célula. Tales células incluyen líneas de células eucarióticas superiores transitorias, o preferiblemente estable, tales como células de mamífero o células de insecto, utilizando por ejemplo un sistema de expresión de baculovirus, células eucarióticas inferiores, tales como células de levadura o procarióticas como células bacterianas. Los ejemplos concretos de células que pueden ser modificadas por inserción de vectores que codifican un péptido identificado mediante un método de la invención incluyen células HEK293T, CHO, HeLa y COS de mamífero. Preferiblemente la línea celular seleccionada será una que no solamente sea estable, si no que también permita la glicosilación madura y la expresión del péptido en la superficie celular. La expresión se puede lograr en oocitos transformados. Un péptido identificado mediante un método de la invención puede ser expresado en células de animales no humanos transgénicos, preferiblemente un ratón. Un péptido identificado mediante un método de la invención también puede ser expresado en oocitos o melanóforos de *Xenopus laevis*.

Con el fin de comprender más completamente la invención, se describirán ahora realizaciones con mayor detalle a modo de ejemplos y no a modo de limitaciones con referencia a las siguientes figuras.

Los ejemplos de algunas realizaciones de la invención se dan más abajo:

Materiales y Métodos.

Los siguientes procedimientos utilizados por el autor de la presente solicitud son descritos por Sambrook, J., et al., 1989 cita anterior: analysis of restriction enzyme digestion products on agarose gels, DNA purification using phenol/chloroform stock solutions, preparation of phosphate buffered saline.

Los reactivos con fines generales se adquirieron de SIGMA-Aldrich Ltd (Poole, Dorset, U.K.). Se obtuvieron oligonucleótidos de SIGMA-Genosys Ltd (Cambridgeshire, Reino Unido). Los aminoácidos, los extractos S30 se obtuvieron de Promega Ltd (Southampton, Hampshire, U. K.). Las ADN polimerasasa Deep Vent y Taq se obtuvieron de New England Biolabs (Cambridgeshire, U.K.). La ADN polimerasa Taqplus se obtuvo de Stratagene Inc. (Amsterdam, Países Bajos). Los kits de purificación en gel de ADN GeneClean se obtuvieron de BIO 101 (La Jolla, California, U.S.A.), los anticuerpos anti-IgKhumana de Immunologicals Direct Ltd (Oxfordshire, U.K.), el policlonal anti-c-myc de Vector Labs Inc (Cambridgeshire U.K.), y el anticuerpo anti-V5 de Abcam Ltd (Cambridgeshire U. K.). El agente bloqueante Superblock se obtuvo de Perbio Science (Cheshire, U. K.).

Ejemplo 1. Aislamiento de complejos de proteína-ADN que actúan en cis específicos

Se prepararon constructos de expresión in vitro añadiendo sucesivamente el promotor TAC, el epítipo c-myc, la región constante kappa humana o el epítipo V5 a la región RepA-CIS-ORI, mediante amplificación por PCR. Tales constructos pueden ser preparados mediante muchos métodos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, amplificando diferentes fragmentos de ADN seguido de PCR de ensamblaje. En este ejemplo, el molde de amplificación inicial fue el plásmido R1 que contiene la región RepA-CIS-ORI (Masai, H. y Arai, K. (1988). DNAs Res. 16, 6493-6514).

(a) Amplificación primaria. La región RepA-CIS-ORI fue amplificada mediante PCR a partir de una única colonia de la cepa ECO K12 que albergaba el plásmido R1 utilizando 12,5 pmoles de cada uno de los cebadores REPAFOR (SEQ ID 01) y ORIREV (SEQ ID 02) en 50 μ l de reacción que contenían dNTP 0,25 mM, 2,5 unidades de ADN polimerasa Taqplus Precision, 1x tampón de reacción para PCR (Stratagene Inc., Amsterdam, Países bajos). El cebador REPAFOR se hibrida al extremo 5' de la región codificante de RepA. El cebador ORIREV hibrida con el extremo 3' de la región ORI no codificante.

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un Eppendorf Master Cycler durante 1 ciclo de 4 minutos y 15 segundos a 94°C seguido de 30 ciclos de 94°C, 45 segundos; 60°C, 45 segundos; 72°C, 45 segundos, seguido de un único ciclo de 10 minutos a 72°C. Los productos de reacción se sometieron a electroforesis sobre un gel de agarosa, se escindieron y los productos se purificaron a partir del gel en 40 μ l de agua estéril utilizando un kit GeneClean II de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes (Bio101, La Jolla, California, U.S.A.).

(b) Amplificación secundaria. Se volvió a amplificar un μ l (500 pg) de producto de reacción primario purificado en gel diluido 100 veces utilizando 12,5 pmoles de cada uno de los cebadores CKREPFOR (SEQ ID 03) y ORIREV (SEQ ID 02) en un 50 μ l de reacción que contenían dNTP 0, 25mM, 2,5 unidades de ADN polimerasa Taqplus Precision, y 1x tampón de reacción de PCR (Stratagene Inc, Amsterdam, Países Bajos). El cebador CKREPFOR hibrida con el extremo 5' del producto de reacción primario y se añade a la porción 3' del ADN de la región constante kappa. El cebador ORIREV hibrida con el extremo 3' del producto de reacción secundario.

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un Eppendorf Master Cycler durante 1 ciclo de 2 minutos y 15 segundos a 94°C seguido de 30 ciclos de 94°C, 45 segundos; 60°C, 45 segundos; 72°C, 2 minutos, seguido de un único ciclo de 10 minutos a 72°C. Los productos de reacción se sometieron a

electroforesis sobre un gel de agarosa, se escindieron y los productos se purificaron a partir del gel en 40 µl de agua estéril utilizando un kit GeneClean II de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes (Bio101, La Jolla, California, U.S.A.).

5 (c) Tercera amplificación. Se volvió a amplificar 1 µl (500 pg) de producto de reacción primario purificado en gel diluido 100 veces utilizando 12,5 pmoles de cada uno de los cebadores V5REPFOR (SEQ ID 04) y ORIREV (SEQ ID 02) en 50 µl de reacción que contenían dNTP 0,25mM, 2,5 unidades de ADN polimerasa Taqplus Precision, y 1x tampón de reacción de PCR (Stratagene Inc, Amsterdam, Países bajos). El cebador V5REPFOR hibrida con el extremo 5' del producto de reacción primario y se añade a la porción 3' del ADN del epítipo V5. El cebador ORIREV hibrida con el extremo 3' del producto de reacción primario.

10 Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un Eppendorf Master Cycler durante 1 ciclo de 2 minutos y 15 segundos a 94°C seguido de 30 ciclos de 94°C, 45 segundos; 60°C, 45 segundos; 72°C, 2 minutos, seguido de un único ciclo de 10 minutos a 72°C. Los productos de reacción se sometieron a electroforesis sobre un gel de agarosa, se escindieron y los productos se purificaron a partir del gel en 40 µl de agua estéril utilizando un kit GeneClean II de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes (Bio101, La Jolla, California, U.S.A.).

15 (d) Cuarta amplificación. Se volvió a amplificar 1 µl (500 pg) de plásmido pCKV5 diluido 100 veces utilizando 12,5 pmoles de cada uno de los cebadores MYCCKFOR (SEQ ID 05) y CKREV (SEQ ID 06) en 50 µl de reacción que contenía dNTP 0,25 mM, 2,5 unidades de ADN polimerasa Taqplus Precision, y 1x tampón de reacción de PCR (Stratagene Inc, Amsterdam, Países bajos). El plásmido pCKV5 contiene el ADNc de la región constante kappa humana (McGregor DP, Molloy PE, Cunningham C, y Harris WJ. 1994 Mol. Immunol. 31: 219-26) y el ADN del epítipo V5 (Southern JA, Young DF, Heaney F, Baumgartner WK, Randall RE. 1991 J. Gen. Virol. 72 :1551-7). El cebador MYCCKsFOR hibrida con el extremo 5' del ADN de la región constante kappa humana y se añade a la porción 3' del ADN del epítipo MYC. El cebador CKREV hibrida con el extremo 3' del ADN de la región constante kappa.

25 Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un Eppendorf Master Cycler durante 1 ciclo de 2 minutos y 15 segundos a 94°C seguido de 30 ciclos de 94°C, 45 segundos; 60°C, 45 segundos; 72°C, 2 minutos, seguido de un único ciclo de 10 minutos a 72°C. Los productos de reacción se sometieron a electroforesis sobre un gel de agarosa, se escindieron y los productos se purificaron a partir del gel en 40 µl de agua estéril utilizando un kit GeneClean II de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes (Bio 101, La Jolla, California, U.S.A.).

30 (e) Quinta amplificación. Se reamplificó 1 µl (500 pg) de plásmido pCKV5 diluido 100 veces utilizando 12,5 pmoles de cada uno de los cebadores MYCV5FOR (SEQ ID 07) y V5REV (SEQ ID 08) en 50 µl de reacción que contenía dNTP 0,25 mM, 2,5 unidades de ADN polimerasa Taqplus Precision, y 1 x tampón de reacción de PCR (Stratagene Inc, Amsterdam, Países bajos). El cebador MYCV5FOR hibrida con el extremo 5' del ADN del epítipo V5 y se añade a la porción 3' del ADN del epítipo MYC. El cebador V5REV hibrida con el extremo 3' del ADN del epítipo V5.

35 Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un Eppendorf Master Cycler durante 1 ciclo de 2 minutos y 15 segundos a 94°C seguido de 30 ciclos de 94°C, 45 segundos; 60°C, 45 segundos; 72°C, 30 segundos, seguido de un único ciclo de 10 minutos a 72°C. Los productos de reacción se sometieron a electroforesis sobre un gel de agarosa, se escindieron y los productos se purificaron a partir del gel en 40 µl de agua estéril utilizando un kit GeneClean II de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes (Bio101, La Jolla, California, U.S.A.).

40 (f) Sexta amplificación. Se reamplificó 1 µl (500 pg) de plásmido pTACP2A diluido 100 veces (ref) utilizando 12,5 pmoles de cada uno de los cebadores TAC3 (SEQ ID 09) y MYCTACREV (SEQ ID 10) en 50 µl de reacción que contenía dNTP 0,25 mM, 2,5 unidades de ADN polimerasa Taqplus Precision, y 1x tampón de reacción de PCR (Stratagene Inc, Amsterdam, Países bajos). El cebador TAC3 hibrida con el extremo 5' del ADN del promotor TAC. El cebador MYCTACREV hibrida con el extremo 3' del ADN del promotor TAC y se añade a la porción 5' del ADN del epítipo MYC.

45 Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un Eppendorf Master Cycler durante 1 ciclo de 2 minutos y 15 segundos a 94°C seguido de 30 ciclos de 94°C, 45 segundos; 60°C, 45 segundos; 72°C, 30 segundos, seguido de un único ciclo de 10 minutos a 72°C. Los productos de reacción se sometieron a electroforesis sobre un gel de agarosa, se escindieron y los productos se purificaron a partir del gel en 40 µl de agua estéril utilizando un kit GeneClean II de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes (Bio101, La Jolla, California, U.S.A.).

50 (g) Primera PCR de ensamblaje. Se amplificó 1 µl (50 ng) de cada uno de los productos de reacción de (f) y (d) utilizando 50 pmoles de cada uno de los cebadores TAC5 (SEQ ID 11) y CKREV (SEQ ID 06) en 50 µl de reacción que contenían dNTP 0,25 mM, 2,5 unidades de mezcla de ADN polimerasa TaqDeepVent (20: 1), y 1x tampón de reacción de PCR (New England Biolabs, Beverly, MA, U.S.A.). El cebador TAC5 hibrida

con el extremo 5' del producto de reacción (f) y añade 20 nucleótidos. El cebador CKREV hibrida con el extremo 3' del producto de reacción (d).

5 Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un Eppendorf Master Cycler durante 1 ciclo de 2 minutos y 15 segundos a 94°C seguido de 30 ciclos de 94°C, 45 segundos; 60°C, 45 segundos; 72°C, 45 segundos, seguido de un único ciclo de 10 minutos a 72°C. Los productos de reacción se sometieron a electroforesis sobre un gel de agarosa, se escindieron y los productos se purificaron a partir del gel en 40 µl de agua estéril utilizando un kit GeneClean II de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes (Bio101, La Jolla, California, U.S.A.).

10 (h) Segunda PCR de ensamblaje. Se amplificó 1 µl (50 ng) de cada uno de los productos de reacción de (f) y (e) utilizando 50 pmoles de cada uno de los cebadores TAC5 (SEQ ID 11) y V5REV (SEQ ID 08) en 50 µl de reacción que contenían dNTP 0,25 mM, 2,5 unidades de mezcla de ADN polimerasa TaqDeepVent (20:1), 1x tampón de reacción de PCR (New England Biolabs, Beverly, MA, U.S.A.). El cebador TAC5 hibrida con el extremo 5' del producto de reacción (f) y añade 20 nucleótidos. El cebador V5REV hibrida con el extremo 3' del producto de reacción (e).

15 Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un Eppendorf Master Cycler durante 1 ciclo de 2 minutos y 15 segundos a 94°C seguido de 30 ciclos de 94°C, 45 segundos; 60°C, 45 segundos; 72°C, 45 segundos, seguido de un único ciclo de 10 minutos a 72°C. Los productos de reacción se sometieron a electroforesis sobre un gel de agarosa, se escindieron y los productos se purificaron a partir del gel en 40 µl de agua estéril utilizando un kit GeneClean II de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes (Bio101, La Jolla, California, U.S.A.).

20 (i) Tercera PCR de ensamblaje. Se amplificó 1 µl (50 ng) de cada uno de los productos de reacción de (b) y (g) o utilizando 50 pmoles de cada uno de los cebadores TAC3 (SEQ ID 09) y ORIREV (SEQ ID 02) en 50 µl de reacción que contenía dNTP 0,25 mM, 2,5 unidades de mezcla de ADN polimerasa TaqDeepVent (20:1), y 1x tampón de reacción de PCR (New England Biolabs, Beverly, MA, U.S.A.). El cebador TAC3 hibrida 20 nucleótidos aguas abajo con respecto al extremo 5' del producto de reacción (g). El cebador ORIREV hibrida con el extremo 3' del producto de reacción (b). El producto de reacción de (i) se denomina TAC-MYC-CK-REPA-CIS-ORI (SEQ ID 12).

25 Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un Eppendorf Master Cycler durante 1 ciclo de 2 minutos y 15 segundos a 94°C seguido de 30 ciclos de 94°C, 45 segundos; 60°C, 45 segundos; 72°C, 1 minuto, seguido de un único ciclo de 10 minutos a 72°C. Los productos de reacción se sometieron a electroforesis sobre un gel de agarosa, se escindieron y los productos se purificaron a partir del gel en 40 µl de agua estéril utilizando un kit GeneClean II de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes (Bio101, La Jolla, California, U.S.A.).

30 (j) Cuarta PCR de ensamblaje. Se amplificó 1 µl (50 ng) de cada uno de los productos de reacción de (b) y (h) utilizando 50 pmoles de cada uno de los cebadores TAC3 (SEQ ID 09) y ORIREV (SEQ ID 02) en 50 µl de reacción que contenían dNTP 0,25 mM, 2,5 unidades de mezcla de ADN polimerasa TaqDeepVent (20:1), y 1x tampón de reacción de PCR (New England Biolabs, Beverly, MA, U.S.A.). El cebador TAC3 hibrida 20 nucleótidos aguas abajo con respecto al extremo 5' del producto de reacción (g). El cebador ORIREV hibrida con el extremo 3' del producto de reacción (b). El producto de reacción de (i) se denomina TAC-MYC-V5-REPA-CIS-ORI (SEQ ID 13).

35 Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un Eppendorf Master Cycler durante 1 ciclo de 2 minutos y 15 segundos a 94°C seguido de 30 ciclos de 94°C, 45 segundos; 60°C, 45 segundos; 72°C, 1 minuto, seguido de un único ciclo de 10 minutos a 72°C. Los productos de reacción se sometieron a electroforesis sobre un gel de agarosa, se escindieron y los productos se purificaron a partir del gel en 40 µl de agua estéril utilizando un kit GeneClean II de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes (Bio101, La Jolla, California, U.S.A.).

40 Preparación de la reacción de transcripción/traducción *in vitro*. La reacción se colocó sobre hielo, utilizando un molde lineal bacteriano Promega S30 acoplado al kit de reacción de transcripción/traducción *in vitro* como sigue:

45 20 µl de molde TAC-MYC-CK-REPA-CIS-ORI (0,5 µg de ADN de constructo final SEQ ID 012 más arriba); 20 µl de molde TAC-MYC-V5-REPA-CIS-ORI (0,5 µg de ADN de constructo final SEQ ID 013 más arriba); 20 µl de mezcla de aminoácidos completa (Promega); 80 µl de Premezcla S30; 60 µl de mezcla S30;

50 y se dejó que la reacción continuara a 25°C durante 30 minutos y se colocó sobre hielo, después se diluyó 10 veces con tampón de bloqueo (Superblock (Perbio Ltd), Tween 20 al 0,1 %, 200 µg/ml de ADN de esperma de arenque).

55 Captura del complejo de ADN-proteína. Se cubrieron inmunotubos NUNC star con 10 µg/ml de anticuerpo anti-c, anticuerpo anti-V5, o anticuerpo anti-cadena kappa humana, en 500 µl de PBS por tubo durante la noche a 4°C. Un tubo adicional se dejó como blanco como control negativo. Los tubos se lavaron 2x

PBS y se bloquearon durante 1 hora a la temperatura ambiente con Superblock/PBS/0,1 mg/ml de ADN de esperma de arenque/Tween 20 al 0,1% y después se lavaron con 2x PBS. Se añadieron 500 µl de reacción de transcripción/traducción diluida a cada tubo y se incubaron a la temperatura ambiente durante 1 hora. Los tubos se lavaron 5x PBS/Tween 20 al 0,1%, después 1x 30 minutos con 2 ml de Superblock/PBS/0,1 mg/ml de ADN de esperma de arenque/Tween 20 al 0,1%, después con 5x PBS. El ADN se recuperó con 300 µl de tampón T.E. más 300 µl de fenol/cloroformo durante 5 minutos con movimiento oscilatorio. Esto se centrifugó a 13.200 g durante 5 minutos y el ADN se precipitó con 0,5 volúmenes de acetato de amonio 7,5 M, 20 µg de glicógeno y tres volúmenes de etanol absoluto. Después de la centrifugación, los sedimentos se lavaron con etanol del 70%, se secaron a vacío y se resuspendieron en 20 µl de agua. Se re-amplificaron 10 µl del ADN recuperado con reacciones de 50 µl con cebadores TAC3 (SEQ ID 09) y ORIREV (SEQ ID 02). Los productos de reacción se sometieron a electroforesis sobre un gel de agarosa/TAE al 1% (Figura 5).

Ejemplo 2. Separación del complejo RepA-ADN

Se utilizaron los dos constructos de expresión *in vitro* (SEQ ID 12 y SEQ ID 13) ya descritos en el ejemplo 1 en un experimento de selección frente a anticuerpo anti-kappa C humana como se describe en el Ejemplo 1, excepto que el ADN fue recuperado y liberado de RepA utilizando cualquiera de los siguientes métodos; Glicina, Trietilamina, Fenol/Cloroformo, Proteinasa K, y EDTA. Estos métodos se describen más abajo.

Glicina: se incubó el tubo con 500 µl de Glicina 200 mM, NaCl 150 mM (pH 2,0) durante 10 minutos. El producto eluido de glicina se transfirió después a un tubo eppendorf nuevo y se añadieron 50 µl de Tris 2M (pH 8,5).

Trietilamina: el tubo se incubó con 500 µl de Trietilamina 0,1 M durante 10 minutos y el producto eluido de trietilamina se transfirió después a un tubo eppendorf nuevo y se añadieron 250 µl de Tris 1M (pH 7,4).

Fenol/Cloroformo: como en el ejemplo 1 anterior.

Proteinasa K: el tubo se incubó con 500 µl de Tris 100 mM (pH 8,0), EDTA 10 mM (pH 8,0), SDS al 0,5% durante 30 minutos a 37°C. El producto eluido de proteinasa K se transfirió después a un tubo eppendorf nuevo.

EDTA: el tubo se incubó con 250 µl de Tris 10 mM (pH 8,0), EDTA 1 mM, NaCl 500 mM y 250 µl de Fenol/Cloroformo durante 5 minutos. El producto eluido con EDTA se transfirió a un tubo eppendorf nuevo.

Tras la recuperación del ADN el ADN se extrajo con Fenol/Cloroformo, cuando fue apropiado, seguido de precipitación con etanol como se describe en el Ejemplo 1. Se volvieron a amplificar 10 µl del ADN resuspendido en reacciones de 50 µl con cebadores TAC3 (SEQ ID 09) y CISREV (SEQ ID 019). El cebador CISREV hibrida 196 bases aguas arriba del sitio de unión de ORIREV (SEQ ID 02). Los productos de reacción se sometieron a electroforesis sobre un gel de agarosa/TAE al 1% (datos no mostrados). Solamente se amplificó el constructo que contenía CK-ADN (SEQ ID 12), en cantidades aproximadamente equivalentes.

Esto no solamente nos dice que se puede utilizar cualquiera de los métodos descritos más arriba para recuperar y liberar el ADN de RepA, si no que este resultado también sugiere que RepA interacciona de una manera no covalente con su ADN cognado.

Ejemplo 3. Detección de aglutinantes anti-V5 específicos en un experimento de adición de V5 utilizando la tecnología de presentación CIS.

Se prepararon constructos de expresión *in vitro* añadiendo el promotor TAC y el epítipo V5 o una genoteca NNB de 12 unidades a la región RepA-CIS-ORI, mediante amplificación por PCR. Tales constructos se pueden preparar mediante muchos métodos conocidos por el experto en la técnica, por ejemplo, amplificando diferentes fragmentos de ADN seguido de PCR de ensamblaje. En este ejemplo, el molde de amplificación inicial fue el plásmido R1 que contiene la región RepA-CIS-ORI (Masai, H. y Arai, K. (1988). Nucleic Acids Res. 16, 6493-6514).

(a). Amplificación primaria. La región RepA-CIS-ORI fue amplificada por PCR a partir de una única colonia de la cepa ECO K12 que albergaba el plásmido R1 utilizando 12,5 pmoles de cada uno de los cebadores REPAFOR (SEQ ID 01) y ORIREV408 (SEQ ID 20) en una reacción de 50 µl que contenía dNTP 0,25 mM, 2,5 unidades de mezcla de ADN polimerasa TaqDeepVent (20:1), y 1x tampón de reacción de PCR (New England Biolabs, Beverly, MA, U.S.A.). El cebador REPAFOR hibrida el extremo 5' de la región codificante RepA. El cebador ORIREV408 hibrida aguas abajo del extremo 3' de la región ORI no codificante.

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un Eppendorf Master Cycler durante 1 ciclo de 4 minutos y 30 segundos de 94°C seguido de 25 ciclos 94°C, 30 segundos; 60°C, 45 segundos; 72°C, 1 minuto, seguido de un único ciclo de 10 minutos a 72°C. Los productos de reacción se sometieron a electroforesis sobre un gel de agarosa, se escindieron se escindieron y los productos se purificaron a partir del gel en 40 µl

de agua estéril utilizando un kit GeneClean II de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes (Bio101, La Jolla, California, U.S.A.).

5 (b). Amplificación secundaria. Se volvió a amplificar 1 µl (500 pg) de producto de reacción primario purificado en gel diluido 100 veces utilizando 12,5 pmoles de cada uno de los cebadores V5 (NNB) REPFOR (SEQ ID 21) y ORIREV408 (SEQ ID 20) en una reacción de 50 µl que contenía dNTP 0,25 mM, 2,5 unidades de mezcla de ADN polimerasa TaqDeepVent (20:1), y 1x tampón de reacción de PCR (New England Biolabs, Beverly, MA, U.S.A.). El cebador V5 (NNB) REPFOR hibrida con el extremo 5' del producto de reacción primario y se añade al ADN del epítipo V5. El cebador ORIREV408 hibrida con el extremo 3' del producto de reacción primario.

10 Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un Eppendorf Master Cycler durante 1 ciclo de 4 minutos y 30 segundos de 94°C seguido de 25 ciclos de 94°C, 30 segundos; 60°C, 45 segundos; 72°C, 1 minuto, seguido de un único ciclo de 10 minutos a 72°C. Los productos de reacción se sometieron a electroforesis sobre un gel de agarosa, se escindieron y los productos se purificaron a partir del gel en 40 µl de agua estéril utilizando un kit GeneClean II de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes (Bio101, La Jolla, California, U.S.A.).

15 (c). Tercera amplificación. Se volvió a amplificar 1 µl (500 pg) de producto de reacción primario purificado en gel diluido 100 veces utilizando 12,5 pmoles de cada uno de los cebadores NNBREPFOR (SEQ ID 22) y ORIREV408 (SEQ ID 20) en una reacción de 50 µl que contenía dNTP 0,25 mM, 2,5 unidades de mezcla de ADN polimerasa TaqDeepVent (20:1), y 1x tampón de reacción de PCR (New England Biolabs, Beverly, MA, U.S.A.). El cebador NNBREPFOR hibrida con el extremo 5' del producto de reacción primario y se añade a un ADN de la genoteca NNB de 12 unidades de aminoácidos al azar. El cebador ORIREV408 hibrida con el extremo 3' del producto de reacción primario.

20 Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un Eppendorf Master Cycler durante 1 ciclo de 4 minutos y 30 segundos de 94°C seguido de 25 ciclos de 94°C, 30 segundos; 60°C, 45 segundos; 72°C, 1 minuto, seguido de un único ciclo de 10 minutos a 72°C. Los productos de reacción se sometieron a electroforesis sobre un gel de agarosa, se escindieron y los productos se purificaron a partir del gel en 40 µl de agua estéril utilizando un kit GeneClean II de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes (Bio101, La Jolla, California, U.S.A.).

30 (d). Cuarta amplificación. Se volvió a amplificar 1 µl (500 pg) de plásmido pTACP2A (ref) diluido 100 veces utilizando 12,5 pmoles de cada uno de los cebadores TACFARUP (SEQ ID 23) y TACREV (SEQ ID 27) en una reacción de 50 µl que contenía dNTP 0,25 mM, 2,5 unidades de mezcla de ADN polimerasa TaqDeepVent (20:1), y 1x tampón de reacción de PCR (New England Biolabs, Beverly, MA, U.S.A.). El cebador TACFARUP hibrida con el extremo 5' del ADN del promotor TAC. El cebador TACREV hibrida con el extremo 3' del ADN del promotor TAC.

35 Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un Eppendorf Master Cycler durante 1 ciclo de 1 minuto y 45 segundos de 94°C seguido de 25 ciclos de 94°C, 15 segundos; 60°C, 30 segundos; 72°C, 30 segundos, seguido de un único ciclo de 10 minutos a 72°C. Los productos de reacción se sometieron a electroforesis sobre un gel de agarosa, se escindieron y los productos se purificaron a partir del gel en agua completamente estéril utilizando un kit GeneClean II de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes (Bio101, La Jolla, California, U.S.A.).

40 (e). Primera PCR de ensamblaje. Se amplificó 1 µl (50 ng) de cada uno de los productos de reacción de (b) y (d) utilizando 50 pmoles de cada uno de los cebadores TACFARUP (SEQ ID 23) y ORIREV408 (SEQ ID 20) en una reacción de 50 µl que contenía dNTP 0,25 mM, 2,5 unidades de mezcla de ADN polimerasa TaqDeepVent (20:1), y 1x tampón de reacción de PCR (New England Biolabs, Beverly, MA, U.S.A.). El cebador TACFARUP hibrida con el extremo 5' del producto de reacción (d). El cebador ORIREV408 hibrida con el extremo 3' del producto de reacción (b). El producto de reacción de (e) se denomina TAC-V5-REPA-CIS-ORI- 408 (SEQ ID 24).

45 Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un Eppendorf Master Cycler durante 1 ciclo de 1 minuto y 45 segundos de 94°C seguido de 25 ciclos de 94°C, 15 segundos; 60°C, 30 segundos; 72°C, 1 minuto y 30 segundos, seguido de un único ciclo de 10 minutos a 72°C. Los productos de reacción se sometieron a electroforesis sobre un gel de agarosa, se escindieron y los productos se purificaron a partir del gel en 40 µl de agua estéril utilizando un kit GeneClean II de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes (Bio101, La Jolla, California, U.S.A.).

50 (f) Segunda PCR de ensamblaje. Se amplificó 1 µl (50 ng) de cada uno de los productos de reacción de (c) y (d) utilizando 50 pmoles de cada uno de los cebadores TACFARUP (SEQ ID 23) y ORIREV408 (SEQ ID 20) en una reacción de 50 µl que contenía dNTP 0,25 mM, 2,5 unidades de mezcla de ADN polimerasa TaqDeepVent (20:1), y 1x tampón de reacción de PCR (New England Biolabs, Beverly, MA, U.S.A.). El cebador TACFARUP hibrida con el extremo 5' del producto de reacción (d). El cebador ORIREV408 hibrida con el extremo 3' del producto de reacción (c).

- Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un Eppendorf Master Cycler durante 1 ciclo de 1 minuto y 45 segundos de 94°C seguido de 25 ciclos de 94°C, 15 segundos; 60°C, 30 segundos; 72°C, 1 minuto y 30 segundos, seguido de un único ciclo de 10 minutos a 72°C. Los productos de reacción se sometieron a electroforesis sobre un gel de agarosa, se escindieron y los productos se purificaron a partir del gel en 40 µl de agua estéril utilizando un kit GeneClean II de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes (Bio101, La Jolla, California, U.S.A.). El producto de reacción de (f) se denomina TAC-NNB-REPA-CIS-ORI-408 (SEQ ID 25).
- 5 Preparación de la reacción de transcripción/traducción *in vitro*: El conjunto de reacción se colocó sobre hielo, utilizando un molde lineal bacteriano Promega S30 acoplado a un kit de reacción de transcripción/traducción *in vitro* como sigue:
- 10 20 µl de molde TAC-V5-REPA-CIS-ORI-408 diluido 5.000 veces (0,1 ng del ADN del constructo final SEQ ID 24 anterior)
- 20 µl de molde TAC-NNB-REPA-CIS-ORI-408 (0,5 µg del ADN del constructo final SEQ ID 25 anterior)
- 20 µl de mezcla de aminoácidos completa (Promega)
- 80 µl de Premezcla S30
- 15 60 µl de mezcla S30
- y la reacción se dejó continuar a 25°C durante 30 minutos y se colocó sobre hielo, después se diluyó 10 veces con Marvel/PBS al 2%.
- Captura del complejo ADN-proteína. Se recubrieron inmunotubos NUNC star con 10 µg/ml de anticuerpo anti-V5 en 500 µl de PBS durante la noche a 4°C. Un tubo adicional se dejó como blanco como control negativo. Los tubos se lavaron 2x PBS y se bloquearon durante 1 hora a la temperatura ambiente con tampón de bloqueo (Marvel al 2%, Tween 20 al 0,1%, 0,1 mg/ml de ADN de esperma de arenque) y después se lavaron 2x PBS. Se añadió 1 ml de reacción de transcripción/traducción diluida a cada tubo y se incubó a la temperatura ambiente durante 1 hora. Los tubos se lavaron 5x PBS/Tween 20 al 0,1% y después 5x PBS. El ADN fue recuperado con 500 µl de tampón TE más 500 µl de fenol/cloroformo. Esto se centrifugó a 13.200g durante 5 minutos y el ADN se hizo precipitar con 1/10 volumen de acetato de sodio 3M, 50 µg/ml de glicógeno y dos volúmenes de etanol absoluto. Después de la centrifugación, los sedimentos se lavaron con etanol del 70%, se secaron a vacío y se resuspendieron en 40 µl de agua. Se volvieron a amplificar 20 µl del ADN recuperado en reacciones de 50 µl con los cebadores biotinilados bTAC6 (SEQ ID 26) y bCISREV (SEQ ID 19). Los productos de reacción se sometieron a electroforesis sobre un gel de agarosa/TAE al 1%.
- 20
- 25
- 30 Clonación del ADN recuperado en el vector de expresión pDMG-K (SEQ ID 27). Se purificaron en gel los productos de reacción y se hicieron eluir con 50 µl de agua estéril utilizando un kit de extracción en Gel QIAquick de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes (QIAGEN Ltd West Sussex, U.K.). Tanto el producto de reacción purificado como el plásmido pDMG-K fueron digeridos con 20 unidades de NcoI y NotI (New England Biolabs, Beverly, MA, U.S.A.). El plásmido cortado se purificó en gel utilizando un kit de extracción en Gel QIAquick de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes (QIAGEN Ltd West Sussex, U.K.), después se hizo reaccionar con 0,01 unidades de Fosfatasa Alcalina Intestinal de Ternera (Promega, Southampton, U.K.) seguido de extracción con fenol/cloroformo y precipitación en etanol como se ha descrito más arriba. El ADN precipitado se disolvió en 20 µl de agua. El producto cortado de la PCR se transfirió a tiras recubiertas con Estreptavidina (Roche Diagnostics Ltd, East Sussex, U.K.) en 1x TBS, 0,3 mg/ml de BSA, Tween 20 al 0,1% y se incubaron durante 30 minutos a la temperatura ambiente, con movimiento oscilatorio. Este enfoque elimina el ADN biotinilado colindante aguas arriba y aguas abajo del sitio NcoI y NotI del producto de la PCR y permite la recuperación del fragmento pequeño de ADN que contiene la secuencia peptídica seleccionada. El sobrenadante se extrajo con fenol/cloroformo y se precipitó con etanol como se ha descrito más arriba. El ADN precipitado se disolvió en 10 µl de agua. El plásmido cortado y el fragmento de ADN pequeño aislado que contenía la secuencia del péptido seleccionado, que tenían ambos salientes NcoI y NotI, fueron ligados utilizando el kit de ligación Quick de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes (New England Biolabs, Beverly, MA, U.S.A.) seguido de extracción con fenol/cloroformo y precipitación con etanol como se ha descrito más arriba. El ADN precipitado se disolvió en 10 µl de agua y se sometió a electroporación en células TG1 electrocompetentes de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes (Stratagene, U.S.A.) y se seleccionó sobre placas con 2xTY, 100 µg/ml de ampicilina, y glucosa al 2%.
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55 Escrutinio ELISA con anticuerpo anti-V5 de los clones seleccionados. Se seleccionaron 88 colonias en 400 µl de 2x TY, glucosa al 2%, y 100 µg/ml de ampicilina y se hicieron crecer durante la noche a 37°C, con movimiento oscilatorio a 300 rpm. Se transfirieron 50 µl de los cultivos realizados durante la noche a 1 ml de 2x TY, glucosa al 2%, y 100 µg/ml de ampicilina y se hicieron crecer a 37°, con movimiento oscilatorio a 300 rpm hasta una DO de 0,5. Después las células se centrifugaron a 1000x g durante 10 minutos. Los sobrenadantes se descartaron y los sedimentos se resuspendieron en 600 µl de 2x TY, sacarosa 0,4 M, 100 µg/ml de ampicilina, e IPTG 1 mM y se hicieron crecer durante 4 horas a 37°C, 300 rpm. Después de la inducción las células se centrifugaron a 1000x g durante 10 minutos. Se utilizaron 150 µl de los sobrenadantes

5 en el ensayo ELISA. Se recubrieron placas NUNC Maxisorp con 100 µl de 1µg/ml en 1x PBS de anticuerpo anti-región kappa humana o anticuerpo anti-V5 o 50 µg/ml de BSA durante 7 horas a la temperatura ambiente. Una placa adicional se dejó como blanco, recubierta solamente con PBS. Los pocillos se enjuagaron 2x PBS seguido de bloqueo durante 1 hora a la temperatura ambiente con 300 µl de Marvel al 4%, Tween al 0,1% en 1x PBS. Los pocillos se enjuagaron 2x PBS, después se añadieron 150 µl de sobrenadante y 150 µl de Marvel al 4%, Tween 20 al 0,1% en 1x PBS a los pocillos y se incubaron durante 1 hora a la temperatura ambiente. Luego los pocillos se lavaron en 2xPBS, Tween 20 al 0,1% y 2x PBS. El anticuerpo secundario anti-región kappa humana conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) (concentración final 1,6 µg/ml) se diluyó 500 veces en Marvel al 4%, Tween 20 al 0,1%, 1x PBS y se añadió a los pocillos y se incubó durante 1 hora a la temperatura ambiente. Después se lavaron los pocillos 4x PBS, Tween 20 al 0,1% y 2x PBS. La señal de HRP se detectó añadiendo 200 µl de sustrato TMB. La reacción se detuvo con 100 µl de ácido sulfúrico 0,5 M. La absorbancia se leyó a 450 nm. Treinta y cinco clones se expresaron bien a juzgar por la señal de HRP de los clones escrutados frente al anticuerpo anti-región kappa humana. Siete de estos treinta y cinco clones mostraron una unión específica al anticuerpo anti-V5, enriqueciendo de ese modo en péptidos V5 de 1 por 5.000 a 1 por 5, esto es, un factor de enriquecimiento de 1.000 (Figura 6).

Ejemplo 4: Construcción, selección y escrutinio de la Genoteca de presentación CIS frente a *Bacillus globigii*

Construcción de la Genoteca

20 Para generar el ADN de la genoteca, se deben generar un fragmento de ADN de la genoteca de promotores y el fragmento RepA-CIS-ori, después se ligan entre sí mediante digestión-ligación. Se utilizó en este ejemplo el promotor tac de un vector P2A-HA, pero se podrían utilizar muchos promotores disponibles, y son bien conocidos por los expertos en la técnica. La PCR inicial de los fragmentos Rep-CIS-ori y TAC añade un sitio Bsp120I y la genoteca al azar/sitio NotI, respectivamente. Se prepararon dos mezclas maestras:

25 10 µl de ADN plasmídico P2A-HA diluido 1:50 (25 ng/reacción) se amplificaron mediante PCR en un volumen de reacción de 20x 50µl que contenía dNTP 200 mM, tampón de amplificación con polimerasa 1xNEB (KCl 10 mM, (NH₄)₂SO₄ 10 mM, Tris-HCl 20 mM pH 8,8, MgSO₄ 2 mM, Triton X-100 al 0,1%) con 10 pmoles de cada uno de los cebadores TACFARUP (SEQ ID 23) y NTERM18MER (SEQ ID28) y 2 unidades de mezcla 20:1 de ADN polimerasa Taq:ADN polimerasa Deep Vent (NEB) durante 25 ciclos de 94°C, 40 segundos; 60°C, 40 segundos; 72°C, 60 segundos; seguido de una prolongación de 5 minutos a 72°C. Se sometieron a electroforesis 20 µl de producto de reacción sobre un gel de agarosa al 1%/TAE y se fotografiaron, mientras el resto fue purificado en una columna Qiagen en 200 µl de agua.

30 Se amplificaron mediante PCR 10 µl de ADN Rep-CIS-ori corregido con Bsp120I (50ng/reacción) en un volumen de reacción de 10x50 µl que contenía dNTP 200 µM, tampón de amplificación de polimerasa 1x NEB (KCl 10 mM, (NH₄)₂SO₄ 10 mM, Tris-HCl 20 mM pH 8,8, MgSO₄ 2mM, Triton X-100 al 0,1%) con 10 pmoles de cada uno de los cebadores BSPREPAFOR (SEQ ID 29) y ORIREV (SEQ ID 02) y 2 unidades de mezcla 20:1 de ADN polimerasa Taq: ADN polimerasa Deep Vent (NEB) durante 30 ciclos de 94°C, 40 segundos; 60°C, 40 segundos; 72°C, 90 segundos; seguido de una prolongación de 5 minutos a 72°C. Se sometieron a electroforesis 20 µl de producto de reacción sobre un gel de agarosa al 1%/TAE y se fotografiaron, mientras el resto fue purificado en una columna Qiagen en 120 µl de agua.

40 El producto de genoteca-TAC fue digerido después con 10 µl de NotI (NEB) (100 u) durante 1 hora a 37°C en un volumen de reacción de 300 µl, después fue purificado en columna Qiagen en un volumen de 120 µl de agua. Los dos productos se reunieron después mediante restricción-ligación como sigue:

10x tampón NEB 4	17 µl
ATP 100 mM (SIGMA)	15 µl
10 mg/ml BSA acetilado (NEB)	1 µl
ADN RepA	40 µl
ADN genoteca TAC	40 µl
Bsp 120I (10 u/µl Fermentas)	5 µl
NotI (10 u/µl NEB)	5 µl
ADN ligasa T4 (400 u/µl NEB)	5 µl
Agua	39 µl

5 La reacción se llevó a cabo a 37°C durante dos horas. Se evaluaron 20 µl mediante electroforesis en gel, se amplificaron mediante PCR 30 µl directamente en reacciones de 10x 50µl, y el resto se purificó en gel y la banda de la genoteca se escindió, se purificó en columna Qiagen y se amplificó mediante PCR en reacciones de 20x50 µl con los cebadores TACFAR4 (SEQ ID 30) y ORIREV (SEQ ID 02) durante 30 ciclos de 94°C, 40 segundos; 60°C, 40 segundos; 72°C, 90 segundos; seguido de una prolongación de 5 minutos a 72°C. El ADN se purificó en gel en 4 columnas Qiagen y los 200 µl de producto eluido se reunieron para la reacción/selección ITT.

Ronda 1 Selección

10 Se dispuso una reacción de 2 x 200 µl de ITT y se incubó a la temperatura ambiente durante 1 hora como sigue:

REACCIÓN	l
ADN Genoteca	56 µl /7 µg)
2,5x tampón	80 µl
metionina 100 nM	2 µl
Extracto S30	60 µl

Se añadió 1 ml de tampón de bloqueo a cada reacción (el tampón de bloqueo es Marvel al 4%, 100 µg/ml de ADN de esperma de salmón sometido a cizalla, Tween 20 al 0,1%, 2,5 mg/ml de heparina, en TBS), se centrifugó a 10.000g durante 2 minutos, se transfirió a un tubo fresco, después se colocó sobre hielo.

15 Se lavaron dos veces 100 µl de suspensión de esporas de *Bacillus globigii* (Bg) con 1 ml de TBS/Tween 20 al 0,1% y se volvieron a suspender en 100 µl de tampón de Bloqueo. Después esto se añadió al tampón de Bloqueo y se dejó que se unieran a la temperatura ambiente durante 1 hora mientras se mezclaban.

20 La mezcla se centrifugó después a 16.100 g durante 1 minuto y el sedimento de esporas se lavó seis veces con 1 ml de TBS/Tween 20 al 0,1% mezclando con una pipeta y se sometió a vórtice antes de la centrifugación. Finalmente el sedimento se lavó en 1 ml de TBS y el sobrenadante se descartó.

25 El ADN se hizo eluir mediante incubación de las esporas en 120 µl de acetato de sodio 0,5 M pH 5,5 durante 10 minutos en una mezcladora. Las esporas se centrifugaron a 16.100 g durante 1 minuto y el sobrenadante se neutralizó mediante la adición de 120 µl de Tris pH 8,0 y después se extrajo con fenol/CHCl₃ durante 5 minutos a 16.100 g. El ADN se precipitó con 20 µg de glicógeno portador y dos volúmenes y medio de etanol. El ADN se sedimentó a 16.100 g durante 20 minutos y el sedimento se lavó tres veces con 0,75 ml de etanol del 70%, centrifugando durante 3 minutos a 16.100 g entre cada lavado, después se secó al aire y se volvió a suspender en 20 µl de agua.

30 Se amplificaron por PCR 10 µl de ADN recuperado en reacciones de 10 x 50 µl con los cebadores CISREV (SEQ ID 19) y TACFAR5 (SEQ ID 31) y 2 unidades de mezcla 20:1 de ADN polimerasa Taq:ADN polimerasa Deep Vent (NEB) durante 30 ciclos de 94°C, 40 segundos; 60°C, 40 segundos; 72°C, 90 segundos; seguido de una prolongación de 5 minutos a 72°C. El ADN fue purificado, precipitado en etanol y re-suspendido en 10 µl de agua. Se amplificaron adicionalmente 5 µl mediante PCR utilizando las condiciones anteriores pero empleando los cebadores NOTRECREV2 (SEQ ID 32) y TACFAR5 (SEQ ID 31) durante 10 ciclos. El producto se purificó utilizando un kit de purificación por PCR Qiagen y se hizo eluir en 50 µl de Tris 5 mM pH 8,0.

Restricción-Ligación

Esto se llevó a cabo en una reacción de 30 µl durante 1 hora a 37°C para volver a anclar el ADN RepA-CIS-ori a los péptidos recuperados para una ronda de selección adicional.

10x tampón NEB 4	3 µl
ATP 100 mM (SIGMA)	1,5 µl
10 mg/ml BSA acetilado (NEB)	0,3 µl
ADN RepA	2 µl
ADN genoteca TAC	10 µl
Bsp 120I (10 u/µl Fermentas)	1,5 µl
NotI (10 u/µl NEB)	1,5 µl
ADN ligasa T4 (400 u/µl NEB)	1,5 µl
Agua	8,7 µl

- 5 Se amplificaron por PCR directamente 20 µl de reacciones de 10x 50 µl con los cebadores TACFAR5.1 (SEQ ID 33) y ORIREV (SEQ ID 02) durante 20 ciclos de 94°C, 40 segundos; 60°C, 40 segundos; 72°C, 90 segundos; seguido de una prolongación de 5 minutos a 72°C. El ADN se purificó en gel en una columna Qiagen y el producto eluido se utilizó para la Ronda 2 de reacciones/selección ITT (58 µl utilizados en R2).

Ronda 2

- 10 Se llevó a cabo la segunda ronda de selección como la ronda 1, con los siguientes cambios: Se utilizaron aproximadamente 3 µg de ADN de entrada. El tampón de bloqueo utilizado fue albúmina de suero bovino al 2%, gelatina al 1%, 100 µg/ml de ADN de esperma de salmón sometido a cizalla, 2,5 mg/ml de heparina, en TBS. En cada selección se utilizaron 10 µg de esporas lavadas. La PCR de recuperación utilizó los cebadores TACFAR5.2 (SEQ ID 34) y NOTRECREV2 (SEQ ID 32). Finalmente, la PCR tipo "pull through" utilizó los cebadores TACFAR5.2 (SEQ ID 34) y ORIREV (SEQ ID 02) durante 10 ciclos.

Ronda 3

La tercera ronda de selección se llevó a cabo como la ronda 2, con los siguientes cambios: Se utilizaron aproximadamente 2,5 µg de ADN de entrada. Las PCR de recuperación utilizaron los cebadores TACFAR6 (SEQ ID 35) y NOTRECREV2 (SEQ ID 32). Finalmente, la PCR tipo "pull through" utilizó los cebadores TACFAR6 (SEQ ID 35) y ORIREV (SEQ ID 02) durante 10 ciclos.

Ronda 4

La ronda 4 se llevó a cabo como la ronda 3, excepto que se utilizaron aproximadamente 2 µg de ADN de entrada para la selección. Las PCR de recuperación utilizaron los cebadores TAC3 (SEQ ID 09) y NOTRECREV2 (SEQ ID 32). Finalmente, la PCR tipo "pull through" utilizó los cebadores TAC3 (SEQ ID 09) y ORIREV (SEQ ID 02) durante 10 ciclos.

Ronda 5

La ronda 5 se llevó a cabo como la ronda 4.

- 30 Para la clonación en forma de fragmentos NcoI-NotI, el ADN almacenado recuperado de la ronda 5 fue amplificado por PCR con el cebador TAC6 (SEQ ID 26) y NOTRECREV2 (SEQ ID 32) biotinilados. La digestión con NotI estuvo seguida de purificación utilizando el kit de purificación por PCR Qiagen, digestión con NcoI seguido de incubación en una placa recubierta con estreptavidina. Después de la purificación con fenol/CHCl₃ y precipitación con etanol, el ADN digerido se ligó después en un vector fagémido pVIII digerido de una manera similar y se transformó en *E. coli* ER2738, después se cultivó en placa sobre glucosa al 2%, 2xTY, 100 µg/ml de ampicilina y se incubó durante la noche a 37°C.

- 35 Las colonias individuales se escogieron en 200 µl de medio con glucosa al 2%, 2xTY, 100 µg/ml de ampicilina en placas de 96 pocillos, y se hicieron crecer a 37°C/200 rpm durante 6 horas. Se transfirieron 10 µl a una placa de pocillos profundos que contenían 100 µl de glucosa al 2%, 2xTY, 100 µg/ml de ampicilina más 10 µl de fago coadyuvante M13K07/pocillos y se incubaron durante 1 hora sin movimiento oscilatorio a 37°C. Se añadieron 500 µl por pocillo de medio con 2xTY, 100 µg/ml de ampicilina/25 µg/ml de kanamicina/20 µM de IPTG y la incubación se llevó a cabo durante la noche a 37°C/200rpm.

Escrutinio ELISA

Se bloquearon placas de 96 pocillos de fondo redondo con Marvel al 4% en TBS/Tween 20 al 0,1% en PBS durante 1 hora a la temperatura ambiente. Los cultivos de fago escogidos se centrifugaron a 3000g durante 5 minutos y el sobrenadante de fago se analizó en un ELISA. En cada pocillo se mezclaron 50 µl de sobrenadante de fago con 5 µl de esporas *Bg* en 50 µl de albúmina de suero bovino al 4%, gelatina al 1% en TBS y se incubaron mientras se sacudía a la temperatura ambiente durante 1 hora. Los pocillos se lavaron 5 x con 200 µl de TBS/Tween 20 al 0,1% mediante centrifugación a 3000g durante 5 minutos entre cada lavado antes de la incubación con anticuerpo anti-M13 conjugado con peroxidasa de rábano picante, 0,2 µg/ml en albúmina de suero bovino al 4%, gelatina al 1% en TBS. Las esporas se incubaron a la temperatura ambiente durante 1 hora mientras se sacudía. Los pocillos se lavaron después 5 x con TBS/Tween 20 al 0,1% y las esporas se transfirieron a una placa nueva. Las esporas se lavaron después una vez con TBS como se ha descrito más arriba antes del desarrollo con el sustrato TMB. El desarrollo se detuvo con H₂SO₄ 0,5 M y la solución se transfirió a una placa de fondo plano nueva para la lectura a 450 nm. Los datos de unión para los péptidos seleccionados se muestran en la Figura 7.

Ejemplo 5. Construcción, selección y escrutinio de la Genoteca de presentación CIS frente al anticuerpo anti-V5

La construcción de la genoteca se llevó a cabo como se ha descrito en el Ejemplo 4.

Ronda 1 Selección

Se estableció una reacción de transcripción/traducción *in vitro* (ITT) de 1x 200 µl y se incubó a la temperatura ambiente durante 1 hora como se describe en el Ejemplo 4. Se añadió 1 ml de tampón de bloqueo a cada reacción (tampón de Bloqueo es leche en polvo desnatada al 5%, 100 µg/ml de ADN de esperma de salmón sometido a cizalla, 2,5 mg/ml de heparina, en TBS), después se colocó sobre hielo.

Para la primera ronda de selección de la genoteca se recubrió un Inmuntubo Nunc Maxisorb de 70x11 mm (Life Technologies, Paisley, Scotland U.K.) con 1 ml de 10µg/ml de anticuerpo anti-péptido V5 policlonal (Harlan-Seralab) en PBS durante 1 hora a 37°C. El tubo se enjuagó tres veces con PBS (lleno y vacío) y se bloqueó con 3 ml de tampón de bloqueo durante 1 hora a 37°C y se lavó como antes. Se añadieron complejos de proteína de la genoteca-ADN en tampón de bloqueo, y se incubaron durante 1 hora dejando estar a la temperatura ambiente. El tubo se lavó cinco veces con PBS/Tween 20 al 0,1%, después cinco veces más con PBS solamente.

El ADN se hizo eluir en 500 µl de Acetato de sodio 1 M pH 5,2 durante 10 minutos sobre la mezcladora de sangre, se neutralizó con Tris-HCl 100 µM pH 8,0, después se extrajo con fenol/CHCl₃ durante 5 minutos a 16.100g. El ADN se hizo precipitar con 20 g de glicógeno portador, 1/2 volumen de acetato de amonio 7,5 M, y tres volúmenes de etanol. El ADN se sedimentó a 16.100 g durante 20 minutos y el sedimento se lavó con 0,5 ml de etanol del 70% durante 5 minutos a 16.100 g luego se secó a vacío, y se re-suspendió en 20 µl de agua.

El ADN recuperado se amplificó mediante PCR en una reacción de 1x50 µl con los cebadores NOT1RECREV2 (SEQ ID 32) y TACFAR4 (SEQ ID 30) y 2 unidades de mezcla 20:1 de ADN polimerasaTaq:ADN polimerasa Deep Vent (NEB) durante 30 ciclos de 94°C, 40 segundos; 60°C, 40 segundos; 72°C, 90 segundos; seguido de una prolongación de 5 minutos a 72°C. Se sometieron a electroforesis 50 µl de producto de reacción sobre un gel de agarosa al 1%/TAE y se fotografiaron, después se purificaron mediante GeneClean en 10 µl de agua. El ADN se volvió a anclar al ADN RepA y se volvió a amplificar para la ronda dos como se ha descrito en el ejemplo 4 utilizando los cebadores TACFAR5 (SEQ ID31) y ORIREV (SEQ ID 02).

La segunda ronda de selección se llevó a cabo como la ronda 1, utilizando los mismos pares de cebadores descritos en el ejemplo 4, con los siguientes cambios: La concentración de recubrimiento con anticuerpo anti-V5 se redujo a 5 µg/ml. El ADN de entrada fue aproximadamente 4 µg. La tercera ronda de selección se llevó a cabo como la ronda 2, con los siguientes cambios: Se utilizaron aproximadamente 4 µg de ADN de entrada. Las PCR de recuperación utilizaron los cebadores TACFAR5.1 (SEQ ID 33) y NOTRECREV2 (SEQ ID 32). Finalmente, la PCR tipo "pull through" utilizó los cebadores TACFAR6 (SEQ ID 35) y ORIREV (SEQ ID 02) durante 10 ciclos. La ronda 4 se llevó a cabo como la ronda 3.

Para clonar en forma de fragmentos NcoI-NotI, el ADN almacenado recuperado de la ronda 4 se amplificó por PCR con los cebadores TAC6 biotinilado (SEQ ID 26) y NOTIREPRECREV2 (SEQ ID 32) y se clonó en el vector fagémido VIII y se sometió a electroporación en *E. coli* TG-1 electrocompetente como se ha descrito en el ejemplo 4.

Las colonias individuales se escogieron en 200 µl de medio con glucosa al 2%, 2xTY, 100 µg/ml de ampicilina en placas de 96 pocillos, y se hicieron crecer a 37°C/200rpm durante 6 horas. Se transfirieron 100 µl a una placa de pocillos profundos que contenían 100 µl de glucosa al 2%, 2xTY, 100 µg/ml de ampicilina más 10⁹ fagos coadyuvantes kru M13K07/pocillo y se incubaron durante 1 hora sin movimiento oscilatorio a 37°C.

Se añadieron 400 µl por pocillo de medio 2xTY, 100 µg/ml de ampicilina/25 µg/ml de kanamicina/IPTG 30 µM y la amplificación del fago continuó durante 16 horas a 37°C mientras se sacudía a 200 rpm. Los cultivos bacterianos se centrifugaron en portadores de placas de microtitulación a 2000 g durante 10 minutos a 4°C en una centrifuga de mesa para sedimentar las bacterias y el sobrenadante de cultivo se utilizó para el ELISA.

- 5 Se recubrió una placa de ELISA NUNC Maxisorp con 100 ng/pocillo de anticuerpo anti-péptido V5 en 100 µl/pocillo durante una hora a 37°C. La placa se lavó 2x200 µl/pocillo y se bloqueó durante 1 hora a 37°C con 200 µl/pocillo de BSA al 2%/PBS y después se lavó con 2x200µl/pocillo de PBS. Se añadieron 50 µl de sobrenadante de cultivo de fagos a cada pocillo que contenía 50 µg/pocillo de BSA al 4%/PBS, y se dejó que se unieran durante 1 hora a la temperatura ambiente. La placa se lavó dos veces con 200 µl/pocillo de PBS/Tween 20 al 0,1%, después dos veces con 200 µl/pocillo de PBS. Los fagos unidos se detectaron con 100 µl/pocillo, producto conjugado anti-M13-HRP diluido 1:5.000 (Amersham-Pharmacia) en BSA al 2%/PBS durante 1 hora a la temperatura ambiente y la placa se lavó cuatro veces como antes. La placa se desarrolló durante 5 minutos a la temperatura ambiente con 100 µl/pocillo de tampón sustrato de TMB (3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina). La reacción se detuvo con 100 µl/pocillo de H₂SO₄ 0,5 N y se leyó a 450 nm. El ADN del fagémido de los clones positivos al ELISA se secuenciaron después con cebadores de secuenciación pUC directo e inverso convencionales. La secuencia de aminoácidos de estos clones aislados se muestra más abajo. Se hicieron crecer cuatro clones positivos para ELISA en volúmenes de cultivo de 10 ml y las partículas de fago se hicieron precipitar con PEG-NaCl y se volvieron a suspender en 1 ml de PBS y se volvieron a someter a ensayo en ELISA 50 µl como se ha descrito más arriba. Las señales de DO a 450 nm frente a anticuerpo anti-V5 y anti-ACTH de control se muestran en la Figura 8.

Secuencias peptídicas aisladas después de la selección:

P1C12 (SEQ ID 36)	CGCPTMAARVRPVLNSKH
P2H1 (SEQ ID 37)	MTTVPVLMISV
P1B5 (SEQ ID 38)	TLSTRHHNVIDRFNLRNF
25 P2B8 (SEQ ID 39)	SIRTLTGSTPAQFDATAD

Ejemplo 6. Selección de péptidos de unión a ovoalbúmina de una genoteca de presentación CIS

- 30 Para cualquier metodología de selección es importante que las entidades seleccionadas sean capaces de unirse a la diana seleccionada, independientemente de la molécula portadora asociada con ella durante la selección y el escrutinio. En este ejemplo, los péptidos se seleccionan y sintetizan para permitir la confirmación de la unión a la diana. Se llevó a cabo la construcción de una genoteca de péptidos de 12 unidades al azar como se ha descrito en el Ejemplo 3. Se llevaron a cabo cuatro rondas de selección como se ha descrito en el ejemplo 4 con 100 µg/ml de ovoalbúmina (SIGMA, Dorset, UK aplicada como recubrimiento sobre inmunotubos.

- 35 Para clonar en forma de fragmentos Ncol-NotI, el ADN recuperado de la ronda 4 fue amplificado mediante PCR con los cebadores TAC6 biotinilado (SEQ ID 26) y NOTIREPRECREV2 (SEQ ID 32) y clonado en un vector fagémido pVIII y sometido a electroporación en *E. coli* TG-1 electrocompetente, como se ha descrito en el ejemplo 4.

- 40 Las colonias individuales fueron escogidas en 200 µl de medio con glucosa al 2%, 2xTY, 100 µg/ml de ampicilina en placas de 96 pocillos, y se hicieron crecer a 37°C/200rpm durante 6 horas. Se transfirieron 100 µl a una placa de pocillos profundos que contenía 100 µl de glucosa al 2%, 2xTY, 100 µg/ml de ampicilina más 10⁹ fagos coadyuvantes kru M13K07/pocillo y se incubaron durante 1 hora sin movimiento oscilatorio a 37°C. Se añadieron 400 µl por pocillo de medio con 2xTY, 100 µg/ml de ampicilina/25 µg/ml de kanamicina/IPTG 20 µM y la amplificación de fagos continuó durante 16 horas a 37°C mientras se sacudía a 200 rpm. Los cultivos bacterianos se centrifugaron en portadores para placas de microtitulación a 2.000 g durante 10 minutos a 4°C en una centrifuga de mesa para sedimentar las bacterias y el sobrenadante de cultivo se utilizó para un ELISA.

- 45 Se recubrió una placa ELISA NUNC Maxisorp con 100 µg/pocillo de ovoalbúmina en 100 µl/pocillo de PBS durante la noche a 4°C. La placa se lavó con 2x200µl/pocillo y se bloqueó durante 1 hora a 37°C con 200 µl/pocillo de BSA al 2%/PBS y después se lavó con 2x200 µl/pocillo de PBS. Se añadieron 50 µl de sobrenadante de cultivo de fagos a cada pocillo que contenía 50 µl/pocillo de BSA al 4%/PBS, y se dejó que se unieran durante 1 hora a la temperatura ambiente. La placa se lavó dos veces con 200 µl/pocillo de PBS/Tween 20 al 0,1%, después dos veces con 200 µl/pocillo de PBS. Los fagos unidos se detectaron con 100 µl/pocillo, de producto conjugado anti-M13-HRP diluido 1:5000 (Amersham-Pharmacia) en BSA/PBS al 2% durante 1 hora a la temperatura ambiente y la placa se lavó cuatro veces como antes. La placa se desarrolló durante 5 minutos a la temperatura ambiente con 100 µl/pocillo de tampón para sustrato TMB (3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina). La reacción se detuvo con 100 µl/pocillo de H₂SO₄ 0,5 N y se leyó a 450 nm. El ADN de fagémido de los clones positivos para ELISA fue secuenciado después con el cebador M13REV. La secuencia de aminoácidos de estos clones aislados se muestra más abajo.

C1 (SEQ ID 40)	ANLWRIVLHGWW
C4 (SEQ ID 41)	VSFMLLGPHRHR
C6 (SEQ ID 42)	LVLHWLSLGSR
C8 (SEQ ID 43)	SNQVVILHLRP
5 Control (SEQ ID 44)	AESWLHQSWIHL

Se sintetizaron las secuencias peptídicas de cuatro clones positivos para ELISA representativos (SIGMA-Genosys Ltd) con biotina añadida al extremo C para ayudar a la detección en el ELISA. Estos péptidos se sometieron a ensayo en un ELISA frente a ovoalbúmina, junto con un péptido de control aislado previamente mediante selección por presentación en fagos frente a esporas de *B. globigii*. Se recubrió una placa de ELISA NUNC Maxisorp con 100 µg/pocillo de ovoalbúmina en 100 µl/pocillo de PBS, o, 200 ng/pocillo de anticuerpo policlonal anti-V5 en PBS, durante la noche a 4°C. La placa se lavó con 2x200 µl/pocillo de PBS y se bloqueó durante 1 hora a 37°C con 200 µl/pocillo de leche en polvo desnatada al 2%/PBS y después se lavó con 2x200 µl/pocillo de PBS. Se añadió 1 µg de péptidos diluidos a cada pocillo en 100 µl/pocillo de BSA al 2%/PBS, y se permitió que se unieran durante 1 hora a la temperatura ambiente. La placa se lavó dos veces con 200 µl/pocillo de PBS/Tween 20 al 0,1%, después dos veces con 200 µl/pocillo de PBS. Los péptidos unidos se detectaron con 100 µl/pocillo de producto conjugado de estreptavidina-HRP diluido 1: 2000 (Pierce) en BSA al 2%/PBS durante 1 hora a la temperatura ambiente y la placa se lavó cuatro veces como antes. La placa se desarrolló durante 5 minutos a la temperatura ambiente con 100 µl/pocillo de tapón para sustrato TMB (3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina). La reacción se detuvo con 100 µl/pocillo H₂SO₄ 0,5 N y se leyó a 450 nm (Figura 9).

Ejemplo 7. Presentación de fragmentos de anticuerpo Fv de cadena sencilla (scFv) en un sistema de presentación CIS

Se construyó un constructo tac-scFv-RepA-CIS-ori mediante prolongación del solapamiento por PCR esencialmente como se ha descrito previamente en el ejemplo 1. Se amplificó ADN de scFv anti-mecoprop (Haptogen Ltd, Aberdeen, UK) en un volumen de reacción de 50 µl que contenía dNTP 200 µM, 1xTampón de amplificación con polimerasa NEB (KCl 10 mM, (NH₄)₂SO₄ 10 mM, Tris-HCl 20 mM pH 8,8, MgSO₄ 2 mM, Triton X-100 al 0,1%) con 10 pmoles de cada uno de los cebadores TACMECOFOR (SEQ ID 45) y REPAMECOBAK (SEQ ID 46) y 2 unidades de mezcla 20:1 de ADN polimerasa Taq:ADN polimerasa Deep Vent (NEB) durante 30 ciclos de 94°C, 40 segundos; 60°C, 40 segundos; 72°C, 80 segundos; seguido de una prolongación de 5 minutos a 72°C. Los productos se sometieron a electroforesis sobre un gel de agarosa al 1%/TAE y se purificaron con un kit GeneClean II en 20 µl de agua. Esto se ensambló con ADN RepA-CIS-ori generado con ORIREV408 (SEQ ID 20) y MECOREPAFOR (SEQ ID 47), y ADN de promotor Tac generado con TACFARUP (SEQ ID 23) y MECOTACBAK (SEQ ID 48) en un volumen de reacción de 50 µl que contenía dNTP 200 µM, 1xTampón de amplificación con polimerasa NEB (KCl 10 mM, (NH₄)₂SO₄ 10 mM, Tris-HCl 20 mM pH 8,8, MgSO₄ 2 mM, TritonX-100 al 0,1%) con 10 pmoles de cada uno de los cebadores TAC3 (SEQ ID 09) y ORIREV (SEQ ID 02) y 2 unidades de mezcla 20:1 de ADN polimerasa Taq:ADN polimerasa Deep Vent (NEB) durante 30 ciclos de 94°C, 40 segundos; 60°C, 40 segundos; 72°C, 80 segundos; seguido de una prolongación de 5 minutos a 72°C. Los productos se sometieron a electroforesis sobre un gel de agarosa al 1%/TAE y se purificaron con un kit GeneClean II en 20 µl de agua.

Se reamplificó el ADN en 10x reacciones de 50 µl que contenían dNTP 200 µM, 1xTampón de amplificación de polimerasa NEB (KCl 10 mM, (NH₄)₂SO₄ 10 mM, Tris-HCl 20 mM pH 8,8, MgSO₄ 2 mM, Triton X-100 al 0,1%) con 10 pmoles de cada uno de los cebadores TAC3 (SEQ ID 09) y ORIREV (SEQ ID 02) y 2 unidades de mezcla 20:1 de ADN polimerasa Taq:ADN polimerasa Deep Vent (NEB) durante 30 ciclos de 94°C, 40 segundos; 60°C, 40 segundos; 72°C, 80 segundos; seguido de una prolongación de 5 minutos a 72°C. Los productos se sometieron a electroforesis sobre un gel de agarosa al 1%/TAE y se purificaron con un kit GeneClean II en 100 µl de agua.

Después se tradujeron los ADN de ScFv en las dos siguientes condiciones de reacción:

REACCIÓN	1	2
ADN Tac-scFv-RepA	28 µl (1 µg)	28 µl (1 µg)
2,5x tampón	40 µl	40 µl
metionina 10 mM	1 µl	1 µl
H ₂ O	1 µl	-
Extracto S30	30 µl	30 µl

- 5 Las reacciones se incubaron a 30°C durante 30 minutos después se añadió 1 µl de oxiglutación 0,25 M a la reacción 2 y la incubación a 30°C continuó durante 30 minutos más. Se añadió 1 ml de tampón de bloqueo a cada reacción (El tampón de bloqueo es gelatina al 1%, 100 µg/ml de ADN de esperma de salmón sometido a cizalla, 2,5 mg/ml de heparina, en TBS), se centrifugó a 10.000 g durante 2 minutos, después se colocó sobre hielo.
- 10 Se recubrieron inmunotubos NUNC star con 0,5 ml de producto conjugado de BSA-mecoprop de 10 µg/ml, o 10 µg/ml de BSA en PBS durante 1 hora a 37°C. Los tubos se lavaron 2x PBS, después se bloquearon durante 1 hora a la temperatura ambiente con 3 ml de tampón de bloqueo en una mezcladora de sangre, después se lavaron los tubos 2x PBS.
- 15 Se añadieron 0,5 ml de cada ITT diluido a un tubo recubierto con BSA bloqueado o recubierto con BSA-mecoprop y se incubaron a la temperatura ambiente durante 1 hora. Los tubos se lavaron 5x TBS/Tween 20 al 0,1%, 5x TBS.
- 20 El ADN unido se hizo eluir durante 10 minutos a la temperatura ambiente con 0,5 ml de NaCl 0,5 M/Tris 10 mM pH 8, EDTA 1 mM, después se extrajo con 0,5 mL de fenol/cloroformo y se hizo precipitar con 20 µg de glicógeno portador, 1/2 volumen de acetato de amonio 7,5 M, y tres volúmenes de etanol. El ADN se sedimentó a 14.000 g durante 20 minutos y después el sedimento se lavó con 0,5 ml de etanol del 70% durante 5 minutos a 14.000 g después se secó a vacío, y se volvió a suspender en 20 µl de agua.
- 25 Se amplificaron 10 µl de ADN recuperado mediante PCR en un volumen de reacción de 50 µl que contenía dNTP 200 µM, 1xtampón de amplificación con polimerasa NEB (KCl 10 mM, (NH₄)₂SO₄ 10 mM, Tris-HCl 20 mM pH 8,8, MgSO₄ 2 mM, Triton X-100 al 0,1%) con 10 pmoles de cada uno de los cebadores TACMECOFOR (SEQ ID 45) y REPAMECOBAK (SEQ ID 46) y 2 unidades de mezcla 20:1 de ADN polimerasa Taq:ADN polimerasa Deep Vent (NEB) durante 30 ciclos of 94°C, 40 segundos; 60°C, 40 segundos; 72°C, 80 segundos; seguido de una prolongación de 5 minutos a 72°C. Los productos se sometieron a electroforesis sobre un gel de agarosa al 1%/TAE y se fotografiaron. Se observaron cantidades mayores de ADN de las selecciones sobre diana de anticuerpo que con el recuperado de los tubos recubiertos con BSA, indicando que se estaban seleccionando complejos scFv-RepA-ADN funcionales (Figura 10).

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> ISOGENICA LIMITED
- 5
- <120> MÉTODO DE PRESENTACIÓN DE UN BANCO DE PÉPTIDOS
- <130> N.86234C SER
- 10
- <150> GB 0220759.5
- <151> 2002-09-06
- <150> GB 0304521.8
- <151> 2003-02-27
- 15
- <150> GB 0304657.0
- <151> 2003-02-28
- <160> 48
- 20
- <170> PatentIn versión 3.1
- <210> 1
- 25
- <211> 23
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 30
- <223> Cebador
- <400> 1
- actgatcttc accaaacgta tta 23
- 35
- <210> 2
- <211> 22
- <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador

5

<400> 2

tgcatatctg tctgtccaca gg 22

<210> 3

10 <211> 48

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Cebador

<400> 3

gagcttcaac aggggagggg gaggaggatc aactgatctt caccaaac 48

20 <210> 4

<211> 50

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> Cebador

<400> 4

ctaggactgg attcaacggg gggaggagga tcaactgatc ttcaccaaac 50

30

<210> 5

<211> 49

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<223> Cebador

<400> 5
 cagaagagga tctgaatggg ggaggagggt ccactgtggc tgcaccatc 49

5 <210> 6
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Cebador

<400> 6
 tcccctgttg aagctcttg tg 22

15
 <210> 7
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20
 <220>
 <223> Cebador

<400> 7
 25 cagaagagga tctgaatggg ggaggagggt ccggaaaacc 40

<210> 8
 <211> 27
 <212> ADN

30 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador

35 <400> 8
 gctacgttga atccagtctc aggagag 27

<210> 9
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Cebador

 <400> 9
 10 catattgtcg ttagaacgcg gc 22

 <210> 10
 <211> 58
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador

 20 <400> 10
 attcagatcc tctctgaga tgagttttg ttctcgagc atggtagatc ctgtttcc 58

 <210> 11
 <211> 42
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador

 30 <400> 11
 cgatacctag cgttcggatc catattgtcg ttagaacgcg gc 42

 <210> 12
 35 <211> 1788
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> construcción de ADN

5 <400> 12

```

catattgtcg ttagaacgcg gctacaatta atacataacc ttatgtatca tacacatagc. 60
athtagtga cactatagaa tacaagctta ctccccatcc ccctgttgac aattaatcat 120
ggctcgata atgtgtgaa ttgtgagcgg ataacaattt cacacaggaa acaggatcta 180
ccatgctcga ggaacaaaaa ctcatctcag aagaggatct gaatggggga ggagggtcca 240
ctgtggctgc accatctgtc ttcatcttcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa 300
ctgcctctgt tgtgtgctg ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtgga 360
aggtggataa cgccctcaa tcgggtaact cccaggagag tgtcacagag caggacagca 420
aggacagcac ctacagcctc agcaacaccc tgacgctgag caaagcagac tacgagaaac 480
acaaagtcta cgctgcgaa gtcacccatc agggcctgag ctcgcccgtc acaaagagct 540
tcaacagggg agggggagga ggatcaactg atcttcacca aacgtattac cgccaggtaa 600
agaaccgaa tccggtgttc actccccgtg aaggtgccgg aacgccgaag ttccgcgaaa 660
aaccgatgga aaagggcgtg ggctcacct cccgttttga ttccgcatc catgtggcgc 720
atgccgctc ccgtggtctg cgtcggcgca tgcaccggt gctgcgctga cgggctattg 780
atgcgctgct gcaggggctg tgtttccact atgaccgct ggccaaccgc gtccagtgtt 840
ccatcaccac actggccatt gagtgcggac tggcgacaga gtccggtgca ggaaaactct 900
ccatcaccg tgcaccgg gccctgacgt tcctgtcaga gctgggactg attacctacc 960
agacggaata tgaccgctt atcgggtgct acattccgac cgacatcacg ttcacactgg 1020
ctctgtttgc tgccttgat gtgtctgagg atgcagtggc agctgcgctc cgcagtcgtg 1080
ttgaatggga aaacaaacag cgcaaaaagc aggggctgga taccctgggt atggatgagc 1140
tgatagcgaa agcctggcgt tttgtgcgtg agcgtttccg cagttaccag acagagctc 1200
agtcccgtg aataaaacgt gcccgctgcg gtcgtgatgc gaacagagaa cgtcaggata 1260
tcgtcaccct agtgaacgg cagctgacgc gtgaaatctc ggaaggacgc ttcactgcta 1320
atggtgaggg ggtaaaacgc gaagtggagc gtcgtgtgaa ggagcgcagc attctgtcac 1380
gtaaccgcaa ttacagccgg ctggccacag cttctccctg aaagtgatc cctcagaata 1440
atccggcctg cgccggaggc atccgcacgc ctgaagcccg ccggtgcaca aaaaaacagc 1500
gtcgatgca aaaaacaatc tcatcatcca cttctggag catccgattc cccctgtttt 1560
taatacaaaa tacgcctcag cgacggggaa ttttgcttat ccacatttaa ctgcaagggg 1620
cttcccata aggttacaac cgttcatgtc ataaagcgc agccgccagt cttacagggg 1680
gcaatgtatc ttttaaacac ctgtttatat ctctttaa ctacttaatt acattcattt 1740
aaaaagaaaa cctattcact gcctgtcctg tggacagaca gatatgca 1788

```

<210> 13

<211> 1518

10 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción de ADN

15

<400> 13

catattgtcg	ttagaacgcg	gctacaatta	atacataacc	ttatgtatca	tacacatacg	60
athtagtga	cactatagaa	tacaagctta	ctccccatcc	ccctggtgac	aattaatcat	120
ggctcgtata	atgtgtggaa	ttgtgagcgg	ataacaattt	cacacaggaa	acaggatcta	180
ccatgctcga	ggaacaaaa	ctcatctcag	aagaggatct	gaatggggga	ggaggggccg	240
gaaaacctat	cccaaaccct	ctcctaggac	tggattcaac	ggggggagga	ggatcaactg	300
atcttcacca	aacgtattac	cgccaggtaa	agaaccgaa	tccggtgttc	actccccgtg	360
aaggtgccgg	aacgccgaag	ttccgcgaaa	aaccgatgga	aaaggcggg	ggcctcacct	420
cccgttttga	tttcagccatt	catgtggcgc	atgcccggtc	ccgtggtctg	cgtcggcgca	480
tgccaccggt	gctgcgctga	cgggctattg	atgcgctgct	gcaggggctg	tgtttccact	540
atgaccgct	ggccaaccgc	gtccagtgtt	ccatcaccac	actggccatt	gagtgcggac	600
tggcgacaga	gtccggtgca	ggaaaactct	ccatcaccgc	tgccaccg	gccctgacgt	660
tcctgtcaga	gctgggactg	attacctacc	agacggaata	tgaccgctt	atcgggtgct	720
acattccgac	cgacatcacg	ttcacactgg	ctctgtttgc	tgcccttgat	gtgtctgagg	780
atgcagtggc	agctgcgctc	cgcagtcgtg	ttgaatggga	aaacaaacag	cgcaaaaagc	840
aggggctgga	taccctgggt	atggatgagc	tgatagcgaa	agcctggcgt	tttgtgcgtg	900
agcgtttccg	cagttaccag	acagagcttc	agtcccgtgg	aataaaacgt	gcccgctgcgc	960
gtcgtgatgc	gaacagagaa	cgtcaggata	tcgtcaccct	agtgaaacgg	cagctgacgc	1020
gtgaaatctc	ggaaggacgc	ttcactgcta	atggtgaggc	ggtaaaacgc	gaagtggagc	1080
gtcgtgtgaa	ggagcgcgatg	attctgtcac	gtaaccgcaa	ttacagccgg	ctggccacag	1140
cttctccctg	aaagtgatct	cctcagaata	atccggcctg	cgccggaggc	atccgcacgc	1200
ctgaagcccg	ccggtgcaca	aaaaaacagc	gtcgcgatgca	aaaaacaatc	tcatcatcca	1260
ccttctggag	catccgattc	cccctgtttt	taatacaaaa	tacgcctcag	cgacggggaa	1320
ttttgcttat	ccacatttaa	ctgcaagggg	cttccccata	aggttacaac	cgttcatgtc	1380
ataaagcgcc	agccgccagt	cttacagggg	gcaatgtatc	ttttaaacac	ctgtttatat	1440
ctcctttaaa	ctacttaatt	acattcattt	aaaaagaaaa	cctattcact	gcctgtcctg	1500
tggacagaca	gatatgca					1518

<210> 14

<211> 38

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de reconocimiento de la diana de un receptor de estrógenos

10

<400> 14

tcaggtcaga gtagcctgag ctaaaataac acattcag 38

<210> 15

15 <211> 828

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de repA

<220>

<221> CDS

5 <222> (1)..(828)

<223>

<400> 15

ES 2 355 973 T3

atg gta aag aac ccg aat ccg gtg ttc act ccc cgt gaa ggt gcc gga	48
Met Val Lys Asn Pro Asn Pro Val Phe Thr Pro Arg Glu Gly Ala Gly	
1 5 10 15	
acg ccg aag ttc cgc gaa aaa ccg atg gaa aag gcg gtg ggc ctc acc	96
Thr Pro Lys Phe Arg Glu Lys Pro Met Glu Lys Ala Val Gly Leu Thr	
20 25 30	
tcc cgt ttt gat ttc gcc att cat gtg gcg cat gcc cgt tcc cgt ggt	144
Ser Arg Phe Asp Phe Ala Ile His Val Ala His Ala Arg Ser Arg Gly	
35 40 45	
ctg cgt cgg cgc atg cca ccg gtg ctg cgt cga cgg gct att gat gcg	192
Leu Arg Arg Arg Met Pro Pro Val Leu Arg Arg Arg Ala Ile Asp Ala	
50 55 60	
ctg ctg cag ggg ctg tgt ttc cac tat gac ccg ctg gcc aac cgc gtc	240
Leu Leu Gln Gly Leu Cys Phe His Tyr Asp Pro Leu Ala Asn Arg Val	
65 70 75 80	
cag tgt tcc atc acc aca ctg gcc att gag tgc gga ctg gcg aca gag	288
Gln Cys Ser Ile Thr Thr Leu Ala Ile Glu Cys Gly Leu Ala Thr Glu	
85 90 95	
tcc ggt gca gga aaa ctc tcc atc acc cgt gcc acc cgg gcc ctg acg	336
Ser Gly Ala Gly Lys Leu Ser Ile Thr Arg Ala Thr Arg Ala Leu Thr	
100 105 110	
ttc ctg tca gag ctg gga ctg att acc tac cag acg gaa tat gac ccg	384
Phe Leu Ser Glu Leu Gly Leu Ile Thr Tyr Gln Thr Glu Tyr Asp Pro	
115 120 125	
ctt atc ggg tgc tac att ccg acc gac atc acg ttc aca ctg gct ctg	432
Leu Ile Gly Cys Tyr Ile Pro Thr Asp Ile Thr Phe Thr Leu Ala Leu	
130 135 140	
ttt gct gcc ctt gat gtg tct gag gat gca gtg gca gct gcg cgc cgc	480
Phe Ala Ala Leu Asp Val Ser Glu Asp Ala Val Ala Ala Ala Arg Arg	
145 150 155 160	
agt cgt gtt gaa tgg gaa aac aaa cag cgc aaa aag cag ggg ctg gat	528
Ser Arg Val Glu Trp Glu Asn Lys Gln Arg Lys Lys Gln Gly Leu Asp	
165 170 175	
acc ctg ggt atg gat gag ctg ata gcg aaa gcc tgg cgt ttt gtg cgt	576
Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Ile Ala Lys Ala Trp Arg Phe Val Arg	
180 185 190	

ES 2 355 973 T3

gag cgt ttc cgc agt tac cag aca gag ctt cag tcc cgt gga ata aaa	624
Glu Arg Phe Arg Ser Tyr Gln Thr Glu Leu Gln Ser Arg Gly Ile Lys	
195 200 205	
cgt gcc cgt gcg cgt cgt gat gcg aac aga gaa cgt cag gat atc gtc	672
Arg Ala Arg Ala Arg Arg Asp Ala Asn Arg Glu Arg Gln Asp Ile Val	
210 215 220	
acc cta gtg aaa cgg cag ctg acg cgt gaa atc tcg gaa gga cgc ttc	720
Thr Leu Val Lys Arg Gln Leu Thr Arg Glu Ile Ser Glu Gly Arg Phe	
225 230 235 240	
act gct aat ggt gag gcg gta aaa cgc gaa gtg gag cgt cgt gtg aag	768
Thr Ala Asn Gly Glu Ala Val Lys Arg Glu Val Glu Arg Arg Val Lys	
245 250 255	
gag cgc atg att ctg tca cgt aac cgc aat tac agc cgg ctg gcc aca	816
Glu Arg Met Ile Leu Ser Arg Asn Arg Asn Tyr Ser Arg Leu Ala Thr	
260 265 270	
gct tct ccc tga	828
Ala Ser Pro	
275	

<210> 16

<211> 275

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de repA

10

<400> 16

Gln Cys Ser Ile Thr Thr Leu Ala Ile Glu Cys Gly Leu Ala Thr Glu
 85 90 95

Ser Gly Ala Gly Lys Leu Ser Ile Thr Arg Ala Thr Arg Ala Leu Thr
 100 105 110

Phe Leu Ser Glu Leu Gly Leu Ile Thr Tyr Gln Thr Glu Tyr Asp Pro
 115 120 125

Leu Ile Gly Cys Tyr Ile Pro Thr Asp Ile Thr Phe Thr Leu Ala Leu
 130 135 140

Phe Ala Ala Leu Asp Val Ser Glu Asp Ala Val Ala Ala Ala Arg Arg
 145 150 155 160

Ser Arg Val Glu Trp Glu Asn Lys Gln Arg Lys Lys Gln Gly Leu Asp
 165 170 175

Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Ile Ala Lys Ala Trp Arg Phe Val Arg
 180 185 190

Glu Arg Phe Arg Ser Tyr Gln Thr Glu Leu Gln Ser Arg Gly Ile Lys
 195 200 205

Arg Ala Arg Ala Arg Arg Asp Ala Asn Arg Glu Arg Gln Asp Ile Val
 210 215 220

Thr Leu Val Lys Arg Gln Leu Thr Arg Glu Ile Ser Glu Gly Arg Phe
 225 230 235 240

Thr Ala Asn Gly Glu Ala Val Lys Arg Glu Val Glu Arg Arg Val Lys
 245 250 255

Glu Arg Met Ile Leu Ser Arg Asn Arg Asn Tyr Ser Arg Leu Ala Thr
 260 265 270

Ala Ser Pro
 275

<210> 17

<211> 172

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Elemento de ADN CIS

<400> 17

aagtgatctc ctcagaataa tccggcctgc gccggaggca tccgcacgcc tgaagcccgc 60
 cgtgacacaa aaaacagcg tcgcatgcaa aaaacaatct catcatccac cttctggagc 120

atccgattcc ccctgttttt aatacaaaat acgcctcagc gacggggaat tt 172

5 <210> 18

<211> 195

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> secuencia de ori

<400> 18

tgcttatcca catttaactg caagggactt ccccataagg ttacaaccgt tcatgtcata 60
 aagcgcagc cgccagtctt acagggtgca atgtatcttt taaacacctg tttatatctc 120
 cttaaacta ctttaattaca ttcatttaaa aagaaaacct attcactgcc tgtcctgtgg 180
 acagacagat atgca 195

15

<210> 19

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> Cebador

<400> 19

25 aattccccgt cgctgaggcg 20

<210> 20

<211> 20

<212> ADN

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 20
 cgtaagccgg tactgattga 20

5 <210> 21
 <211> 110
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Cebador

<400> 21
 cacaggaac aggatctacc atggccggaa aacctatccc aaaccctctc ctaggactgg 60
 attcaacggg gggaggagga tcagcggccg caactgatct tcaccaaacg 110

15
 <210> 22
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20
 <220>
 <223> Cebador

<220>

25 <221> característica miscelánea
 <222> (29)..(30)
 <223> n = a, g, c o t

<220>

30 <221> característica miscelánea
 <222> (32)..(33)
 <223> n = a, g, c o t

<220>

35 <221> característica miscelánea
 <222> (35)..(36)

<223> n = a, g, c o t

<220>

<221> característica miscelánea

5 <222> (38)..(39)

<223> n = a, g, c o t

<220>

<221> característica miscelánea

10 <222> (41)..(42)

<223> n = a, g, c o t

<220>

<221> característica miscelánea

15 <222> (44)..(45)

<223> n = a, g, c o t

<220>

<221> característica miscelánea

20 <222> (47)..(48)

<223> n = a, g, c o t

<220>

<221> característica miscelánea

25 <222> (50)..(51)

<223> n = a, g, c o t

<220>

<221> característica miscelánea

30 <222> (53)..(54)

<223> n = a, g, c o t

<220>

<221> característica miscelánea

35 <222> (56)..(57)

<223> n = a, g, c o t

<220>

<221> característica miscelánea

<222> (59)..(60)

<223> n = a, g, c o t

5

<220>

<221> característica miscelánea

<222> (62)..(63)

<223> n = a. g, c o t

10

<400> 22

cacacaggaa acaggatcta ccatggccnn bnnbnnbnnb nbnbnbnbn nbnbnbnbn 60
 bnnbggggga ggaggatcag cggccgcaac tgatcttcac caaacg 106

<210> 23

15

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

20

<223> Cebador

<400> 23

cagttgatcg gcgcgagatt 20

25

<210> 24

<211> 2390

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> construcción TAC-V5-REPA-CIS-ORI-408

<400> 24

cagttgatcg	gcgcgagatt	taatcgccgc	gacaatttgc	gacggcgcgt	gcagggccag	60
actggaggtg	gcaacgccaa	tcagcaacga	ctgtttgcc	gccagttggt	gtgccacgcg	120
gttgggaatg	taattcagct	ccgccatcgc	cgcttccact	tttcccgcg	tttcgcaga	180
aacgtggctg	gcctggttca	ccacgcggga	aacggtctga	taagagacac	cggcatactc	240
tgcgacatcg	tataacgtta	ctggtttcac	attcaccacc	ctgaattgac	tctcttcg	300
gcgctatcat	gccataccgc	gaaaggtttt	gcaccattcg	gctagcgatg	accctgctga	360
ttggttcgct	gaccatttcc	ggggtgcgga	acggcgttac	cagaaactca	gaaggttcgt	420
ccaaccaaac	cgactctgac	ggcagtttac	gagagagatg	atagggctctg	cttcagtaag	480
ccagatgcta	cacaattagg	cttgtaacata	ttgtcgttag	aacgcggcta	caattaatac	540
ataaccttat	gtatcataca	catacgattt	aggtgacact	atagaataca	agcttactcc	600
ccatccccct	gttgacaatt	aatcatggct	cgtataatgt	gtggaattgt	gagcggataa	660
caatttcaca	caggaaacag	gatctaccat	ggccggaaaa	cctatcccaa	accctctcct	720
aggactggat	tcaacggggg	gaggaggatc	agcggccgca	actgatcttc	accaaacgta	780
ttaccgccag	gtaaagaacc	cgaatccggt	gtttacacc	cgtgaagggtg	caggaacgct	840
gaagttctgc	gaaaaactga	tggaaaaggc	ggtgggcttc	acttcccgtt	ttgatttcgc	900
cattcatgtg	gcgcatgccc	gttcgcgtgg	tctgcgtcga	cgcatgccac	cagtgtcgcg	960
tcgacgggct	attgatgcgc	tcctgcaggg	gctgtgttcc	cactatgacc	cgctggccaa	1020
ccgcgtccag	tgctccatca	ccacgtggc	cattgagtgc	ggactggcga	cggagtctgc	1080
tgccggaâaa	ctctccatca	cccgtgccac	ccgggccctg	acgttcctgt	cagagctggg	1140
actgattacc	taccagacgg	aatatgacc	gcttatcggg	tgctacattc	cgaccgatat	1200
cacgttcaca	tctgcactgt	ttgtgcctt	cgatgtatca	gaggaggcag	tgccgcgcg	1260
gcgccgcagc	cgtgtggtat	gggaaaacaa	acaacgcaa	aagcaggggc	tgataccct	1320
gggcatggat	gaactgatag	cgaagcctg	gcgttttgtt	cgtgagcgtt	ttcgcagtta	1380
tcagacagag	cttaagtccc	ggggaataaa	gcgtgccctg	gcgcgtcgtg	atgcggacag	1440
ggaacgtcag	gatattgtca	ccctggtgaa	acggcagctg	acgcgcgaaa	tcgcggaagg	1500
gcgcttccct	gccaatcgtg	aggcggtaaa	acgcgaagt	gagcgtcgtg	tgaaggagcg	1560
catgattctg	tcacgtaacc	gtaattacag	ccggctggcc	acagcttccc	cctgaaagtg	1620
acctcctctg	aataatccgg	cctgcgccgg	aggcttccgc	acgtctgaag	cccgcagcgc	1680
cacaaaaaat	cagcaccaca	tacaaaaaac	aacctcatca	tccagcttct	ggtgcatccg	1740
gccccccctg	ttttcgatac	aaaacacgcc	tcacagacgg	ggaattttgc	ttatccacat	1800
taaactgcaa	gggacttccc	cataaggtta	caaccgttca	tgtcataaag	cgccatccgc	1860
cagcgttaca	gggtgcaatg	tatcttttaa	acacctgttt	atatctcctt	taaactactt	1920
aattacattc	atttaaaaag	aaaacctatt	cactgcctgt	cctgtggaca	gacagatatg	1980
cacctccac	cgcaagcggc	gggcccttac	cggagccgct	ttagttacaa	cactcagaca	2040
caaccaccag	aaaaaccccg	gtccagcgc	gaactgaaac	cacaaagccc	ctccctcata	2100
actgaaaagc	ggccccgccc	cggcccgaag	ggccggaaca	gagtcgcttt	taattatgaa	2160
tgttgtaact	acttcatcat	cgctgtcagt	cttctcgtctg	gaagttctca	gtacacgctc	2220
gtaagcggcc	ctgacggccc	gctaacgcgg	agatacggcc	cgacttcggg	taaaccctcg	2280
tcgggaccac	tccgaccgcg	cacagaagct	ctctcatggc	tgaaagcggg	tatgggtctgg	2340
cagggctggg	gatgggtaag	gtgaaatcta	tcaatcagta	ccggcttacg		2390

<210> 25

5 <211> 2384

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> construcción TAC-NNB-REPA-CIS-ORI-408

<220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (695)..(696)
 5 <223> n = a, g, c o t

<220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (698)..(699)
 10 <223> n = a, g, c o t

<220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (701)..(702)
 15 <223> n = a, g, c o t

<220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (704)..(705)
 20 <223> n = a, g, c o t

<220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (707)..(708)
 25 <223> n = a, g, c o t

<220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (710)..(711)
 30 <223> n = a, g, c o t

<220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (713)..(714)
 35 <223> n = a, g, c o t

<220>

<221> característica miscelánea

<222> (716)..(717)

<223> n = a, g, c o t

5 <220>

<221> característica miscelánea

<222> (719)..(720)

<223> n = a, g, c o t

10 <220>

<221> característica miscelánea

<222> (722)..(723)

<223> n = a, g, c o t

15 <220>

<221> característica miscelánea

<222> (725)..(726)

<223> n = a, g, c o t

20 <220>

<221> característica miscelánea

<222> (728)..(729)

<223> n = a, g, c o t

25 <400> 25

cagttgatcg	gcgcgagatt	taatcgccgc	gacaatttgc	gacggcgcgt	gcagggccag	60
actggaggty	gcaacgccaa	tcagcaacga	ctgtttgcc	gccagttgtt	gtgccacgcg	120
gttgggaatg	taattcagct	ccgccatcgc	cgcttccact	ttttcccgcg	ttttcgcaga	180
aacgtggctg	gcctggttca	ccacgcggga	aacggtctga	taagagacac	cggcatactc	240
tgcgacatcg	tataacgtta	ctggtttcac	attcaccacc	ctgaattgac	tctcttccgg	300
gcgctatcat	gccataccgc	gaaaggtttt	gcaccattcg	gctagcgatg	accctgctga	360
ttggttcgct	gaccatttcc	ggggtgcgga	acggcgttac	cagaaactca	gaaggttcgt	420
ccaaccaaac	cgactctgac	ggcagtttac	gagagagatg	atagggctctg	cttcagtaag	480
ccagatgcta	cacaattagg	ctgtacata	ttgtcgttag	aacgcggcta	caattaatac	540
ataaccttat	gtatcataca	catacgattt	aggtgacact	atagaataca	agcttactcc	600
ccatccccct	gttgacaatt	aatcatggct	cgtataatgt	gtggaattgt	gagcggataa	660
caatttcaca	caggaaacag	gatctaccat	ggccnbnbn	nbnbnbnbn	nbnbnbnbn	720
bnnbnbnbn	gggggaggag	gatcagcggc	cgcaactgat	cttcaccaa	cgtattaccg	780
ccaggtaaag	aaccggaatc	cggtgtttac	accccgta	ggtgcaggaa	cgctgaagtt	840
ctgcgaaaa	ctgatgaaa	aggcggtagg	cttcacttcc	cgttttgatt	tcgccattca	900
tgtggcgcac	gcccgttcgc	gtggtctgcg	tcgacgatg	ccaccagtgc	tgcgtcgacg	960
ggctattgat	gcgctcctgc	agggctgtg	tttccactat	gaccgctgg	ccaaccgctg	1020
ccagtgtctc	atcaccacgc	tggccattga	gtgcggactg	gcgacggagt	ctgctgccgg	1080
aaaactctcc	atcaccctg	ccaccggggc	cctgacgttc	ctgtcagagc	tgggactgat	1140
tacctaccag	acggaatatg	acccgcttat	cggtgtctac	attccgaccg	atatcacggt	1200
cacatctgca	ctgtttgctg	ccctcgatgt	atcagaggag	gcagtggccg	ccgcgcgccg	1260
cagccgtgtg	gtatgggaaa	acaaacaacg	caaaaagcag	gggctggata	ccctgggcat	1320
ggatgaactg	atagcgaag	cctggcggtt	tgttcgtgag	cgttttcgca	gttatcagac	1380
agagcttaag	tcccggggaa	taaagcgtgc	ccgtgcgcgt	cgatgatgcg	acaggggaacg	1440
tcaggatatt	gtcaccctgg	tgaaacggca	gctgacgcgc	gaaatcgcg	aagggcgctt	1500
cactgccaat	cgtgaggcgg	taaaacgcga	agttgagcgt	cggtgtgaag	agcgcacgat	1560
tctgtcacgt	aaccgtaatt	acagccggct	ggccacagct	tccccctgaa	agtgacctcc	1620
tctgaataat	ccggcctgcg	ccggaggctt	ccgcacgtct	gaagcccgc	agcgcacaaa	1680
aaatcagcac	cacatacaaa	aaacaacctc	atcatccagc	ttctgggtgca	tccggccccc	1740
cctgttttcg	atacaaaaca	cgcctcacag	acggggaatt	ttgcttatcc	acattaact	1800
gcaagggact	tcccataag	gttacaaccg	ttcatgtcat	aaagcggcat	ccgccagcgt	1860
tacagggtgc	aatgtatctt	ttaaacacct	gtttatatct	cctttaaact	acttaattac	1920
attcatttaa	aaagaaaacc	tattcactgc	ctgtcctgtg	gacagacaga	tatgcacctc	1980
ccaccgcaag	cggcgggccc	ctaccggagc	cgcttttagt	acaacactca	gacacaacca	2040
ccagaaaaac	cccgggtccag	cgcagaactg	aaaccacaaa	gcccctccct	cataactgaa	2100
aagcggcccc	gccccggccc	gaagggcccg	aacagagtcg	cttttaatta	tgaatgttgt	2160
aactacttca	tcatcgctgt	cagtcttctc	gctggaagtt	ctcagtacac	gctcgtaagc	2220
ggccctgacg	gcccgctaac	gcggagatac	gccccgactt	cgggtaaacc	ctcgtcggga	2280
ccactccgac	cgcgcacaga	agctctctca	tggctgaaag	cgggtatggt	ctggcagggc	2340
tggggatggg	taaggtgaaa	tctatcaatc	agtaccggct	tacg		2384

<210> 26

<211> 26

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador

	<400> 26	
	ccccatcccc ctgttgacaa ttaatc	26
5	<210> 27	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
10	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 27	
	ggtagatcct gttcctgtg tg	22
15	<210> 28	
	<211> 110	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
20	<220>	
	<223> Cebador	
	<220>	
25	<221> característica miscelánea	
	<222> (37)..(38)	
	<223> n = a, g, c o t	
	<220>	
30	<221> característica miscelánea	
	<222> (40)..(41)	
	<223> n = a, g, c o t	
	<220>	
35	<221> característica miscelánea	
	<222> (43)..(44)	
	<223> n = a, g, c o t	

<220>
<221> característica miscelánea
<222> (46)..(47)
5 <223> n = a, g, c o t

<220>
<221> característica miscelánea
<222> (49)..(50)
10 <223> n = a, g, c o t

<220>
<221> característica miscelánea
<222> (52)..(53)
15 <223> n = a, g, c o t

<220>
<221> característica miscelánea
<222> (55)..(56)
20 <223> n = a, g, c o t

<220>
<221> característica miscelánea
<222> (58)..(59)
25 <223> n = a, g, c o t

<220>
<221> característica miscelánea
<222> (61)..(62)
30 <223> n = a, g, c o t

<220>
<221> característica miscelánea
<222> (64)..(65)
35 <223> n = a, g, c o t

<220>

- <221> característica miscelánea

<222> (67)..(68)

<223> n = a, g, c o t
- 5 <220>

<221> característica miscelánea

<222> (70)..(71)

<223> n = a, g, c o t
- 10 <220>

<221> característica miscelánea

<222> (73)..(74)

<223> n = a, g, c o t
- 15 <220>

<221> característica miscelánea

<222> (76)..(77)

<223> n = a, g, c o t
- 20 <220>

<221> característica miscelánea

<222> (79)..(80)

<223> n = a, g, c o t
- 25 <220>

<221> característica miscelánea

<222> (82)..(83)

<223> n = a, g, c o t
- 30 <220>

<221> característica miscelánea

<222> (85)..(86)

<223> n = a, g, c o t
- 35 <220>

<221> característica miscelánea

<222> (88)..(89)

<223> n = a, g, c o t

<400> 28

acataaccgtc atgcggccgc tgatcctcct ccccccnnvn nvnvnnvn vnnvnnvnnv 60
 nnnvnnvn nvnvnnvn vnnvnnvng gccatgtag atcctgtttc 110

5

<210> 29

<211> 49

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Cebador

<400> 29

15

ctggagatgg catcaagggc cccaactgat ctcacccaaa cgtattacc 49

<210> 30

<211> 20

<212> ADN

20

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador

25

<400> 30

ggcgctatca tgccataccg 20

<210> 31

<211> 20

30

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador

35

<400> 31

accattcggc tagcgatgac 20

<210> 32
 <211> 33
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador

10

<400> 32
 ggtgaagatc agtgcggcc gctgatcctc ctc 33

<210> 33
 15 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 20 <223> Cebador

<400> 33
 gattggttcg ctgaccattt cc 22

25 <210> 34
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Cebador

<400> 34
 cggcgttacc agaaactcag a 21

35

<210> 35
 <211> 20

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Cebador

<400> 35
 aaccgactct gacggcagtt 20

10 <210> 36
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Péptido

<400> 36
 Cys Gly Cys Pro Thr Met Ala Ala Arg Val Arg Pro Val Leu Asn Ser
 1 5 10 15
 Lys His

20 <210> 37
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Péptido

<400> 37
 Met Thr Thr Val Pro Val Leu Met Ile Ser Val
 1 5 10

30 <210> 38
 <211> 18
 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido

5

<400> 38

Thr Leu Ser Thr Arg His His Asn Val Ile Asp Arg Phe Asn Leu Arg
 1 5 10 15

Asn Phe

<210> 39

10

<211> 18

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15

<223> Péptido

<400> 39

Ser Ile Arg Thr Leu Thr Gly Ser Thr Pro Ala Gln Phe Asp Ala Thr
 1 5 10 15

Ala Asp

20

<210> 40

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Péptido

<400> 40

Ala Asn Leu Trp Arg Ile Val Leu His Gly Trp Trp
 1 5 10

<210> 41

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> Péptido

<400> 41

10 Val Ser Phe Met Leu Leu Gly Pro His Arg His Arg
1 5 10

<210> 42

<211> 11

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido

20 <400> 42

Leu Val Leu His Trp Leu Ser Leu Gly Ser Arg
1 5 10

<210> 43

<211> 12

25 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido

30

<400> 43

Ser Asn Gln Val Val Leu Ile Leu His Leu Arg Pro
1 5 10

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador

5

<400> 47

gtagcactct tcctcgagcg ggggggagga ggatcaactg atctcacca aac53

<210> 48

10

<211> 42

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15

<223> Cebador

<400> 48

ctaggtcct gactcctgca gcatggtaga tcctgttcc tg 42

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir una genoteca de expresión de péptidos in vitro que comprende una pluralidad de péptidos, donde cada péptido está unido al constructo de ADN que codifica el péptido, que comprende las etapas de:
- 5 (a) proporcionar un constructo de ADN que comprende:
- (i) una secuencia de ADN diana;
- (ii) ADN que codifica un péptido miembro de la genoteca; y
- (iii) ADN que codifica un péptido capaz de unirse no covalentemente
- 10 directamente o indirectamente a dicha secuencia diana de ADN de (i); donde dichos constructo de ADN y proteína codificada se seleccionan para que tengan actividad cis
- (b) expresar una pluralidad de constructos de ADN de acuerdo con (a)
- donde dichos constructos de ADN codifican una pluralidad de péptidos miembros de la genoteca de manera que cada péptido expresado está unido no covalentemente al ADN a partir del cual fue producido.
- 15 2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicho constructo de ADN comprende adicionalmente:
- (iv) un elemento de ADN que dirige la actividad cis.
3. Un método de acuerdo con la reivindicación 2, donde dicho constructo de ADN de (a) comprende adicionalmente
- 20 (v) ADN que codifica un fragmento que comprende al menos los 20 aminoácidos C-terminales de una proteína repA donde dicho fragmento es capaz de interactuar con dicho elemento de ADN de (iv);
- donde dicho elemento de ADN de (iv) está localizado 3' con respecto a dicho ADN de (ii), (iii) y (v).
- 25 4. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el péptido codificado por dicho ADN de (iii) es capaz de reconocer y unirse directamente a dicha secuencia diana de ADN de (i).
5. Un método de acuerdo con la reivindicación 4, donde el péptido codificado por dicho ADN de (iii) es una proteína repA y donde dicha secuencia diana de ADN de (i) es ori.
- 30 6. Un método de acuerdo con la reivindicación 4 o 5, donde dicho ADN de (ii) está conectado a dicho ADN de (i) y (iii) mediante digestión con enzimas de restricción y ligación.
7. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6, donde dicho repA se selecciona entre repA de los plásmidos complejos IncI y repA de los plásmidos IncF, IncB, IncK, IncZ y IncL/M.
8. Un método de acuerdo con la reivindicación 5, donde dicho constructo de ADN comprende la secuencia que codifica repA, el elemento de ADN cis y el ADN ori del plásmido RI de IncFII.
- 35 9. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde dicha proteína repA tiene la secuencia dada en el SEQ ID NO: 16 y donde dicho elemento de ADN cis tiene la secuencia dada en el SEQ ID NO: 17.
10. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde el ADN no unido por el péptido codificado por dicho ADN de (iii) es unido por una proteína de unión a ADN no específica.
- 40 11. Un método de acuerdo con la reivindicación 4, donde el péptido codificado por dicho ADN de (iii) es un dominio de unión a ADN del receptor de estrógeno y donde dicha secuencia diana de ADN de (i) es una secuencia diana del receptor de estrógeno.
12. Un método de acuerdo con la reivindicación 9, donde dicho dominio de unión a ADN comprende los aminoácidos 176 a 282 del fragmento de unión a ADN del receptor de estrógeno y donde dicha secuencia diana de ADN comprende la secuencia diana del receptor de estrógeno dada en el SEQ ID NO: 14.
- 45 13. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, 2 o 3, donde el péptido codificado por dicho ADN de (iii) se une indirectamente a dicha secuencia diana de ADN de (i) por medio de un agente, donde dicho

- agente se une a dicha secuencia diana de ADN de (i) y donde dicho agente también se une al péptido codificado por dicho ADN de (iii).
- 5 14. Un método de acuerdo con la reivindicación 13, donde dicha secuencia diana de ADN comprende una etiqueta de ADN susceptible de ser unida por dicho agente, seleccionándose opcionalmente dicha etiqueta entre biotina y fluoresceína.
- 15 15. Un método de acuerdo con la reivindicación 13 o 14, donde las actividades de unión de dicho agente son conferidas por medio de dos anticuerpos o sus fragmentos.
16. Un método de acuerdo con la reivindicación 15, donde una o ambas de dichas actividades de unión son conferidas por medio de un fragmento Fab.
- 10 17. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 16, donde dicho agente se proporciona antes de la etapa (b).
18. Un método de acuerdo con la reivindicación 13, donde dicho agente es unido a dicha secuencia diana de ADN de (i) y es capaz de unirse al péptido codificado por dicho ADN de (iii).
19. Un método de acuerdo con la reivindicación 18, donde dicho agente es un polímero.
- 15 20. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde dicho ADN está bajo el control de secuencias promotoras y de traducción adecuadas para permitir la transcripción y la traducción *in vitro*.
21. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde dicho péptido miembro de la genoteca es un anticuerpo o uno de sus fragmentos.
- 20 22. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde dicha genoteca comprende al menos 10^4 moléculas.
23. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde dicha expresión se lleva a cabo en presencia de un compuesto que evita la actividad nucleasa, o reduce las interacciones ADN-proteína o proteína-proteína no específicas.
- 25 24. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde dicha expresión se lleva a cabo en un entorno de transcripción/traducción bacteriano acoplado.
25. Un método de acuerdo con la reivindicación 24, donde dicho entorno de transcripción/traducción bacteriano acoplado es el sistema del extracto S30.
- 30 26. Un método para producir una genoteca de expresión de péptidos *in vitro* que comprende una pluralidad de péptidos, donde cada péptido está conectado al constructo de ADN que codifica el péptido, que comprende las etapas de:
- (a) proporcionar un constructo de ADN que comprende:
- (i) ADN que codifica un péptido miembro de la genoteca; y
- (ii) ADN que codifica un péptido capaz de unirse a un agente;
- 35 donde dicho constructo de ADN y proteína codificada se seleccionan para que tengan actividad *cis*;
- (b) unir dicho agente o una etiqueta de ADN capaz de unir un agente a dicho constructo de ADN de (a), donde dicho agente es capaz de unirse al péptido codificado por dicho ADN de (ii); y
- 40 (c) expresar una pluralidad de constructos de ADN de acuerdo con (b),
- donde dichos constructos de ADN codifican una pluralidad de péptidos miembros de la genoteca de manera que cada péptido expresado esté conectado por medio de dicho agente al ADN a partir del cual fue producido.
- 45 27. Un método de identificación y/o purificación de un péptido que muestra las propiedades deseadas a partir de una genoteca de expresión de péptidos *in vitro* producida de acuerdo con el método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende al menos las etapas de (a) escrutar dicha genoteca y (b) seleccionar y aislar el miembro de la genoteca relevante.

28. Un método de identificación de un péptido de unión a un ligando específico, comprendiendo dicho método al menos las etapas de (a) escrutar una genoteca de expresión de péptidos *in vitro* producida de acuerdo con el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 26 con moléculas de ligando que están opcionalmente unidas a un soporte sólido; (b) seleccionar y aislar un miembro de la genoteca que se une a dicha molécula de ligando; y (c) aislar el péptido que se une específicamente a dicha molécula de ligando.
29. Un método de acuerdo con la reivindicación 27 o 28, donde dichos péptidos miembros de la genoteca son anticuerpos o sus fragmentos.
30. Un método de identificación y/o purificación de un péptido que tiene la capacidad de unirse a una secuencia diana de ADN específica que comprende al menos las etapas de
- (a) proporcionar una genoteca de expresión *in vitro* de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 26, donde el péptido codificado por el ADN de (iii) es un péptido miembro de la genoteca que tiene actividad de unión a ADN y donde dicha secuencia diana de ADN de (i) es la secuencia diana de interés;
- (b) seleccionar y aislar un miembro de la genoteca en el que la proteína codificada se une a dicha secuencia diana; y
- (c) aislar el péptido que se une a dicha secuencia diana.
31. Un método de acuerdo con la reivindicación 30, donde dichos péptidos miembros de la genoteca son proteínas en dedo de cinc, proteínas hélice-bucle-hélice o proteínas hélice-giro-hélice.
32. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 27 a 31, donde dicha etapa de escrutinio y/o selección se lleva a cabo en presencia de un compuesto que evita la actividad nucleasa o reduce las interacciones ADN-proteína o proteína-proteína no específicas.
33. Un método de acuerdo con la reivindicación 32, donde dicho compuesto es la heparina.
34. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 27 a 33, donde adicionalmente el ADN que expresa dicho péptido aislado es aislado.
35. Un método de acuerdo con la reivindicación 34, que comprende adicionalmente clonar dicho ADN en un vector de expresión.
36. Un método de acuerdo con la reivindicación 35, que comprende adicionalmente introducir dicho vector de expresión en una célula *in vitro*.
37. Un método de acuerdo con la reivindicación 35 o 36, que comprende adicionalmente expresar el péptido codificado por dicho ADN.
38. Una genoteca de expresión de péptidos *in vitro* producida de acuerdo con el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 26.
39. Un constructo de ADN como se describe en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 26.
40. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 30, donde dichos péptidos o péptidos miembros de la genoteca están anclados a polietilenglicol.

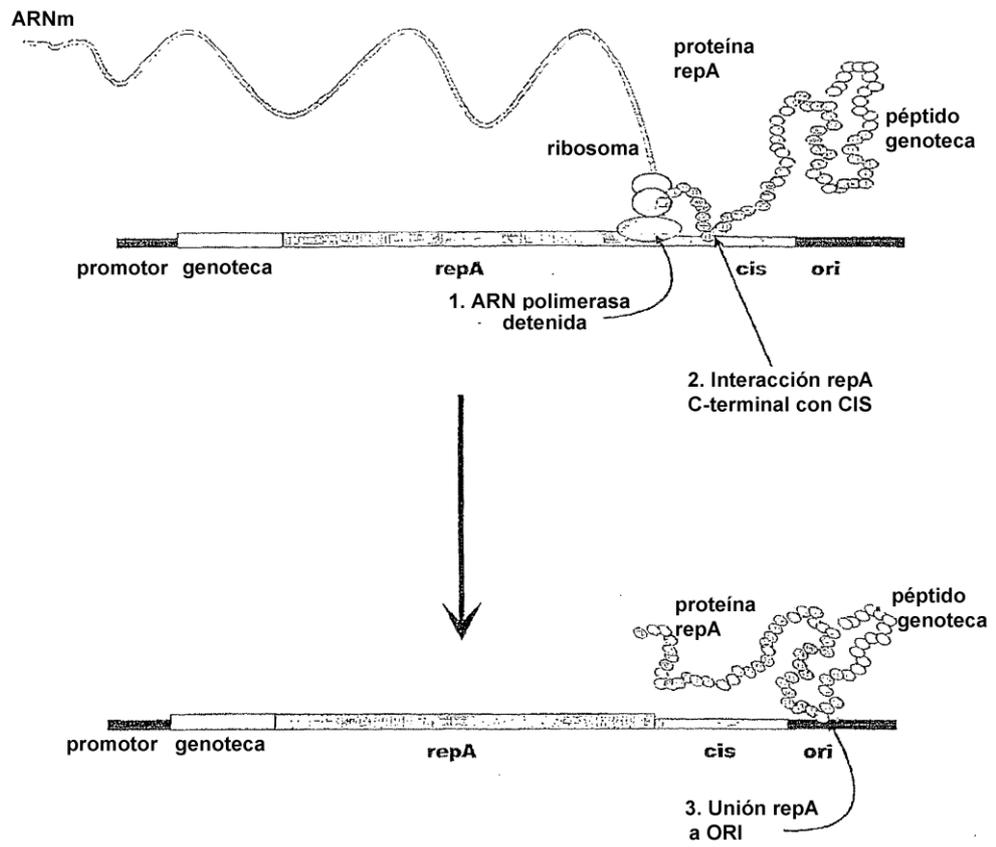


Figura 1

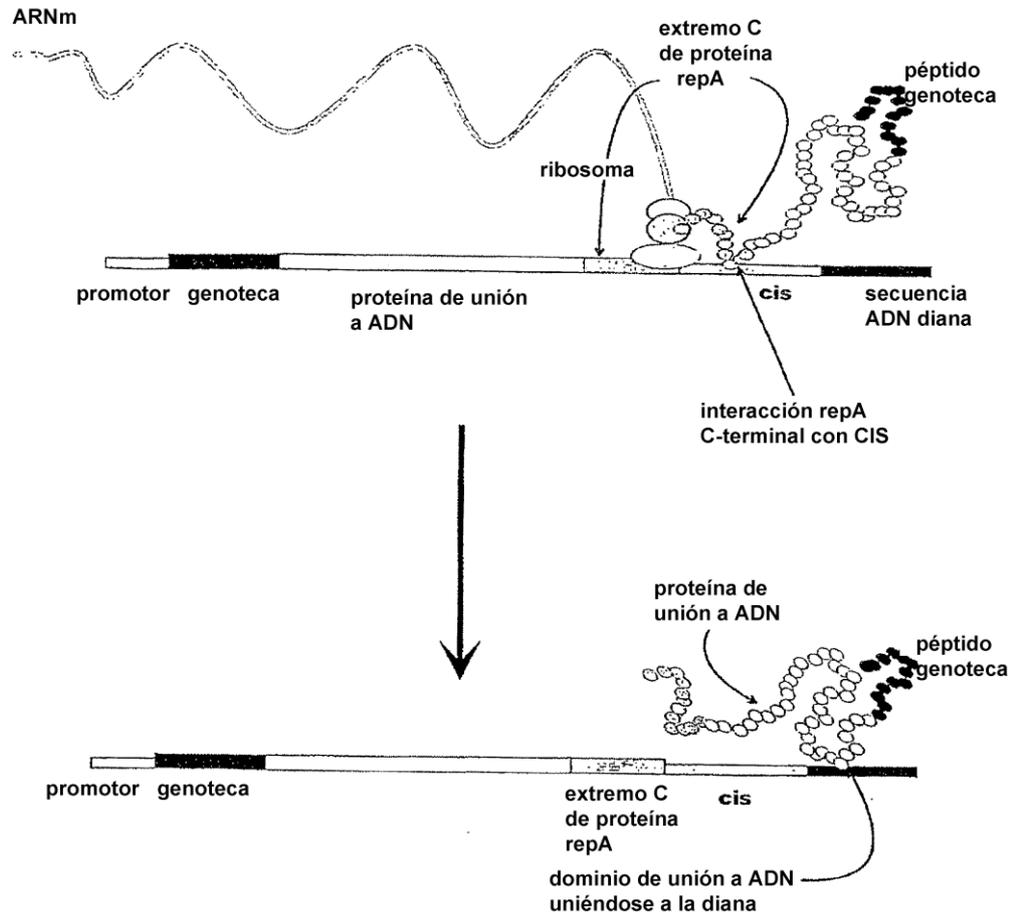


Figura 2

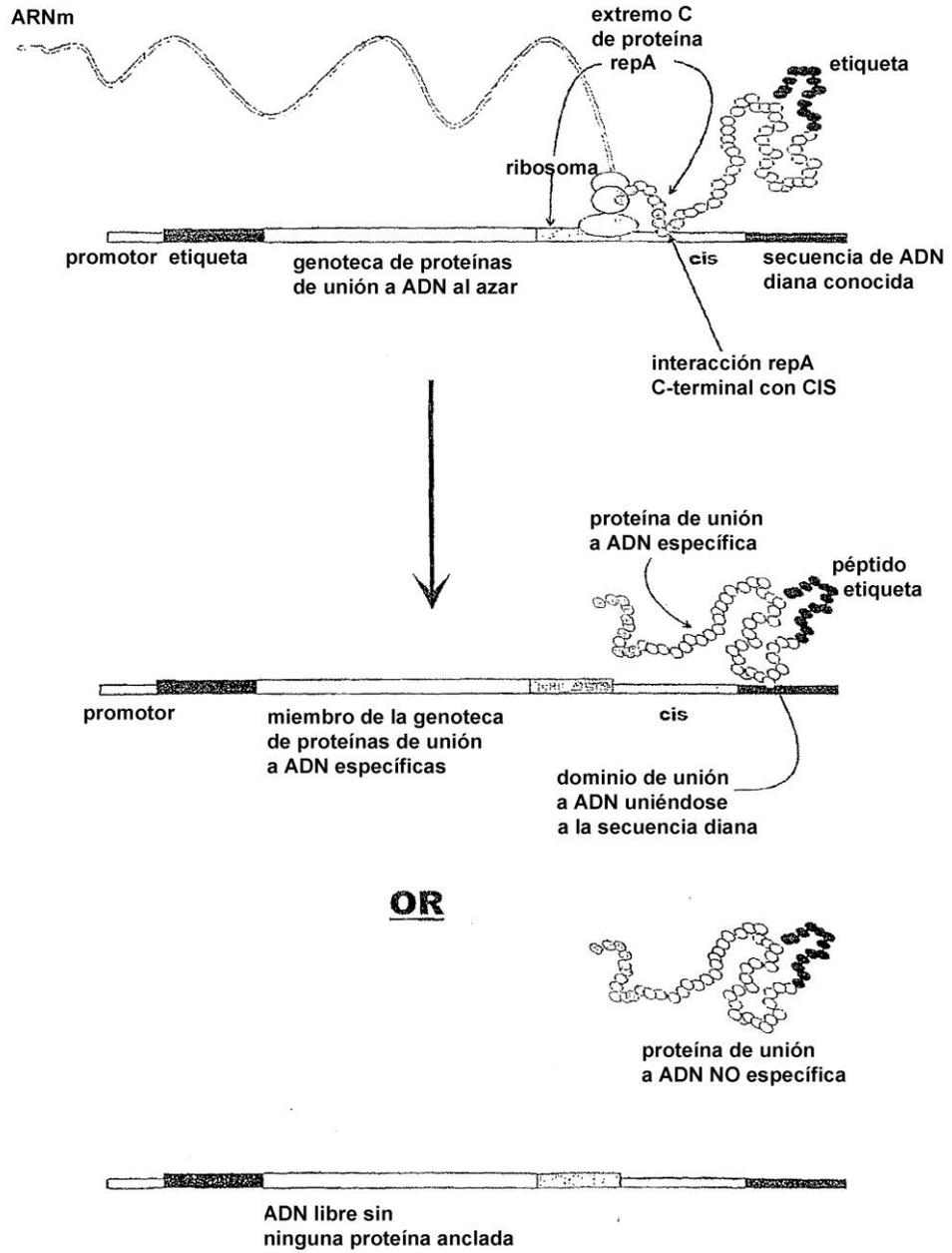


Figura 3

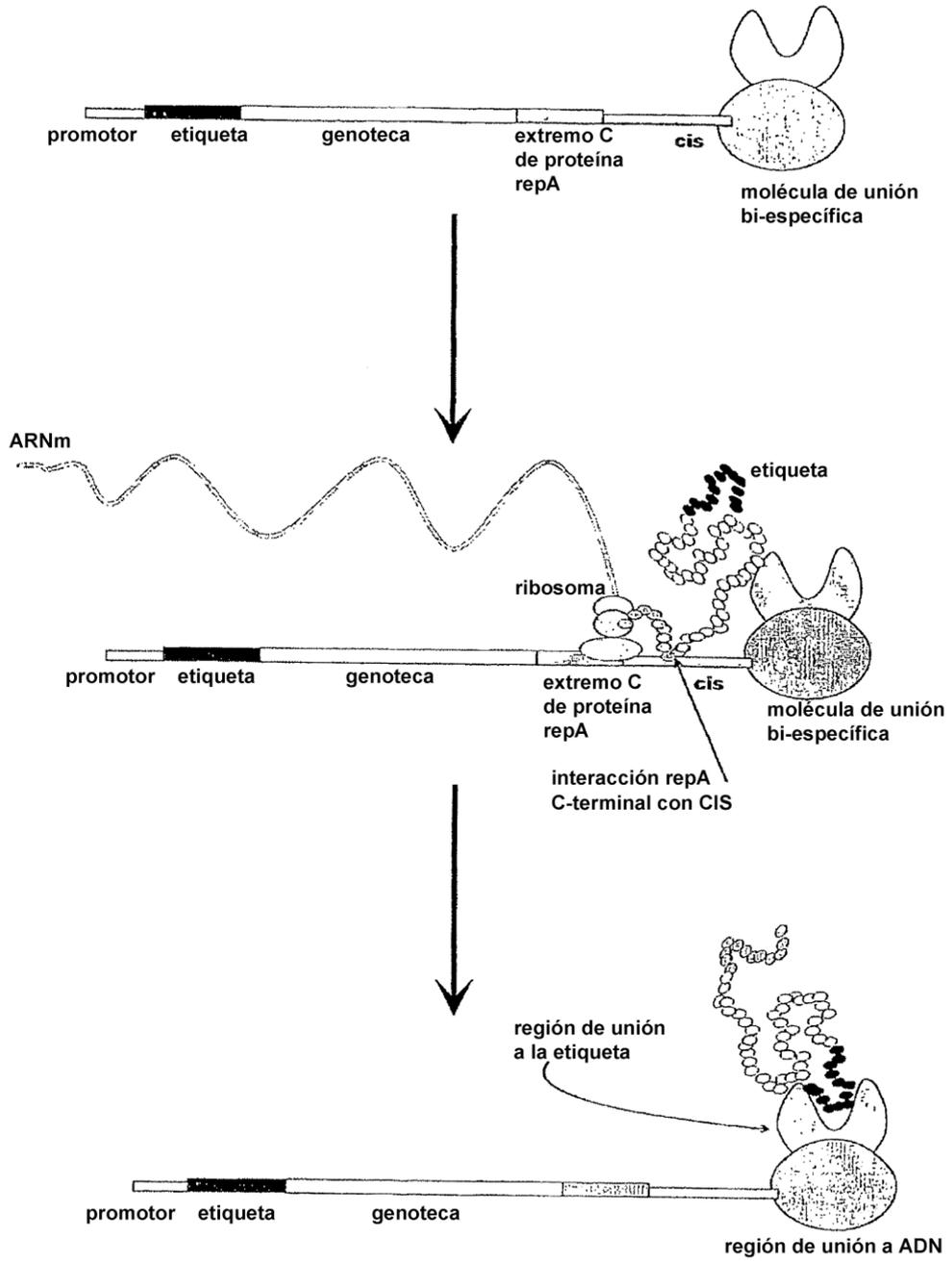


Figura 4

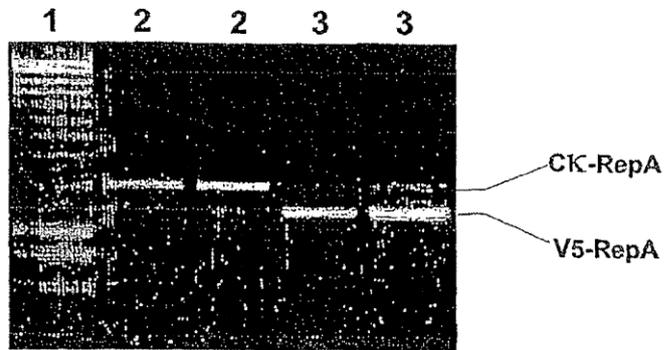


Figura 5

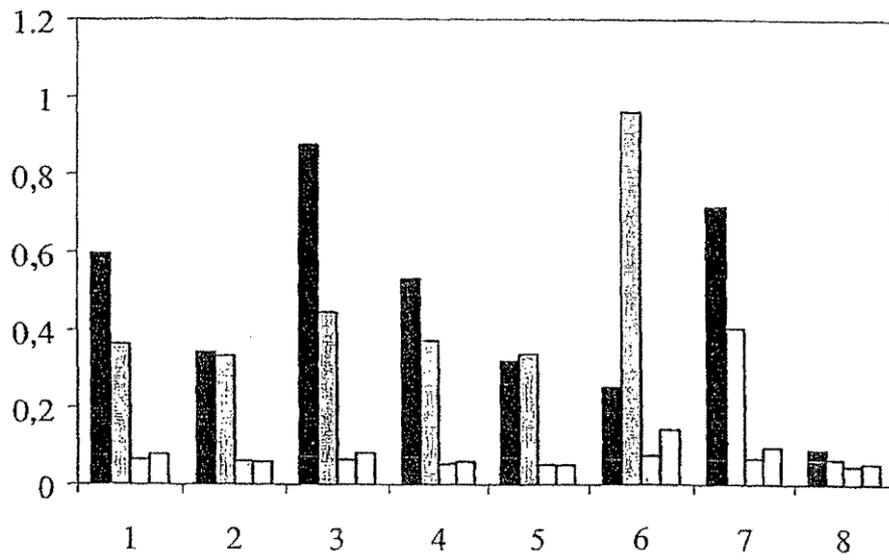


Figura 6

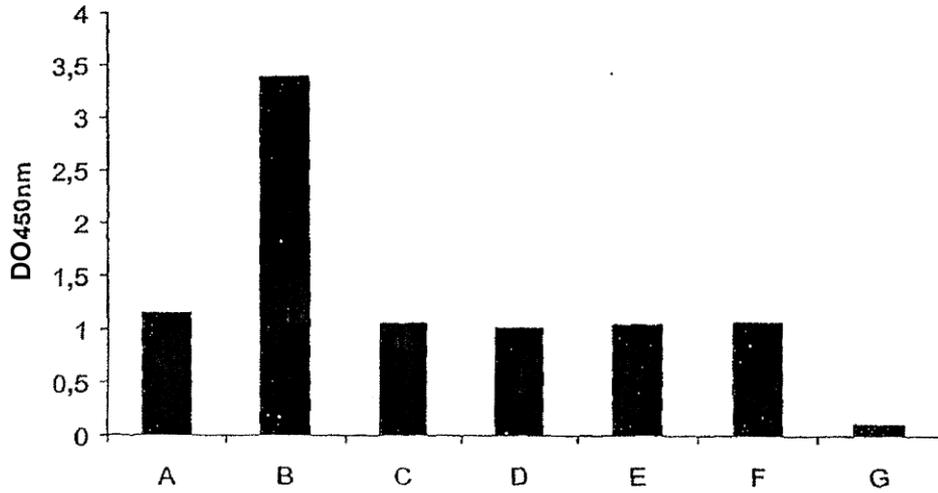


Figura 7

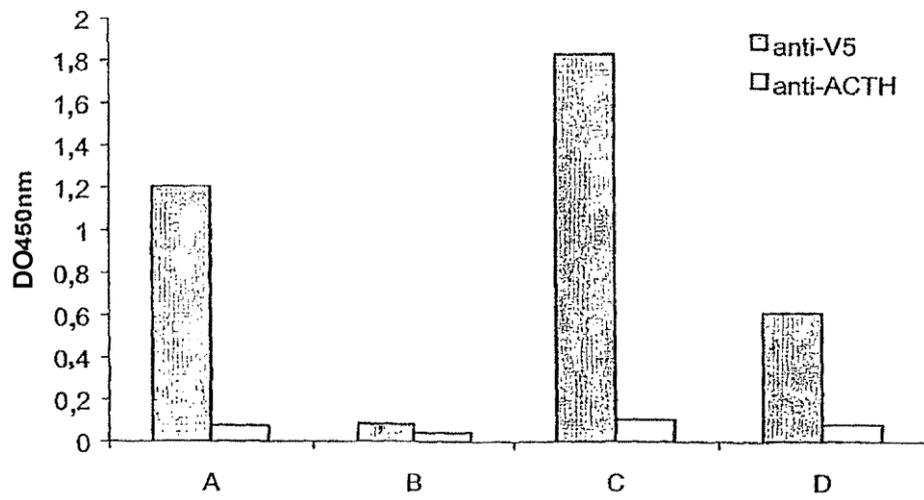


Figura 8

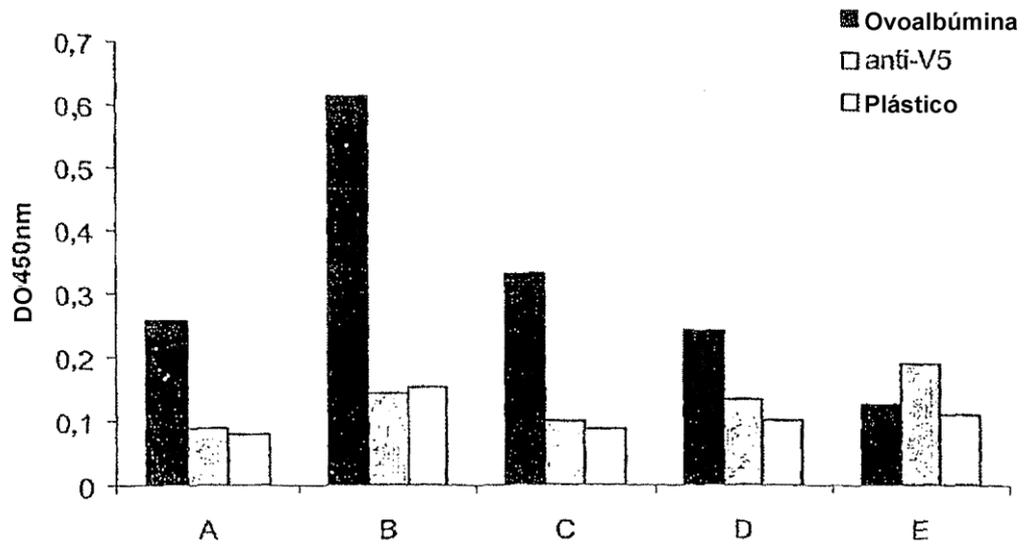


Figura 9

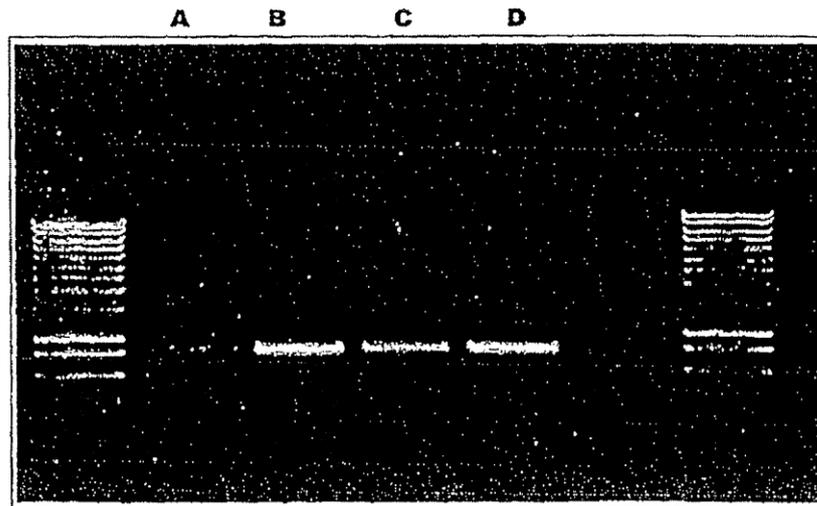


Figura 10