

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 583 277**

51 Int. Cl.:

**C07K 7/08** (2006.01)

**G01N 33/20** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.07.2009 E 09772193 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.04.2016 EP 2313425**

54 Título: **Péptidos de unión a materiales inorgánicos**

30 Prioridad:

**04.07.2008 US 78348 P**

**20.08.2008 US 90300 P**

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

**20.09.2016**

73 Titular/es:

**UNIVERSITE DE LIEGE INTERFACE  
ENTREPRISES UNIVERSITE (33.0%)**

**Avenue Pré-Aily 4**

**4031 Angleur, BE;**

**SYMBIOSE BIOMATERIALS S.A. (33.0%) y**

**GESVAL S.A. (33.0%)**

72 Inventor/es:

**VREULS, CHRISTELLE;**

**VAN DE WEERDT, CÉCILE;**

**ARCHEMBEAU, CATHERINE;**

**RENARD, ANDRÉ y**

**MARTIAL, JOSEPH**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 583 277 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Péptidos de unión a materiales inorgánicos

La presente invención se refiere a un método para el aislamiento de partículas de polvo que comprende una entidad inorgánica de interés a partir de una mezcla de partículas de polvo. Además, la presente invención se refiere a péptidos de unión a materiales inorgánicos que comprenden la secuencia de aminoácidos MTWDPSLASPRS (SEQ ID NO: 31) y la secuencia de aminoácidos LNAAVPFTMAGS (SEQ ID NO: 32), respectivamente.

El emergente campo de los materiales biomiméticos constituye una de las tecnologías más importantes del siglo XXI. Los materiales biomiméticos tratan de replicar e imitar materiales inorgánicos y orgánicos, así como procesos biológicos. Una mejor comprensión de cómo los organismos vivos producen minerales y compuestos asegura la creación de nuevos procesos industriales. En este contexto, los materiales se pueden fabricar de manera mucho más precisa y eficaz, dando como resultado nuevas funcionalidades y un mayor rendimiento. Por ejemplo, la observación de que los organismos utilizan proteínas o péptidos para el control de la nucleación, el ensamblaje y la arquitectura de las fases inorgánicas ha abierto la puerta a nuevas aplicaciones. De hecho, los péptidos de unión a materiales inorgánicos podrían ser utilizados como juegos de construcción moleculares para dirigir el ensamblaje de materiales híbridos con control de la composición y la topografía. Con el objetivo de ampliar estas propiedades de los péptidos de unión a materiales inorgánicos a materiales seleccionados de interés, se han dirigido muchos esfuerzos a la identificación de péptidos pequeños que se unen con alta afinidad a materiales inorgánicos. Estos péptidos se denominan GEPI (por sus siglas en inglés) para "polipéptidos modificados mediante ingeniería genética para materiales inorgánicos". Se definen como una secuencia de aminoácidos que se une específica y selectivamente a una superficie inorgánica. Considerando que los mecanismos moleculares de reconocimiento de péptidos y la unión a materiales sólidos no son bien entendidos, algunos estudios mostraron que la unión se rige en gran medida por la interacción electrostática. Para los péptidos de unión a titanio por ejemplo, se ha demostrado que la unión específica se debe a enlaces dobles electrostáticos entre los residuos de aminoácidos cargados y los grupos de la superficie del sustrato (Chen, 2006).

Una ventaja de los péptidos de unión a materiales inorgánicos es su alta especificidad que depende de (i) la composición química, (ii) la estructuración (polvo o superficie plana) y (iii) la forma cristalográfica del sustrato diana inorgánico. Esta especificidad les confiere propiedades interesantes y ya se han puesto de relieve diversas aplicaciones (Tamerler, 2007). Los péptidos de unión a materiales inorgánicos muestran características útiles y podrían ser utilizados como constructores moleculares para dirigir el montaje de materiales híbridos con control de la composición y la topografía. Se han destacado varias aplicaciones. Por ejemplo, los virus modificados parecen ser muy útiles como moldes para la nanoestructuración de nanocables (Mao, 2003). La fusión genética de estos péptidos de unión a materiales inorgánicos a proteínas funcionales permite su utilización como conectores para muchas aplicaciones bio-nanotecnológicas o microelectrónicas (Brown, 1997, Tamerler, 2007, Whaley, 2000). Los péptidos de unión a materiales inorgánicos también se pueden utilizar para la inmovilización auto-orientada de enzimas con conservación de su actividad enzimática. Una repetición de cinco veces de péptido de unión de oro se ha fusionado a la enzima fosfatasa alcalina. La enzima bifuncional resultante es auto-inmovilizada a continuación, cubriendo homogéneamente el sustrato de oro. La utilización de la capacidad de los GEPI para unirse selectivamente a un sustrato inorgánico específico podría permitir también el desarrollo de un nuevo fago de virus y plataformas de clasificación celular utilizando sustratos micromodelados (Dincer). Schembri también pone de relieve el uso de péptidos de unión a materiales inorgánicos como agentes de biosorción para la eliminación de metales tóxicos o preciosos del entorno (Schembri, 1999).

El documento WO 2007/081942 proporciona composiciones y métodos para un recubrimiento mejorado para dispositivos médicos. El documento WO 03/078541 describe material para dispositivos electroluminiscentes orgánicos y dispositivos electroluminiscentes orgánicos realizados mediante el uso del mismo. El documento US 2002/142471 describe un método para identificar un contaminante de óxido metálico sobre un sustrato basado en la unión de un activador fluorescente al óxido metálico. El documento WO 86/00031 describe un método de separación de partículas basado en diferentes grados de fricción contra una superficie.

La presente invención proporciona métodos como los definidos en las reivindicaciones adjuntas que dependen de las características anteriores de los péptidos de unión a materiales inorgánicos. Además, la invención proporciona nuevos péptidos que se unen específicamente a ciertos sustratos inorgánicos.

Se describe en la presente memoria en un primer aspecto un método que utiliza los péptidos de unión a materiales inorgánicos como herramientas de control de calidad para la detección de defectos sobre superficies inorgánicas de cualquier forma. Una realización del método de control de calidad incluye la caracterización de una superficie inorgánica en una línea de producción, y no la eliminación de la superficie inorgánica que va a ser caracterizada de la línea de producción. El método puede incluir la inmersión de una superficie inorgánica en una solución de péptido y la observación de la superficie bajo fluorescencia. Una superficie inorgánica recubierta con un péptido de unión puede ser visualizada a simple vista con una simple lámpara fluorescente o mediante análisis microscópico bajo fluorescencia.

En particular, este aspecto se refiere a un método para la identificación de defectos o inhomogeneidades sobre una

superficie mediante la detección de una entidad inorgánica de interés, que comprende las etapas de:

(a) poner en contacto la superficie con un péptido de unión a materiales inorgánicos que porta un marcador detectable y que es capaz de unirse específicamente a la entidad inorgánica de interés;

(b) eliminar el péptido no unido; y

5 (c) detectar el péptido que queda sobre la superficie.

La presente invención incluye un método de aislamiento de polvos a partir de mezclas en polvo. Por ejemplo, una realización de este aspecto de la invención incluye un método de clasificación de polvos, especialmente nanopolvos, en donde un nanopolvo se pone en contacto con un péptido de unión a materiales inorgánicos y se clasifica mediante al menos uno de la composición química, la morfología, o la forma cristalográfica.

10 Un método que incorpora este aspecto de la invención es un método para el aislamiento de partículas de polvo que comprende una entidad inorgánica de interés a partir de una mezcla de partículas de polvo, que comprende las etapas de:

(a) poner en contacto el polvo con un péptido de unión a materiales inorgánicos capaz de unirse específicamente a la entidad inorgánica de interés,

15 y

(b) aislar las partículas de polvo a las cuales se ha unido el péptido de unión a materiales inorgánicos.

La presente invención también incluye nuevos péptidos de unión a materiales inorgánicos. Los nuevos péptidos de unión a materiales inorgánicos de la invención incluyen un péptido de unión a acero inoxidable MTWDPSLASPRS (SEQ ID NO: 31) y un péptido de unión a TiO<sub>2</sub> LNAAVPFTMAGS (SEQ ID NO: 32).

## 20 Descripción detallada de la invención

El término "péptido de unión a materiales inorgánicos", según se utiliza en la presente memoria, se refiere a péptidos que específicamente se unen a/interactúan con una entidad inorgánica que se caracteriza por su composición química, morfología, o forma cristalográfica. Se entiende que el término "péptido de unión a materiales inorgánicos" incluye péptidos de origen natural que tienen la capacidad para, de manera selectiva, unirse a/interactuar con, un material inorgánico, así como péptidos producidos sintéticamente, tales como péptidos modificados mediante ingeniería genética para materiales inorgánicos (GEPI), que pueden ser seleccionados, por ejemplo, a través de evolución dirigida y por medio de bibliotecas de péptidos basadas en biología combinatoria, y que pueden haber sufrido modificaciones posteriores a la selección a través de ingeniería genética.

Los péptidos de unión a materiales inorgánicos descritos en el contexto de la invención son capaces de unirse específicamente a, o interactuar específicamente con, una entidad inorgánica de interés, en particular entidades que son accesibles en la superficie de materiales inorgánicos o superficies que comprenden materiales inorgánicos. El término "unirse específicamente a o interactuar específicamente con" según se utiliza de acuerdo con la presente invención significa que el péptido de unión a materiales inorgánicos no, o esencialmente no, reacciona de forma cruzada con otras entidades inorgánicas. La reactividad cruzada de un panel de péptidos de unión a materiales inorgánicos objeto de investigación se puede someter a ensayo, por ejemplo, mediante la evaluación de la unión de dicho panel de péptidos de unión a materiales inorgánicos en condiciones convencionales a la estructura de la superficie inorgánica de interés, así como a diversas estructuras de superficie inorgánica más o menos estrechamente relacionadas (estructuralmente y/o funcionalmente). Sólo aquellos péptidos de unión a materiales inorgánicos que se unen a la entidad inorgánica de interés, pero no se unen o esencialmente no se unen a cualquiera de las otras estructuras superficiales inorgánicas se consideran específicos para la entidad inorgánica de interés y por lo tanto son péptidos de unión a materiales inorgánicos de acuerdo con esta invención. La unión específica del péptido de unión a materiales inorgánicos a la entidad inorgánica de interés es típicamente el resultado de una compleja combinación de fuerzas de interacción de largo y corto alcance, así como una contribución de la estructura y la disposición espacial del péptido sobre la capa superior de una superficie inorgánica o una superficie que comprende un material inorgánico.

El péptido de unión a materiales inorgánicos es generalmente un péptido neutro, preferiblemente neutralizado en su extremo C-terminal. La neutralización del péptido de unión a materiales inorgánicos se puede llevar a cabo mediante cualquiera de los procedimientos de neutralización conocidos en la técnica. En una realización más preferida, la neutralización se lleva a cabo mediante amidación, p. ej., mediante reacción con una amida, preferiblemente una alquilamida, para formar un grupo tal como -CONHR o esterificación, p. ej., con alcoholes alquílicos, para formar un grupo -COOR. En una realización aún más preferida, la neutralización se consigue mediante amidación.

Ventajosamente, los métodos de acuerdo con la invención se pueden llevar a cabo sin trabajar con fagos después de que los péptidos de unión a materiales inorgánicos adecuados hayan sido identificados, evitando así, p. ej., la dispersión generalizada de fagos. Esta es una de las ventajas que permiten una aplicación a gran escala de los

métodos de acuerdo con la invención en un contexto industrial.

Como se señaló anteriormente, se describe en la presente memoria en un primer aspecto un método para la identificación de defectos y/o inhomogeneidades en una superficie mediante la detección de una entidad inorgánica de interés, que comprende las etapas de:

- 5 (a) poner en contacto la superficie con un péptido de unión a materiales inorgánicos que porta un marcador detectable y que es capaz de unirse específicamente a la entidad inorgánica de interés;
- (b) eliminar el péptido no unido; y
- (c) detectar el péptido que queda sobre la superficie.

10 El método contemplado en este aspecto es típicamente un método de control de calidad, en particular, control de calidad de superficie. El método permite un control conveniente de la preparación de la superficie (es decir, si una superficie se ha preparado correctamente), control de la calidad de la superficie o control de la calidad de un recubrimiento sobre una superficie. Por lo tanto, el método puede ser un método de control de calidad, ya que se utiliza como una etapa en la producción de materiales inorgánicos. Es útil, p. ej., en la producción de metales o productos elaborados de metales, tales como acero incluyendo acero inoxidable, u otras diversas aleaciones.

15 También es útil en el contexto de la producción de recubrimientos para materiales inorgánicos o recubrimientos inorgánicos para diversos materiales, p. ej., en la producción de microelectrónica o nanosensores, o para pintura de superficies, p. ej., en la industria del automóvil.

Como un ejemplo específico, el método permite examinar si la limpieza de una superficie se ha llevado a cabo correctamente. En el caso de la superficie de acero galvanizado, por ejemplo, un péptido de unión a materiales inorgánicos de unión a ZnO puede detectar si la etapa de limpieza alcalina previa se ha realizado correctamente y ha eliminado la capa de alúmina no deseada. Las zonas donde no se ha unido el péptido y no puede ser detectado en la superficie indican que la alúmina se mantiene en la superficie del acero galvanizado.

20

Convenientemente, el método se puede poner en práctica como un método en línea que forma parte de un proceso de producción o recubrimiento, es decir, los productos que deben someterse al método no tienen que ser retirados de la línea de producción/recubrimiento.

25

El término "defectos" incluye, sin ser limitante, las impurezas que pueden estar presentes en una superficie o impurezas incorporadas a una superficie, p. ej., defectos en la composición química de un material que proporciona la superficie bajo consideración. Las inhomogeneidades incluyen distribuciones inhomogéneas de una entidad inorgánica de interés dentro de la superficie, p. ej., en el caso de las aleaciones, en las que los componentes inorgánicos de la aleación pueden no estar distribuidas homogéneamente por todo el material de la aleación, o la cobertura inhomogénea de una superficie por un recubrimiento, p. ej., la presencia de zonas no recubiertas no deseadas, la formación de defectos de recubrimiento tales como poros.

30

Las superficies sobre las que se puede poner en práctica el método no están particularmente limitadas. Éstas incluyen superficies de metales y no metales, especialmente metales, materiales semiconductores, y óxidos de los metales y materiales semiconductores. A menudo, la superficie comprende o consiste en al menos un material seleccionado del grupo que consiste en aluminio, antimonio, berilio, cadmio, cobre, cromo, oro, hierro, plomo, selenio, paladio, platino, acero inoxidable, titanio, zinc, silicio, germanio y óxidos de estos. Las superficies pueden tener diversas formas, a menudo las superficies son planas. Los materiales de la superficie preferidos comprenden o consisten en aluminio, cobre, hierro, plata, paladio, platino, zinc, y óxidos de estos materiales o aleaciones que incluyen estos metales, y, en particular acero, incluido acero inoxidable. Las superficies a las cuales se puede aplicar el procedimiento también incluyen superficies recubiertas, especialmente materiales inorgánicos recubiertos o superficies que portan un recubrimiento inorgánico. Tales recubrimientos inorgánicos pueden estar presentes sobre diferentes materiales incluyendo metales, pero también vidrio o sobre polímeros orgánicos o plásticos. Los recubrimientos ilustrativos son los recubrimientos que comprenden o consisten en un óxido metálico tal como óxido de titanio u óxido de aluminio, recubrimientos que comprenden o que consisten en un metal tal como plata, platino, paladio, aluminio o cobre, o recubrimientos que comprenden o consisten en materiales semiconductores tales como silicio u óxido de silicio o germanio u óxido de germanio. Entre otros, los recubrimientos previstos para las superficies recubiertas son superficies de acero recubiertas con materiales inorgánicos incluyendo recubrimientos de óxido de zinc como los aplicados en la galvanización del acero, o recubrimientos inorgánicos, específicamente recubrimientos de metales u óxidos de metales, como los aplicados por medio de métodos de depósito físicos o químicos en fase de vapor (PVD, CVD).

35

40

45

50

Como se comprenderá, las superficies y las superficies recubiertas pueden ser sometidas al método en diversas formas, incluyendo láminas, placas, paneles y planchas. Las superficies de interés también incluyen componentes electrónicos, tales como circuitos impresos, o nanosensores. La versatilidad inherente del método permite que superficies de diferentes tamaños sean sometidas a los métodos anteriores, tales como, p. ej., superficies que están en el intervalo de micrómetros cuadrados a metros cuadrados. Por ejemplo, la invención se puede poner en práctica convenientemente sobre superficies de  $1 \mu\text{m}^2$  o más,  $1 \text{mm}^2$  o más,  $1 \text{cm}^2$  o más,  $100 \text{cm}^2$  o más o incluso  $1000 \text{cm}^2$  o más.

55

En el contexto de la presente memoria, a veces se hace referencia a sustratos que se someten a los métodos de la invención. Se entenderá que estos sustratos son en general los materiales, productos, materiales recubiertos, etc., sobre los cuales se encuentran las superficies en las que se van a identificar los defectos y/o las inhomogeneidades.

5 El término "identificación" según se utiliza en la presente memoria incluye en sentido amplio tanto (i) que muestra la presencia o la ausencia de defectos o inhomogeneidades y (ii) la localización de defectos o inhomogeneidades sobre la superficie bajo consideración. Debe entenderse que la identificación de defectos o inhomogeneidades incluye una variedad de posibles estrategias, tales como

a) la detección de una entidad inorgánica que se sabe o se sospecha que forma una impureza sobre/en la superficie, de manera que la detección identifica directamente las impurezas,

10 b) la detección de una entidad inorgánica que forma el componente principal o uno de los componentes principales de la superficie, de manera que la detección identifica las partes de la superficie que no contienen defectos ni inhomogeneidades,

c) la detección de una entidad inorgánica que forma o está incluida en un material que porta un recubrimiento, de manera que la detección indica las partes de la superficie que no están cubiertas por el recubrimiento, y

15 d) la detección de una entidad inorgánica que forma o está incluida en un recubrimiento, de manera que la detección indica las partes de la superficie que están adecuadamente cubiertas por el recubrimiento.

20 La entidad inorgánica o la entidad inorgánica de interés incluye un compuesto inorgánico que se caracteriza por su composición química, p. ej., un metal, un óxido metálico, un semiconductor o un no metal. Los compuestos adecuados incluyen los mencionados como materiales inorgánicos o recubrimientos inorgánicos para las superficies anteriores, por tanto a menudo la entidad inorgánica se selecciona entre aluminio, antimonio, berilio, cadmio, cobre, cromo, oro, hierro, plomo, selenio, paladio, platino, titanio, zinc, silicio, germanio y óxidos de los mismos, concretamente  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{ZnO}$ ,  $\text{Al}_2\text{O}_3$ , o entre acero, incluido de acero inoxidable, o carbono. Sin embargo, la entidad inorgánica también se puede caracterizar por su forma cristalográfica, por ejemplo cristalina, amorfa, o por formas cristalinas específicas.

25 Se comprenderá que las entidades inorgánicas de interés referidas en el contexto de la presente descripción son típicamente entidades que están presentes en o cerca de la superficie de un sustrato, preferiblemente en la superficie.

30 Los marcadores detectables que se pueden utilizar en el contexto de la invención no están particularmente limitados. Estos incluyen marcadores seleccionados del grupo que consiste en compuestos fluorescentes, compuestos bioluminiscentes, compuestos quimioluminiscentes, radioisótopos, marcadores que pueden ser detectados por métodos colorimétricos, quelatos de metales, enzimas, biotina, estreptavidina y cuentas magnéticas.

35 Son generalmente preferidos los marcadores que permiten una detección directa, es decir marcadores que pueden ser detectados sin la necesidad de transportar específicamente el sustrato que tiene la superficie bajo consideración a un dispositivo de detección. En particular, se prefieren los marcadores que se pueden detectar en línea durante un procedimiento de producción o recubrimiento. La ventaja de utilizar un marcador detectable directamente es que permite una detección de control directo de la calidad de las muestras en la línea de producción. Las muestras no tienen que ser retiradas de la línea para ser caracterizadas por medio de técnicas de detección sofisticadas, tales como técnicas espectroscópicas. Por ejemplo, la detección se puede realizar en línea mediante la simple inmersión del sustrato en una solución de un material inorgánico-péptido marcado con marcador y la posterior observación de la señal proporcionada por el marcador, preferiblemente un marcador fluorescente, a simple vista, mediante análisis microscópicos o con una cámara de manera que sea inmediatamente evidente que el sustrato tiene defectos, o que un recubrimiento es homogéneo y tiene una buena cobertura de la superficie. La detección por medio de un marcador directamente detectable es particularmente conveniente, p. ej., para procedimientos continuos de producción o recubrimiento.

45 Preferiblemente, el marcador detectable es un compuesto fluorescente, en particular un colorante fluorescente. Un compuesto fluorescente incluye compuestos que emiten luz de una longitud de onda concreta cuando se expone a la radiación electromagnética de una longitud de onda más corta. Los ejemplos no limitantes de compuestos fluorescentes son fluoresceína, naftofluoresceína, las diferentes versiones conocidas de GFP, Rodamina, Rojo Texas, Azul Pacífico, Verde Oregon, Colorante Alexa Fluor, Cy3 o Cy5.

50 Como se comprenderá, el marcador detectable debe estar anclado al péptido de unión a materiales inorgánicos antes de que se ponga en contacto con la superficie. Generalmente se prefiere que el marcador detectable esté unido covalentemente al péptido de unión a materiales inorgánicos. Por otra parte, se prefiere anclar el marcador, preferiblemente a través de un enlace covalente, a extremo N del péptido. Los métodos para el anclaje de marcadores a péptidos se establecen en la técnica. Por ejemplo, el grupo amino que está disponible en el extremo N del péptido se puede utilizar para formar un enlace amida con un marcador adecuadamente funcionalizado, o puede reaccionar con un grupo epoxi de un marcador adecuadamente funcionalizado, etc.

Los métodos para poner en contacto la superficie con un péptido de unión a materiales inorgánicos no están limitados. El péptido se puede poner en contacto con la superficie en forma de una solución, una dispersión o un polvo, pero se utilizan preferiblemente soluciones, en particular soluciones acuosas. El contacto de la superficie con un péptido de unión a materiales inorgánicos puede incluir la aplicación de un péptido a la superficie, p. ej., mediante pulverización, enjuague o aplicación por medio de un cepillo, o puede incluir el baño, p. ej., inmersión de la superficie en una solución que contiene un péptido inorgánico.

Debe entenderse que la referencia a entornos acuosos, medios acuosos, soluciones acuosas o similares en esta solicitud, significa sistemas disolventes en donde 50% (v/v) o más, preferiblemente 70% o más, más preferiblemente 90% o más y en particular sustancialmente 100% del volumen total del disolvente o los disolventes es agua. Las soluciones acuosas que contienen péptidos de unión a materiales inorgánicos o utilizadas para lavar superficies a las que están unidos los péptidos de unión a materiales inorgánicos pueden comprender adicionalmente tampones y sales según sea necesario.

Cabe señalar que los métodos descritos en la presente memoria no se limitan a la aplicación de tipos individuales de los péptidos de unión a materiales inorgánicos a una superficie. Más bien, se contemplan específicamente métodos en los que la superficie se pone en contacto paralelamente o posteriormente, con más de uno, tal como dos, tres o cuatro tipos de péptidos de unión a materiales inorgánicos que se unen a diferentes entidades inorgánicas de interés. Por ejemplo, esto permite la detección en paralelo de diferentes tipos de impurezas sobre o en una superficie. Si se utilizan tipos plurales de péptidos de unión a materiales inorgánicos, los marcadores detectables anclados a los tipos plurales de péptidos de unión a materiales inorgánicos pueden ser idénticos. También se incluye en los métodos descritos en la presente memoria el uso de una pluralidad, tal como por ejemplo dos, tres o cuatro péptidos de unión a materiales inorgánicos, cada uno de los cuales comprende un marcador detectable diferente, tal como por ejemplo, marcas fluorescentes que tienen longitudes de onda de emisión diferentes, el uso de tal pluralidad de péptidos de unión a materiales inorgánicos marcados de forma diferente es particularmente útil en el control de calidad de superficies microestructuradas, tales como circuitos eléctricos, nanoobjetos recubiertos etc.

La unión del péptido de unión a materiales inorgánicos a entidades inorgánicas de interés en o sobre la superficie por lo general se produce espontáneamente, sin la necesidad de la aplicación de energía externa. Por ejemplo, con el fin de lograr la unión, el péptido o la solución de péptido pueden permanecer en contacto con la superficie a una temperatura que oscila de más de 0°C a menos de 40°C, típicamente a, o alrededor de, la temperatura ambiente, es decir, 20°C durante un período de segundos a varias horas. Típicamente, se aplican tiempos de contacto de 5 segundos o más, preferiblemente 15 segundos o más y 1 hora o menos.

La eliminación del péptido de unión a materiales inorgánicos no unido de la superficie puede conseguirse mediante la eliminación física de péptido, p. ej., retirando la superficie de una solución del péptido, lavando el péptido o solución de péptido no unidos de la superficie, limpiando el péptido o solución de péptido no unidos de la superficie, etc., o combinaciones de los métodos anteriores, tales como la retirada de la superficie de una solución del péptido, seguido de lavado. El lavado incluye el enjuague de la superficie con agua o con soluciones acuosas o la inmersión de la superficie en agua o en soluciones acuosas que pueden incluir tampones, cuando sea necesario, y que a menudo tienen un pH de 5 a 8, preferiblemente de 6 a 8.

El método de detección utilizado para detectar el péptido que queda sobre la superficie se selecciona apropiadamente, por supuesto, dependiendo del tipo de marcador utilizado, es decir, se debe utilizar un método que sea capaz de recibir señales, radiación etc. emitidas por el marcador, o excitar el marcador de manera que éste emita señales, radiación, etc., y, cuando sea necesario, transformar la señal, radiación, etc., en una forma adecuada que pueda ser percibida por los seres humanos o mediante un sistema automatizado. Por ejemplo, si se utiliza un marcador fluorescente, la detección se puede llevar a cabo, p. ej., mediante formación de imágenes fluorescentes utilizando una cámara, inspección visual bajo una lámpara apropiada, análisis microscópico etc. Son preferidos para la detección los métodos o sistemas que se pueden aplicar en línea en un procedimiento de producción o recubrimiento.

Los péptidos que se adhieren a las entidades inorgánicas de interés generalmente forman una capa o película delgada sobre la superficie. Tales películas pueden tener menos de 10 nm, a menudo incluso menos de 1 nm de espesor, y por lo tanto son típicamente transparentes para el ojo. No comprometen la ulterior utilización del sustrato. Si se desea, los péptidos de unión a materiales inorgánicos unidos, sin embargo, pueden ser eliminados de la superficie, p. ej., mediante lavado con una solución acuosa ácida o alcalina, p. ej., a un pH que oscila de 0 a 2 o a un pH que oscila de 12 a 14, mediante calentamiento o mediante sonicación. Por lo tanto, los métodos descritos en la presente memoria no son destructivos para la superficie que va a analizarse.

Como se entenderá a partir de las enseñanzas anteriores, los péptidos de unión a materiales inorgánicos se pueden utilizar como herramientas de control de calidad para la detección de defectos sobre superficies inorgánicas de cualquier forma. Debido a la alta especificidad, los péptidos de unión a materiales inorgánicos, que pueden ser aislados mediante presentación en fagos y se pueden unir a un colorante fluorescente son capaces de detectar defectos de composición química de tamaño de  $\mu\text{m}$  mediante un simple análisis microscópico bajo fluorescencia. Esta propiedad ha sido validada, entre otras, sobre sustratos de acero galvanizado con un péptido de unión a material inorgánico de ZnO, así como sobre acero inoxidable y un TiO<sub>2</sub> amorfo, p. ej. como el aplicado en el

recubrimiento de depósito en fase de vapor de plasma. El acero inoxidable es un componente importante que encuentra muchas aplicaciones en el recubrimiento de superficie. El  $TiO_2$  es un material semiconductor y fotocatalítico cuyas aplicaciones se pueden encontrar principalmente en los dominios biomédicos, ambientales o cosméticos. Este sistema se puede ampliar a cualquier tipo de sustrato inorgánico utilizando la tecnología de presentación en fagos. Una vez identificada una secuencia, un péptido puede ser sintetizado químicamente y ligado a un marcador. A continuación, una superficie de interés se puede sumergir en una solución de péptido y observar bajo fluorescencia.

El método es capaz de identificar los defectos de composición química a escala macroscópica y microscópica. Los defectos grandes se pueden visualizar a simple vista bajo una simple lámpara fluorescente mientras que defectos más pequeños se podrían detectar mediante análisis microscópicos bajo fluorescencia. En esa fase, el límite de detección para el tamaño del defecto es el límite de detección del microscopio. Por otra parte, el límite de detección se podría reducir mediante el uso de marcadores radiactivos.

Las muestras se pueden caracterizar de forma continua en la línea de producción; éstas no tienen que ser retiradas de la línea que se va a caracterizar mediante técnicas espectroscópicas sofisticadas. Ésta es una técnica no destructiva, la capa de péptido puede ser de menos de 1 nm de espesor y totalmente invisible a simple vista y se puede retirar, p. ej., mediante tratamiento ácido. Por consiguiente, este procedimiento puede encontrar numerosas aplicaciones en diversos ámbitos en los que la calidad de la superficie en términos de composición, homogeneidad del recubrimiento, etc., es una prioridad (microelectrónica, nanosensores, pintura de automóviles, etc.).

Otra ventaja del procedimiento es que permite trabajar sin fagos con el fin de evitar la dispersión generalizada de fagos. Adicionalmente, este proceso permite el análisis de una aplicación a gran escala en un contexto industrial.

Una realización específica de este aspecto incluye el uso de un péptido de unión a materiales inorgánicos marcado para la detección de control de calidad sobre superficies inorgánicas. La interacción entre un péptido de unión a ZnO VRRTRDDARTHRK (SEQ ID NO: 16) y una superficie de acero galvanizado se puede visualizar con un colorante fluorescente unido al extremo N-terminal de un péptido. Las superficies de acero galvanizado se recubren con una capa delgada de óxido de zinc sobre su superficie protegiéndolas de la corrosión. Una interacción de un péptido de unión con una superficie inorgánica se puede visualizar con un perfil fluorescente dependiendo de la calidad intrínseca (en términos de homogeneidad de la composición química) de una superficie de acero galvanizado, así como de un pre-tratamiento de la superficie. Se puede utilizar un péptido de unión a ZnO fluorescente para comprobar la calidad de la superficie de acero galvanizado. El péptido de unión a ZnO marcado con fluoresceína permite una visualización fácil y en línea de la calidad intrínseca de la superficie de acero galvanizado, así como de la calidad de un pre-tratamiento de la superficie (pre-recubrimiento), un punto crítico en la siderurgia. En la práctica, las muestras no tienen que ser retiradas de una línea de producción para ser caracterizadas mediante técnicas espectroscópicas sofisticadas. La detección se puede realizar en línea, simplemente sumergiendo un sustrato en una solución de material inorgánico-péptido fluorescente y la posterior observación con una cámara. Es no destructivo y la capa de péptido depositado tiene típicamente menos de 1 nm de espesor y es totalmente transparente.

La "calidad" de una superficie no sólo se refiere a la homogeneidad de composición química, sino también al tamaño de partícula preciso, la forma de las partículas especificada, etc. Como tales, los péptidos de unión a materiales inorgánicos se pueden usar en otro campo de creciente interés: la síntesis de polvo, especialmente nanopolvo y más precisamente la clasificación de polvos o nanopolvos, es decir, la identificación y/o aislamiento de partículas de polvo que tienen características especificadas. Los nanopolvos se sintetizan en todo el mundo, pero sigue existiendo la dificultad para producir nanopolvo con el tamaño monodisperso, la morfología y la cristalinidad (forma cristalina) solicitados/esperados. Todos estos parámetros físicos son cruciales para asegurar propiedades peculiares como la piezoelectricidad, conductividad, etc. Hasta ahora, el procedimiento de fabricación a menudo se adapta con el fin de obtener nanopolvos con una distribución de tamaño monodispersa. Las técnicas como el Depósito en Fase de Vapor Químico Catalítico, la Precipitación/Coprecipitación Química, la Electro-Explosión y el Depósito en Fase de Vapor Químico Potenciado por Plasma se utilizan en este objetivo por muchas compañías de síntesis de nanopolvo. Para refinar adicionalmente la segregación, se llevan a cabo procedimientos físicos como la precipitación selectiva por tamaño, la circulación en una corriente de gas y sedimentación adicional, la cromatografía líquida de alta resolución, la electroforesis en gel, la interacción con/desplazamiento en un campo electrostático, la centrifugación a una velocidad de rotación creciente, la dispersión de luz, la transición de fases entre las fases acuosas/orgánicas (nanopartículas protegidas), la separación por ultrasonidos o corrientes acústicas, después de la síntesis de nanopolvo con el fin de seleccionar el tamaño de partícula de interés.

Por lo tanto, según la invención, los péptidos de unión a materiales inorgánicos se pueden utilizar como herramientas para el aislamiento de partículas de polvo, y en particular para la clasificación de nanopolvo, mediante la composición química, la morfología y también basándose de sus formas cristalográficas.

De acuerdo con este aspecto, la invención proporciona por lo tanto un método para el aislamiento de partículas de polvo que comprenden una entidad inorgánica de interés a partir de una mezcla de partículas de polvo, que comprende las etapas de:

(a) poner en contacto el polvo con un péptido de unión a materiales inorgánicos capaz de unirse específicamente a la entidad inorgánica de interés,

y

(b) aislar las partículas de polvo a la que se ha unido el péptido de unión a materiales inorgánicos.

5 Los polvos que se pueden someter al método de esta realización incluyen típicamente partículas de polvo que comprende, o consisten en materiales inorgánicos (en lo sucesivo, las partículas de polvo que comprenden o consisten en materiales inorgánicos serán referidas como partículas de polvo inorgánico). Se entenderá que el método es adecuado tanto para el aislamiento de partículas de polvo inorgánico de mezclas de polvo puramente inorgánicas, o de mezclas que contienen tanto las partículas de polvo inorgánico como de otros tipos, especialmente  
10 partículas de polvo que consisten en materiales orgánicos, p. ej., poliméricos.

El método de acuerdo con la invención se puede aplicar a partículas de polvo de diferentes tamaños, incluyendo aquellas con un tamaño, p. ej., medido por medio de métodos de tamizado, de menos de 1 mm, concretamente menos de 100  $\mu\text{m}$ , o menos de 10  $\mu\text{m}$ , e incluso más preferido menos de 1  $\mu\text{m}$ . El método es particularmente adecuado para nanopolvos. Tales polvos tienen preferiblemente un tamaño de partícula, expresado con frecuencia como tamaño medio de partícula, de 500 nm o menos, preferiblemente 300 nm o menos y 10 nm o más, preferiblemente 50 nm o más. A menudo, la partícula tiene un tamaño que oscila de alrededor de 250 a 100 nm. Tales tamaños de partícula se pueden medir mediante métodos granulométricos conocidos en la técnica, p. ej. difracción láser.

Los polvos sometidos al método de este aspecto son preferiblemente no solubles en agua. Típicamente, su solubilidad es inferior a 100 mg/l, más preferiblemente inferior a 10 mg/l o incluso menos de 1 mg/l en agua a una temperatura de 20°C.

Como se indicó anteriormente, la referencia al "aislamiento de partículas de polvo" incluye métodos en donde las partículas de polvo que comprenden una entidad inorgánica de interés se identifican y separan de las partículas que no comprenden la entidad inorgánica de interés en una mezcla en polvo, o en donde se separan directamente de las  
25 partículas que no comprenden la entidad inorgánica de interés. Esta identificación y/o separación también es referida aquí como clasificación de polvos, especialmente nanopolvos.

La "entidad inorgánica de interés" que está comprendida en o proporcionada por las partículas de polvo que se van a aislar de acuerdo con el método de la invención incluye un compuesto inorgánico que se caracteriza por su composición química, p. ej., un metal, óxido de metal o un semiconductor o carbono. Los compuestos adecuados incluyen los seleccionados entre aluminio, antimonio, berilio, cadmio, cobre, cromo, oro, hierro, plomo, selenio, paladio, platino, titanio, zinc y óxidos de los mismos, particularmente entre  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{ZnO}$ ,  $\text{Al}_2\text{O}_3$  o entre acero, incluido acero inoxidable. Por ejemplo, las partículas de polvo que se van a aislar puede consistir en los materiales mencionados anteriormente a los que se puede unir específicamente que el péptido de unión a materiales inorgánicos. En otra realización de este aspecto de la invención, la entidad inorgánica también puede ser una forma  
35 cristalográfica inorgánica específica de la partícula o en la partícula que se va a aislar, p. ej., cristalina, amorfa, o una forma cristalina específica. En otra realización más, la entidad inorgánica de interés es una partícula de polvo inorgánico en sí misma, que tiene un diámetro específico al cual se unirá selectivamente el péptido de unión a materiales inorgánicos. Otras morfologías de partículas, aparte del tamaño de partícula también se pueden contemplar como un criterio para el aislamiento de partículas de polvo.

40 Se entenderá que las entidades inorgánicas de interés son típicamente entidades que se pueden encontrar en, o cerca de la superficie de las partículas de polvo, preferentemente en la superficie.

Las mezclas de polvo que se van a someter al método de acuerdo con la invención comprenden típicamente al menos dos tipos de polvos, un tipo que proporciona la entidad inorgánica de interés, no proporcionando el otro la entidad inorgánica de interés. Sin embargo, el número de tipos de polvos no está particularmente limitado, tal como en el caso de mezclas de polvo que contienen partículas inorgánicas a lo largo de un intervalo de tamaños a partir de los cuales se van a aislar las partículas de polvo de un tamaño de partícula específico.

La mezcla de polvo se puede someter al método como tal, pero se prefiere dispersar las partículas de polvo para proporcionar una suspensión, preferiblemente una suspensión acuosa, de la mezcla de polvo en la que se va a realizar el método de acuerdo con la invención. Se debe entender que la referencia a una suspensión acuosa, medios acuosos, soluciones acuosas o similares en esta solicitud, significa sistemas disolventes en los que 50% (v/v) o más, preferiblemente 70% o más, más preferiblemente 90% o más y en particular, sustancialmente 100% del volumen total del disolvente o los disolventes es agua. Las soluciones acuosas que contienen los péptidos de unión a materiales inorgánicos u utilizadas para lavar partículas a las que se unen los péptidos de unión a materiales inorgánicos pueden comprender adicionalmente tampones y sales según sea necesario.

55 La unión del péptido de unión a materiales inorgánicos a entidades inorgánicas de interés generalmente se produce espontáneamente, sin la necesidad de la aplicación de energía externa. Por ejemplo, con el fin de lograr una unión, el péptido/solución de péptido pueden permanecer en contacto con las partículas de polvo a una temperatura que

oscila entre más de 0°C y menos de 40°C, típicamente en o alrededor de la temperatura ambiente, es decir, 20°C a lo largo de un período de segundos a varias horas. Típicamente, se aplican tiempos de contacto de 5 segundos o más, preferiblemente 15 segundos o más y 1 hora o menos.

En una realización preferida, el método para el aislamiento de las partículas de polvo utilizando un péptido de unión a materiales inorgánicos incluye una etapa en donde el péptido de unión a materiales inorgánicos está anclado a un soporte sólido. El soporte no está particularmente limitado en cuanto a su forma o con respecto al material utilizado. Por ejemplo, se pueden contemplar resinas de cualquier composición y forma, incluyendo cuentas de resina y cuentas con un núcleo magnético, fibras, tubos, tejidos o membranas. El soporte debe tener un tamaño que permita su manejo conveniente de tal manera que los péptidos de unión a materiales inorgánicos unidos a las partículas de polvo de interés se puedan separar junto con el soporte al que están anclados del resto de las partículas de polvo.

En este contexto, de acuerdo con una estrategia que está disponible, el péptido de unión a materiales inorgánicos se pone en contacto primero con la mezcla de polvo para unir las partículas de polvo que comprenden o que proporcionan la entidad inorgánica de interés, y posteriormente el complejo (péptido de unión a materiales inorgánicos) - partícula se ancla a un soporte, preferiblemente a través de su extremo N, de manera que pueda ser convenientemente separado de las otras partículas de polvo.

Siguiendo esta estrategia, como se muestra esquemáticamente en la Fig. 11 para una mezcla de partículas X que comprende o que proporciona una entidad inorgánica de interés y partículas Y que no comprenden la entidad de interés, se puede añadir el péptido de unión a materiales inorgánicos que se une específicamente a X a una suspensión de una combinación de partículas X e Y que se van a clasificar (Figura 11A). El péptido de unión a materiales inorgánicos se unirá específicamente sobre las partículas X. En un primer ejemplo (Figura 11A1), la suspensión de las partículas Y y los complejos (péptido de unión a materiales inorgánicos) - partícula se puede anclar adicionalmente a un soporte que muestra una gran afinidad por el péptido de unión a material inorgánico o incluso más generalmente por moléculas basadas en aminoácidos. Como resultado, las partículas Y permanecerán en suspensión y el complejo (péptido de unión a materiales inorgánicos) - partículas X se puede recuperar de la suspensión junto con el soporte de afinidad. En un segundo ejemplo, el péptido de unión a materiales inorgánicos comprende una etiqueta, p. ej., una etiqueta de histidina o cualquier otro radical químico o biológico que permita una unión de afinidad adicional a un soporte complementario adecuado; los ejemplos son los sistemas de tipo biotina-estreptavidina o los sistemas de tipo histidina-iones metálicos. En otro ejemplo más, al péptido de unión a materiales inorgánicos se le puede injertar un aducto químico o biológico super-hidrófobo/hidrófilo y la clasificación se podría procesar basándose en esta característica específica fisicoquímica recién inducida del complejo [partícula X-péptido de unión a material inorgánico-aducto].

Una estrategia alternativa incluye el anclaje del péptido de unión a materiales inorgánicos a un soporte antes de que se ponga en contacto con el polvo o la suspensión de polvo. Después, el soporte con el péptido de unión a materiales inorgánicos anclado al mismo se pone en contacto con el polvo o la suspensión de polvo. De acuerdo con esta realización, un soporte al cual se ancla el péptido de unión a materiales inorgánicos se pone en contacto con el polvo para permitir que las partículas de polvo que comprenden o que proporcionan la entidad inorgánica de interés se unan al péptido de unión a materiales inorgánicos, de manera que el péptido de unión a materiales inorgánicos actúe como un conector entre las partículas y el soporte. Con el fin de aislar las partículas de interés, el soporte se puede poner en contacto con, y posteriormente, separar de la mezcla de polvo, o se puede hacer pasar la mezcla de polvo, especialmente en forma de una suspensión, a lo largo o a través del soporte de manera que las partículas de interés sean capturados por el péptido de unión a materiales inorgánicos. El soporte puede ser de naturaleza orgánica, inorgánica o biológica. En una realización preferida, el péptido de unión a materiales inorgánicos se puede anclar en su extremo N al soporte. También se prefiere que el anclaje se logre a través de un enlace covalente, tal como un enlace éster o amida, formado entre la superficie del soporte y el péptido de unión a materiales inorgánicos.

Por ejemplo, como se muestra esquemáticamente en la Fig. 11, para una mezcla de partículas que X comprende o proporciona una entidad inorgánica de interés y partículas Y que no comprenden la entidad de interés (véase la Fig. 11B), el péptido de unión a materiales inorgánicos se puede injertar sobre un marco de material macroporoso (véase la Fig. 11 B2); la suspensión de partículas, en particular nanopartículas que se va a clasificar se puede poner en contacto o tamizar con el marco funcionalizado, las partículas X se unen al instante con el péptido de unión a materiales inorgánicos y las partículas Y fluyen a través. En un ejemplo alternativo (Figura 11 B1) el péptido de unión a materiales inorgánicos se puede anclar a una matriz, como cuentas de cromatografía o sobre una resina o sobre una membrana de cualquier tipo de composición química y cualquier forma física; en consecuencia, la suspensión de nanopartículas que se va a clasificar se pone en contacto con, p. ej., se filtra o se tamiza sobre la matriz, resina, membrana funcionalizadas (filtración tangencial, por ejemplo), las partículas X se unen instantáneamente al péptido de unión a materiales inorgánicos y las partículas Y fluyen a través. El marco o matriz funcionalizados también pueden ser tubos de cerámica o cualquier otro. Una ventaja particular de este método de acuerdo con la invención es que las matrices funcionalizadas se pueden reutilizar varias veces, tal como dos o más o incluso tres o más veces, después de que las partículas de interés hayan sido separadas para completar su aislamiento.

En una realización preferida de la estrategia que utiliza una matriz sólida a la cual se ancla el péptido de unión a materiales inorgánicos antes de que se ponga en contacto con las partículas de polvo, se utiliza una matriz que comprende o consiste en cuentas magnéticas. Por ejemplo, se encuentran disponibles cuentas magnéticas en

donde un núcleo magnético está cubierto por una vaina funcionalizada sobre la cual se puede injertar el péptido de unión a materiales inorgánicos. Por ejemplo, el péptido de unión a materiales inorgánicos se puede injertar sobre cuentas magnéticas que portan grupos epoxi. Después de la unión del péptido de unión a materiales inorgánicos a partículas de polvo, en particular nanopartículas, las cuentas magnéticas se pueden recuperar mediante magnetización de la suspensión combinada de partículas.

Con el fin de completar el aislamiento o la separación de las partículas de polvo que comprenden o que proporcionan una entidad inorgánica de interés a partir de una mezcla en polvo, es generalmente beneficioso escindir el enlace entre el péptido de unión a materiales inorgánicos y las partículas una vez que las partículas que no comprenden las entidades inorgánicas han sido retiradas. La escisión del enlace se puede lograr, p. ej., a través de un tratamiento en una solución acuosa ácida o alcalina con un pH que oscila típicamente de 0 a 2 o de 12 a 14, o mediante sonicación. Esto puede incluir bañar el soporte en una solución acuosa, o pulverizar la solución acuosa sobre el soporte. Con posterioridad, las partículas de interés se pueden recuperar convenientemente.

El método de acuerdo con la invención puede comprender etapas de lavado adicionales opcionales, p. ej., con el fin de eliminar de manera eficaz las partículas no comprenden ni proporcionan la entidad inorgánica de interés a partir de un soporte al que están ancladas las partículas de interés a través del péptido de unión a materiales inorgánicos. Tales etapas de lavado adicionales se pueden llevar a cabo usando condiciones bien conocidas, p. ej., utilizando soluciones tampón a un pH de alrededor de 5 a 8, preferiblemente de 6 a 8 o basándose en las enseñanzas de los ejemplos proporcionados a continuación, opcionalmente junto con las enseñanzas de los documentos allí citados.

Como se entenderá a partir de lo anterior, el método de acuerdo con la invención utiliza péptidos de unión a materiales inorgánicos como herramientas/sonda/sensor para la clasificación de nanopolvo en función del tamaño, la morfología y el estado cristalográfico. Los péptidos de unión a materiales inorgánicos son capaces de recoger en una mezcla de polvo, el polvo con la composición química, la morfología y las formas cristalográficas adecuadas/objetivo. Por ejemplo, los péptidos de unión a materiales inorgánicos han demostrado que son capaces de reconocer una forma cristalográfica en una mezcla de polvo policristalino de Au. Si se conectan con una cuenta magnética, los péptidos de unión a materiales inorgánicos pueden ser buenas herramientas para seleccionar y aislar una forma específica de un nanopolvo en una mezcla de nanopolvo mediante simple aislamiento magnético. Esto puede conducir a un avance tecnológico para una amplia gama de aplicaciones en numerosos sectores (farmacia, aeronáutica, construcción, automóvil, medicina, etc.) en donde el uso de nanopolvo monodisperso es fundamental.

En otra realización preferida del método de la invención, el péptido de unión a materiales inorgánicos se selecciona mediante presentación en fagos, presentación en células bacterianas o de levadura o presentación *in vitro*.

El término "presentación en fagos" se ha descrito en la presente memoria con más detalle.

El término "presentación en células bacterianas o de levadura", hace referencia a tecnologías de presentación en las que las bibliotecas de polipéptidos se presentan sobre la superficie de células bacterianas o de levadura (ciclos de selección por afinidad "biopanning").

El término "presentación *in vitro*", incorpora todas las tecnologías de presentación *in vitro* basadas en la exposición de una biblioteca de péptidos sobre superficies, tales como por ejemplo la superficie de un fago, una bacteria, una célula de levadura.

La invención proporciona métodos para la generación y el aislamiento de nuevos péptidos de unión a materiales inorgánicos que tienen preferiblemente una elevada afinidad por un material inorgánico seleccionado. Una ruta conocida para el aislamiento de polipéptidos de unión a materiales inorgánicos consiste en la utilización de técnicas de biología combinatoria descritas en la solicitud WO03/078451 que se basa principalmente en el uso de la tecnología de presentación en fagos. Una gran biblioteca aleatoria de péptidos de longitudes idénticas pero diferente composición de aminoácidos se utiliza para extraer secuencias específicas que se unen fuertemente a una superficie inorgánica seleccionada. Cada fago produce y presenta un péptido aleatorio diferente. En esta fase, una mezcla heterogénea de fagos recombinantes se pone en contacto con el sustrato inorgánico. Varios ciclos de lavado de los fagos eliminan los ligantes no específicos mediante la interrupción de las interacciones débiles con el sustrato. Los fagos unidos se eluyen a continuación de las superficies y se amplifican en bacterias. Varios péptidos de unión a materiales inorgánicos ya han sido identificados mediante presentación en fago o presentación en superficies celulares contra polvos inorgánicos y unos pocos contra superficies planas como superficies de oro, aluminio o polipirrol. Algunos de ellos se enumeran en la Tabla 1.

Materiales	Estado	Secuencia
Au (111) Au (001)	Superficie plana	MHGKTQATSGTIQS (SEQ ID NO: 1) SKTSLGQSGASLQGSEKLTNG (SEQ ID NO: 2); (p.ej. Brown 1997)
Pt	polvo	DRTSTWR (SEQ ID NO: 3) QSVTSTK (SEQ ID NO: 4) (p. ej., Oren 2005)
Pd	polvo	SVTQNKY (SEQ ID NO: 5)

Materiales	Estado	Secuencia
		SPHPGPY (SEQ ID NO: 6) (p. ej., Józszai 2006)
Al	Superficie plana	VPSSGPQDTGTT (SEQ ID NO: 7) (p. ej., Zuo 2005)
Ag	polvo	AYSSGAPPMPFF (SEQ ID NO: 8) NPSSLFRYLPSD (SEQ ID NO: 9) (p. ej., Naik 2002 o Xu 2005)
SiO <sub>2</sub>	polvo amorfo	MSPHPHPRHHHT (SEQ ID NO: 10) RGRRRRLSCRL (SEQ ID NO: 11) KPSHHHHTGAN (SEQ ID NO: 12) (p. ej., Naik 2002)
zeolitas	polvo	VKTQATSREEPPRLPSKHRPG (SEQ ID NO: 13) MDHGKYRQKGATPG (SEQ ID NO: 14) (p. ej., Schembri 1999)
ZnO	polvo	NTRMTARQHANKSTQ (SEQ ID NO: 15) VRTRDDARTHRRK (SEQ ID NO: 16) (p. ej., Kjaergaard 2000)
CaCO <sub>3</sub>	Polvo cristalino de calcita o aragonita	HTQNMARMYEPWF (SEQ ID NO: 17) DVFSSFNKHMRR (SEQ ID NO: 18) (p. ej., Gaskin 2000)
Cr <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Polvo cristalino	WRPKAATN (SEQ ID NO: 19) RIRHRLVGQ (SEQ ID NO: 20) (p. ej., Gaskin, 2004)
Ti	polvo	RKLPDAPGMHTW (SEQ ID NO: 21) (p. ej., Sano 2003)
TiO <sub>2</sub>	Polvo de anatasa	CHKKPSKSC (SEQ ID NO: 22) (p. ej., Chen 2006)
Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	polvo	RRTVKHHVN (SEQ ID NO: 23) (p. ej., Brown 1997)
GaAs	Polvo monocristalino	AQNPSDDNNTHTH (SEQ ID NO: 24) RLELAIPLQSGS (SEQ ID NO: 25) TPPRPIQYNHTS (SEQ ID NO: 26) (p. ej., Whaley 2000)
ZnS, CdS	Polvo nanocristalino	NNPMHQN (SEQ ID NO: 27) (p. ej., Lee 2002 o Mao 2004)
nanotubo C	nanotubo C	HWSAWWIRSNQS (SEQ ID NO: 28) (p. ej., Wang 2003)
PPyCl	Superficie plana	THRTSTLDYFVI (SEQ ID NO: 29) (p. ej., Sanghvi 2005)

Tabla 1: Péptidos inorgánicos identificados mediante presentación en fagos o presentación en la superficie celular contra polvos inorgánicos o contra superficies planas.

- 5 De acuerdo con lo anterior, se describe adicionalmente como un tercer aspecto un método para la identificación de defectos o inhomogeneidades en una superficie mediante la detección de una entidad inorgánica de interés, que comprende las etapas de:
- (a1) seleccionar un péptido contra la entidad inorgánica de interés por medio de tecnologías de presentación que es capaz de unirse específicamente a la entidad inorgánica de interés;
- 10 (a2) sintetizar o expresar el péptido de unión a materiales inorgánicos seleccionado en el apartado (a1), seguido de las etapas de:
- (a) poner en contacto la superficie con el péptido de unión a materiales inorgánicos, que porta un marcador detectable y es capaz de unirse específicamente a la entidad inorgánica de interés;
- (b) eliminar el péptido no unido; y
- (c) detectar el péptido que queda en la superficie.
- 15 Se entenderá que las realizaciones y las realizaciones preferidas de este método son las mismas que las descritas para el método para la identificación de defectos o inhomogeneidades sobre una superficie descrita anteriormente. Se entenderá que el marcador detectable se ancla generalmente al péptido después de la etapa (a2) y antes de la etapa (a) o, alternativamente, se expresa junto con el péptido en la etapa (a2).
- 20 La invención proporciona como un aspecto adicional un método para el aislamiento de partículas de polvo que comprenden una entidad inorgánica de interés a partir de una mezcla de partículas de polvo, que comprende las etapas de:
- (a1) seleccionar un péptido contra la entidad inorgánica de interés mediante tecnologías de presentación que es capaz de unirse específicamente a la entidad inorgánica de interés;

(a2) sintetizar o expresar el péptido de unión a materiales inorgánicos seleccionado en el apartado (a1), seguido de las etapas de:

(a) poner en contacto el polvo con el péptido de unión a materiales inorgánicos capaz de unirse específicamente a la entidad inorgánica de interés;

5 y

(b) aislar las partículas de polvo a las que se ha unido el péptido de unión a materiales inorgánicos.

Se entenderá que las realizaciones y las realizaciones preferidas de este método son las mismas que las descritas para el método para el aislamiento de las partículas de polvo de acuerdo con la invención descrito anteriormente.

10 En una realización preferida, la síntesis del péptido en la etapa (a2) es una síntesis química. Los métodos para la síntesis química de un péptido son bien conocidos en la técnica e incluyen los métodos citados en otra parte en la presente memoria.

En una realización preferida, la expresión del péptido en la etapa (a2) es un método biológico molecular de expresión del péptido. Lo medio de la biología molecular, p. ej., los métodos recombinantes, para la expresión de un péptido son bien conocidos en la técnica e incluyen los métodos citados en otra parte en la presente memoria.

15 En una realización preferida, el anclaje del péptido sintetizado a un marcador es un anclaje covalente.

La presente invención se refiere adicionalmente a un péptido de unión a materiales inorgánicos que comprende la secuencia de aminoácidos MTWDPSSLASPRS (SEQ ID NO: 31). La presente invención se refiere adicionalmente a un péptido de unión a materiales inorgánicos que comprende la secuencia de aminoácidos LNAAVPFTMAGS (SEQ ID NO: 32).

20 Dichos péptidos incluyen, pero no se limitan a, péptidos que consisten en la secuencia respectiva, así como péptidos que tienen la secuencia respectiva y que tienen residuos de aminoácidos adicionales ya sea en el extremo N, en el extremo C o en ambos extremos, preferiblemente manteniendo esencialmente su especificidad de unión. Tales residuos de aminoácidos adicionales, también conocidos como regiones flanqueantes, en los extremos del péptido de la invención son preferiblemente al menos un residuo de aminoácido, más preferiblemente al menos dos residuos de aminoácido, más preferiblemente al menos tres residuos de aminoácido e incluso más preferiblemente al menos cuatro residuos de aminoácido, tal como al menos cinco, seis o siete residuos de aminoácido.

Por lo tanto, la presente invención proporciona nuevos péptidos de unión a materiales inorgánicos. Los nuevos péptidos de unión a materiales inorgánicos de la invención incluyen el péptido de unión a acero inoxidable MTWDPSSLASPRS (SEQ ID NO: 31) y el péptido de unión a TiO<sub>2</sub> LNAAVPFTMAGS (SEQ ID NO: 32).

30 En otra realización, la presente memoria descriptiva describe una molécula de ácido nucleico que codifica un péptido de la invención.

En una realización preferida, la molécula de ácido nucleico es ADN.

35 Un experto en la técnica apreciará fácilmente que más de un ácido nucleico puede codificar un péptido de la presente invención debido a la degeneración del código genético. La degeneración resulta de un código de tripletes que designa 20 aminoácidos y un codón de parada. Debido a que existen cuatro bases que se utilizan para codificar la información genética, se requieren codones de tripletes para producir al menos 21 códigos diferentes. Las 4<sup>3</sup> posibilidades viables para las bases en tripletes proporcionan 64 posibles codones, lo que significa que debe existir alguna degeneración. Como resultado, algunos aminoácidos son codificados por más de un triplete, es decir, por hasta seis. La degeneración surge fundamentalmente de alteraciones en la tercera posición en un triplete. Esto significa que las moléculas de ácido nucleico que tienen secuencias diferentes, pero todavía codifican el mismo polipéptido se encuentran dentro del alcance de la presente descripción.

Adicionalmente, la memoria descriptiva describe un vector que comprende la molécula de ácido nucleico.

45 Preferiblemente, el vector es un plásmido, cósmido, virus, bacteriófago u otro vector utilizado convencionalmente, p. ej., en ingeniería genética. Preferiblemente, el vector es un vector de expresión. Un vector de expresión es capaz de dirigir la replicación y la expresión de la molécula de ácido nucleico y el péptido, el péptido de fusión o el polipéptido de fusión codificados por el mismo. Los vectores de expresión adecuados se describen por ejemplo a continuación en el contexto de la expresión de una proteína de fusión de péptido de unión a materiales inorgánicos expresado en la superficie de un fago o una célula.

50 La molécula de ácido nucleico se puede insertar en varios vectores disponibles en el mercado. Los ejemplos no limitantes incluyen vectores plasmídicos procarióticos, tales como la serie pUC, pBluescript (Stratagene), la serie pET de vectores de expresión (Novagen) o pCRTOPO (Invitrogen), lambda gt11, pJOE, la serie pBBR1-MCS, pJB861, pBSMuL, pBC2, pUCPKS, pTACT1 y vectores compatibles con la expresión en células de mamífero como pREP (Invitrogen), pCEP4 (Invitrogen), pMC1neo (Stratagene), pXT1 (Stratagene), pSG5 (Stratagene), EBO-

pSV2neo, pBPV-1, pdBPVMMTneo, pRSVgpt, pRSVneo, pSV2-dhfr, plZD35, vector de expresión de ADNc de Okayama-Berg pcDV1 (Pharmacia), pRc/CMV, pcDNA1, pcDNA3 (Invitrogen), pSPORT1 (GIBCO BRL), pGEMHE (Promega), pLXIN, pSIR (Clontech), pIRES-EGFP (Clontech), pEAK-10 (Edge Biosystems), pTriEx-Hygro (Novagen) y pCINeo (Promega). Los ejemplos de vectores plasmídicos adecuados para *Pichia pastoris* comprenden, p. ej. los plásmidos pAO815, pPIC9K y pPIC3.5K (todos de Invitrogen).

Un aspecto de la presente descripción incluye un vector de expresión replicable que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido de unión a materiales inorgánicos, en donde la fusión del gen codifica una proteína de fusión que comprende un péptido de unión a materiales inorgánicos fusionado a la totalidad o una parte de una proteína de la cubierta viral. También se incluye una biblioteca de diversos vectores de expresión replicables que comprende una pluralidad de fusiones de genes que codifican una pluralidad de diferentes proteínas de fusión que incluyen una pluralidad del péptido de unión a materiales inorgánicos descrito anteriormente. Los vectores pueden incluir una variedad de componentes y se construyen preferiblemente para permitir el movimiento de un dominio variable de anticuerpo entre los diferentes vectores y/o para proporcionar para la presentación de las proteínas de fusión en diferentes formatos.

Los ejemplos de vectores incluyen vectores de fagos. El vector de fago tiene un origen de replicación de fago que permite la replicación del fago y la formación de partículas del fago. El fago es preferiblemente un bacteriófago filamentoso, tal como un fago M13, f1, fd, Pf3 o uno de sus derivados, o un fago lambdaoide, tal como lambda, 21, phi80, phi81, 82,424,434, etc., o un derivado de los mismos.

Los ejemplos de proteínas de la cubierta viral incluyen la proteína infectividad pIII, la proteína principal pVIII de la cubierta, p3, Soc (T4), Hoc (T4), gpD (del bacteriófago lambda), la proteína menor 6 (pVI) de la cubierta del bacteriófago (fago filamentoso; *J. Immunol Methods* 10 Dic. 1999; 231(1-2):39-51), las variantes de la proteína principal de la cubierta del bacteriófago M13 (P8) (*Protein Sci* Abr. 2000; 9(4):647-54). La proteína de fusión se puede presentar sobre la superficie de un fago y los sistemas de fagos adecuados incluyen el fago auxiliar M13K07, M13R408, M13-VCS, y Phi X 174, el sistema de fagos pJuFo (*J Virol*. Agosto 2001; 75(15):7107-13.v), hiperfago (*Nat Biotechnol*. Enero 2001; 19(1):75-8). Un fago auxiliar preferido es M13K07, y una proteína de la cubierta preferida es la proteína de la cubierta del gen III del fago M13. El anfitrión preferido es *E. coli*, y las cepas con deficiencia de proteasa de *E. coli*. Los vectores, tales como el vector fth1 (*Nucleic Acids Res*. 15 de mayo de 2001; 29 (10): E50-0) pueden ser útiles para la expresión de una proteína de fusión.

El vector de expresión también puede tener una secuencia señal secretora fusionada al ADN que codifica cada subunidad del anticuerpo o fragmento del mismo. Esta secuencia se localiza típicamente inmediatamente 5' con respecto al gen que codifica la proteína de fusión, y de ese modo, será transcrita en el extremo amino de la proteína de fusión. Sin embargo, en ciertos casos, se ha demostrado que la secuencia señal se encuentra en posiciones distintas de 5' con respecto al gen que codifica la proteína que se va a secretar. Esta secuencia dirige la proteína a la que está anclada a través de la membrana interna de la célula bacteriana. El ADN que codifica la secuencia señal puede obtenerse como un fragmento de endonucleasa de restricción a partir de cualquier gen que codifica una proteína que tiene una secuencia señal. Las secuencias señal procarióticas adecuadas se pueden obtener a partir de genes que codifican, por ejemplo, Lamb u OmpF (Wong et al., *Gene*, 68: 1931 (1983), MalE, PhoA y otros genes. Una secuencia señal procariótica preferida para la práctica de esta invención es la secuencia señal de enterotoxina termoestable H (STH) de *E. coli* como se describen Chang et al., *Gene* 55:189 (1987), y malE.

El vector también incluye típicamente un promotor para dirigir la expresión de la proteína de fusión. Los promotores usados más comúnmente en los vectores procarióticos incluyen el sistema promotor lac Z, el promotor pho A de la fosfatasa alcalina (Ap), el promotor lambda pL de bacteriófago (un promotor sensible a la temperatura), el promotor tac (un promotor trp-lac híbrido que está regulado por la represor lac), el promotor de triptófano, y el promotor del bacteriófago T7. Para descripciones generales de los promotores, véase la sección 17 de Sambrook et al. más arriba. Si bien estos son los promotores más comúnmente utilizados, también se pueden utilizar otros promotores microbianos adecuados.

El vector también puede incluir otras secuencias de ácido nucleico, p. ej., secuencias que codifican etiquetas gD, epítomos c-Myc, etiquetas de poli-histidina, proteínas de fluorescencia (p. ej., GFP) o proteína beta-galactosidasa que pueden ser útiles para la detección o purificación de la proteína de fusión expresada en la superficie del fago o de la célula. Las secuencias de ácido nucleico que codifican, p. ej., una etiqueta gD, también proporcionan la selección positiva o negativa de células o virus que expresan la proteína de fusión. En algunas realizaciones, la etiqueta gD se fusiona preferiblemente a un dominio variable de anticuerpo que no se fusiona al componente de la proteína de la cubierta viral. Las secuencias de ácido nucleico que codifican, por ejemplo, una etiqueta de polihistidina, son útiles para la identificación de proteínas de fusión que incluyen dominios variables de anticuerpos que se unen a un antígeno específico utilizando inmunohistoquímica. Las etiquetas útiles para la detección de la unión a un antígeno se pueden fusionar a un dominio variable de anticuerpo no fusionado a un componente de la proteína de la cubierta viral o a un dominio variable de anticuerpo fusionado a un componente de la proteína de la cubierta viral.

Otros componentes útiles de los vectores utilizados para la práctica de esta invención son los genes de selección fenotípica. Los genes de selección fenotípica típicos son aquellos que codifican proteínas que confieren resistencia a

antibióticos a la célula anfitriona. A modo de ilustración, se emplean fácilmente para este fin el gen de resistencia a ampicilina (*amp*), y el gen de resistencia a la tetraciclina (*Tet*).

La memoria descriptiva describe además una célula anfitriona que comprende la molécula de ácido nucleico o el vector.

- 5 Los vectores contruidos como se ha descrito se introducen en una célula anfitriona para la amplificación y/o expresión. Los vectores se pueden introducir en las células anfitrionas utilizando métodos de transformación convencionales incluyendo electroporación, precipitación con fosfato de calcio y similares. Si el vector es una partícula infecciosa tal como un virus, el propio vector proporciona la entrada a la célula anfitriona. La transfección de las células anfitrionas que contienen un vector de expresión replicable que codifica la fusión del gen y la producción de partículas de fago de acuerdo con procedimientos convencionales proporciona partículas de fago en las que la proteína de fusión se presenta sobre la superficie de la partícula de fago. Las células anfitrionas preferidas incluyen, sin ser limitantes, *E. coli*.

- 15 En una realización diferente, la memoria descriptiva describe un método para producir un péptido de la invención, que comprende cultivar el anfitrión descrito en la presente memoria en condiciones adecuadas y aislar el péptido producido. Los métodos adecuados para producir péptidos en anfitriones apropiados son conocidos en la técnica y se han descrito anteriormente. Además, un péptido de la invención también puede ser producido mediante traducción in vitro de ARNm en un sistema de expresión libre de células adecuado o se puede sintetizar como se ha descrito anteriormente.

- 20 En una realización preferida del método de la invención, la estructura de la superficie inorgánica de interés es de acero inoxidable y el péptido de unión a materiales inorgánicos que se une específicamente a dicha estructura inorgánica de interés es el péptido de la invención que comprende la secuencia de aminoácidos MTWDPSLASPRS (SEQ ID NO: 31).

- 25 En otra realización preferida del método de la invención, la estructura de la superficie inorgánica de interés es  $TiO_2$  y el péptido de unión a materiales inorgánicos que se une específicamente a dicha estructura inorgánica de interés es el péptido de la invención que comprende la secuencia de aminoácidos LNAVPFTMAGS (SEQ ID NO: 32).

#### Definiciones generales

Los aminoácidos se representan en la presente memoria, o bien con el código de una sola letra o bien con el código de tres letras o ambos. Estos códigos son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, los códigos de los aminoácidos convencionales se muestran en siguiente Tabla 2.

Aminoácidos	código de una letra	código de tres letras
Alanina	A	Ala
Arginina	R	Arg
Asparragina	N	Asn
Ácido aspártico	D	Asp
Cisteína	C	Cys
Ácido glutámico	E	Glu
Glutamina	Q	Gln
Glicina	G	Gly
Histidina	H	His
Isoleucina	I	Ile
Leucina	L	Leu

Aminoácidos	código de una letra	código de tres letras
Lisina	K	Lys
Metionina	M	Met
Fenilalanina	F	Phe
Prolina	P	Pro
Serina	S	Ser
Treonina	T	Thr
Triptófano	W	Trp
Tirosina	Y	Tyr
Valina	V	Val

**Tabla 2:** códigos de una letra y de tres letras para aminoácidos convencionales

El término "purificación por afinidad", según se utiliza en la presente memoria, significa la purificación de una molécula basada en la atracción o unión específica de la molécula a un producto químico o compañero de unión para formar una combinación o complejo que permite que la molécula sea separada de las impurezas mientras permanece unida al ó atraída por el radical del compañero.

Tal según se utiliza en la presente memoria, "conjunto de codones" se refiere a un conjunto de diferentes secuencias de tripletes de nucleótidos utilizado para codificar aminoácidos variantes deseados. Un conjunto de oligonucleótidos se puede sintetizar, por ejemplo, mediante síntesis en fase sólida, incluyendo secuencias que representan todas las posibles combinaciones de tripletes de nucleótidos proporcionadas por el conjunto de codones y que codificarán el grupo deseado de aminoácidos. Una forma convencional de designación de codones es la del código IUB, que se conoce en la técnica y se describe en la presente memoria.

"Célula", "línea celular" y "cultivo celular" se utilizan indistintamente en la presente memoria y tales designaciones incluyen toda la progenie de una célula o línea celular. Así, por ejemplo, términos como "transformantes" y "células transformadas" incluyen la célula sujeto primaria y los cultivos derivados de la misma sin tener en cuenta el número de transferencias. También se entiende que toda la progenie puede no ser precisamente idéntica en el contenido de ADN, debido a mutaciones deliberadas o inadvertidas. Se incluye la progenie mutante que tiene la misma función o actividad biológica que se escruta en la célula transformada originalmente. Cuando se pretendan designaciones diferentes, quedará claro a partir del contexto.

Según se utiliza en la presente memoria, el término "secuencias de control" cuando se refiere a la expresión significa secuencias de ADN necesarias para la expresión de una secuencia codificante conectada operativamente en un organismo anfitrión concreto. Las secuencias de control que son adecuadas para procariontes, p. ej., incluyen un promotor, opcionalmente una secuencia operadora, un sitio de unión al ribosoma, y posiblemente, otras secuencias todavía poco conocidos. Se sabe que las células eucarióticas utilizan promotores, señales de poliadenilación, y potenciadores.

El término "proteína de la cubierta", de acuerdo con la presente invención, significa una proteína, al menos una parte de la cual está presente en la superficie de la partícula de virus. Desde una perspectiva funcional, una proteína de la cubierta es cualquier proteína que se asocia con una partícula de virus durante el procedimiento de ensamblaje viral en una célula anfitriona, y permanece asociada con el virus ensamblado hasta que éste infecta otra célula anfitriona. La proteína de la cubierta puede ser la proteína principal de la cubierta o puede ser una proteína menor de la cubierta. Una proteína de la cubierta "principal" es generalmente una proteína de la cubierta que está presente en la cubierta viral preferiblemente con al menos aproximadamente 5, más preferiblemente al menos aproximadamente 7, incluso más preferiblemente al menos aproximadamente 10 copias de la proteína o más. Una proteína principal de la cubierta puede estar presente en decenas, cientos o incluso miles de copias por virión. Un ejemplo de una proteína principal de la cubierta es la proteína p8 de fago filamentoso.

Tal como se utiliza aquí, el término "límite de detección" para una entidad química en un análisis concreto es la

concentración mínima de esa entidad que puede ser detectada por encima del nivel de fondo para que análisis. Por ejemplo, en el ELISA de fagos, el "límite de detección" para un fago concreto que presenta un péptido de unión a materiales inorgánicos concreto, es la concentración de fagos a la cual el fago concreto produce una señal de ELISA por encima de la producida por un fago de control que no presenta el péptido unión a materiales inorgánicos.

5 "Polipéptido", se refiere a un péptido o proteína que contiene dos o más aminoácidos unidos por enlaces peptídicos, e incluye péptidos, oligómeros, proteínas, y similares. El término "péptido" según se utiliza en la presente memoria describe un grupo de moléculas que consisten en hasta 30 aminoácidos, mientras que las "proteínas" consisten en más de 30 aminoácidos. Los polipéptidos pueden contener aminoácidos naturales, modificados o sintéticos. Los polipéptidos también se pueden modificar de forma natural, por ejemplo mediante procesamiento post-traducciona  
10 o químicamente, por ejemplo mediante amidación, acilación, entrecruzamiento, y similares.

Una "proteína de fusión" y un "polipéptido de fusión" se refieren a un polipéptido que tiene dos porciones unidas covalentemente entre sí, donde cada una de las porciones es un polipéptido que tiene una propiedad diferente. La propiedad puede ser una propiedad biológica, tal como una actividad *in vitro* o *in vivo*. La propiedad también puede ser una simple propiedad química o física, tal como la unión a un antígeno diana, la catálisis de una reacción, etc.  
15 Las dos porciones pueden estar unidas directamente por un solo enlace peptídico o a través de un conector peptídico que contiene uno o más residuos de aminoácido. En general, las dos porciones y el conector estarán en marco de lectura entre sí. Preferiblemente, las dos porciones del polipéptido se obtienen de polipéptidos heterólogos o diferentes. Un ejemplo de una proteína de fusión es un péptido de unión a materiales inorgánicos fusionado a una proteína de la cubierta del fago. Otro ejemplo de una proteína de fusión es un péptido de unión a materiales inorgánicos fusionado a un péptido o proteína marcadores.  
20

Existe en la técnica un gran número de métodos adecuados para producir polipéptidos en anfitriones apropiados. Si el anfitrión es un organismo unicelular, tal como un procarionta, una célula de mamífero o insecto, el experto en la técnica puede volver a una variedad de condiciones de cultivo. Convenientemente, la proteína producida se recoge del medio de cultivo, de los productos lisados de los organismos cultivados o de las membranas (biológicas) aisladas mediante técnicas establecidas. En el caso de un organismo multicelular, el anfitrión puede ser una célula que es parte de o deriva de una parte del organismo, por ejemplo dicha célula anfitriona puede ser la parte cosechable de una planta. Un método preferido implica la producción recombinante de proteínas en anfitriones como se indicó anteriormente. Por ejemplo, las secuencias de ácido nucleico que comprenden la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la invención pueden ser sintetizadas por PCR e insertadas en un vector de expresión. Posteriormente un anfitrión adecuado puede ser transformado con el vector de expresión. A continuación, el anfitrión se cultiva para producir el polipéptido deseado, que es aislado y purificado. Tales métodos son bien conocidos en la técnica (véase, p. ej., Sambrook et al., más arriba).  
25  
30

El vector de expresión también puede tener una secuencia señal secretora fusionada al ADN que codifica el péptido. Esta secuencia se localiza típicamente inmediatamente 5' con respecto al gen que codifica la proteína de fusión, y de ese modo, se transcribirá en el extremo amino de la proteína de fusión. Sin embargo, en ciertos casos, se ha demostrado que la secuencia señal se encuentra en posiciones distintas de 5' con respecto al gen que codifica la proteína que se va a secretar. Esta secuencia dirige la proteína a la que está anclada a través de la membrana interna de la célula bacteriana. El ADN que codifica la secuencia señal se puede obtener como un fragmento de endonucleasa de restricción de cualquier gen que codifica una proteína que tiene una secuencia señal. Las secuencias señal procarióticas adecuadas se pueden obtenerse de genes que codifican, p. ej., LamB u OmpF (Wong et al., Gene, 68:1931 (1983), MalE, PhoA y otros genes. Una secuencia señal procariótica preferida para la práctica de esta invención es la secuencia señal de enterotoxina termoestable H (STH) de *E. coli* como describen Chang et al., Gene 55:189 (1987), y malE.  
35  
40

El vector también incluye típicamente un promotor para dirigir la expresión de la proteína de fusión. Los promotores usados más comúnmente en los vectores procarióticos incluyen el sistema promotor lac Z, el promotor pho A de la fosfatasa alcalina (Ap), el promotor lambda pL de bacteriófago (un promotor sensible a la temperatura), el promotor tac (un promotor híbrido trp-lac que está regulado por el represor lac), el promotor de triptófano, y el promotor del bacteriófago T7. Para descripciones generales de los promotores, véase la sección 17 de Sambrook et al. más arriba. Si bien estos son los promotores más comúnmente utilizados, se pueden usar también otros promotores microbianos adecuados.  
45  
50

El vector también puede incluir otras secuencias de ácido nucleico, p. ej., secuencias que codifican etiquetas gD, epítopos c-Myc, etiquetas de poli-histidina, proteínas de fluorescencia (p. ej., GFP) o proteína beta-galactosidasa que pueden ser útiles para la detección o purificación de la proteína de fusión expresada sobre la superficie del fago o célula. Secuencias de ácido nucleico que codifican, por ejemplo, una etiqueta gD, también proporcionan la selección positiva o negativa de células o virus que expresan la proteína de fusión. En algunas realizaciones, la etiqueta gD se fusiona preferiblemente a un péptido que no se fusiona al componente de proteína de la cubierta viral. Las secuencias de ácido nucleico que codifican, por ejemplo, una etiqueta de polihistidina, son útiles para la identificación de proteínas de fusión que incluyen péptidos que se unen a un antígeno específico utilizando inmunohistoquímica. Las etiquetas útiles para la detección de la unión de péptidos se pueden fusionar a un péptido no fusionado a un componente de la proteína de la cubierta viral o un péptido fusionado a un componente de la proteína de la cubierta viral.  
55  
60

Un método alternativo para la producción de un polipéptido es la traducción *in vitro* de ARNm. Los sistemas de expresión libres de células adecuados para uso de acuerdo con la presente invención incluyen producto lisado de reticulocitos de conejo, extracto de germen de trigo, membranas microsomales pancreáticas caninas, extracto S30 de *E. coli*, y sistemas de transcripción/traducción acoplados, tales como el sistema TNT (Promega). Estos sistemas permiten la expresión de polipéptidos recombinantes tras la adición de vectores de clonación, fragmentos de ADN, o secuencias de ARN que contienen regiones codificantes y elementos promotores apropiados.

Además de la producción recombinante, el polipéptido o el polipéptido de fusión se pueden producir sintéticamente, p. ej., mediante síntesis peptídica directa usando técnicas de fase sólida (véase Stewart et al. (1969) *Solid Phase Peptide Synthesis*; Freeman Co, San Francisco; Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85 (1963), 2149-2154). La síntesis de proteínas sintéticas se puede realizar utilizando técnicas manuales o mediante automatización. La síntesis automatizada puede conseguirse, por ejemplo, utilizando el sintetizador de péptidos Applied Biosystems 431A (Perkin Elmer, Foster City CA) de acuerdo con las instrucciones proporcionadas por el fabricante. Se pueden sintetizar químicamente por separado varios fragmentos y combinar utilizando métodos químicos para producir la molécula completa. Como se ha indicado anteriormente, se puede utilizar la síntesis química, tal como el procedimiento en fase sólida descrito por Houghton (*Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1985, 82:5131).

El término "molécula de ácido nucleico" según se utiliza indistintamente con el término "polinucleótido", de acuerdo con la presente descripción, incluye ADN, tal como ADNc o ADN genómico, y ARN.

Se incluyen adicionalmente moléculas imitadoras de ácidos nucleicos conocidas en la técnica tales como derivados sintéticos o semisintéticos de ADN o ARN y polímeros mixtos. Tales moléculas imitadoras de ácido nucleico o derivados de ácidos nucleicos de acuerdo con la descripción incluyen el ácido nucleico de fosforotioato, ácido nucleico de fosforamidato, ácido 2'-O-metoxietil ribonucleico, ácido morfolinonucleico, ácido nucleico de hexitol (HNA), ácido peptidonucleico (PNA) y ácido nucleico bloqueado (LNA) (véase Braasch y Corey, *Chem Biol* 2001, 8:1). El LNA es un derivado de ARN en el que el anillo de ribosa está limitado por un enlace metileno entre el oxígeno 2' y el carbono 4'. Pueden contener bases de nucleótidos no naturales o derivadas adicionales, como será fácilmente apreciado por los expertos en la técnica.

El "ADN heterólogo" es cualquier ADN que se introduce en una célula anfitriona. El ADN puede derivar de una variedad de fuentes, incluyendo ADN genómico, ADNc, ADN sintético y fusiones o combinaciones de éstos. El ADN puede incluir ADN de la misma célula o tipo celular que la célula anfitriona o receptora o ADN de un tipo celular diferente, por ejemplo, de un mamífero o planta. Preferiblemente, el ADN incluye ADN de un tipo celular diferente. El ADN puede incluir, opcionalmente, marcadores o genes de selección, por ejemplo, genes de resistencia a antibióticos, genes de resistencia a la temperatura, etc.

Según se utiliza en la presente memoria, "biblioteca" se refiere a una pluralidad de secuencias de péptidos o polipéptidos (por ejemplo, polipéptidos de la invención), o los ácidos nucleicos que codifican estas secuencias.

La "ligación" es el procedimiento de formación de enlaces fosfodiéster entre dos fragmentos de ácido nucleico. Para la ligación de los dos fragmentos, los extremos de los fragmentos deben ser compatibles entre sí.

Los "oligonucleótidos" son polidesoxinucleótidos cortos, de hebra sencilla o doble que se sintetizan químicamente mediante métodos conocidos (tales como la química de fosfotriéster, fosfito, o fosforamidita, utilizando técnicas en fase sólida tal como se describe en el documento EP 266,032 publicado el 4 de mayo 1988, o por medio de intermedios desoxinucleósido-H-fosfonato como describen Froeshler et al., *Nucl. Acids, Res.*, 14:5399-5407 (1986)). Otros métodos incluyen la reacción en cadena de la polimerasa definida a continuación y otros métodos de autocebado y síntesis de oligonucleótidos sobre soportes sólidos. Todos estos métodos son descritos por Engels et al., *Agnew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 28:716-734 (1989). Estos métodos se utilizan si se conoce toda la secuencia de ácido nucleico del gen, o está disponible la secuencia del ácido nucleico complementario a la hebra codificante. Alternativamente, si se conoce la secuencia de aminoácidos diana, se puede inferir las secuencias de ácido nucleico potenciales utilizando residuos los codificantes conocidos y preferidos para cada residuo de aminoácido. Los oligonucleótidos se pueden purificar sobre geles de poliácridamida o columnas de clasificación por tamaños moleculares o mediante precipitación.

La "presentación en fagos" es una técnica por la cual se presentan péptidos, polipéptidos variantes como proteínas de fusión a al menos una porción de la proteína de la cubierta sobre la superficie del fago, p. ej., fagos filamentosos, partículas. Una utilidad de la presentación en fagos radica en el hecho de que se pueden clasificar rápidamente y de manera eficiente grandes bibliotecas de variantes de proteínas aleatorizadas para determinar aquellas secuencias que se unen a un antígeno diana con alta afinidad. La presentación de bibliotecas de péptidos y proteínas sobre fagos se ha utilizado para escrutar millones de polipéptidos para determinar los que tienen propiedades de unión específicas. Los métodos de presentación en fagos polivalentes se han utilizado para presentar péptidos pequeños al azar y proteínas pequeñas mediante fusiones con el gen III o el gen VIII del fago filamentosos. Wells y Lowman, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 3: 355-362 (1992), y referencias allí citadas. En la presentación en fagos monovalente, se fusiona una biblioteca de proteínas o péptidos con un gen III o una porción del mismo, y se expresa a niveles bajos en presencia de proteína del gen III de tipo salvaje de manera que las partículas de fago presentan una copia o ninguna de las proteínas de fusión. Los efectos de la avidéz se reducen con respecto al fago polivalente de modo

que la clasificación se basa en la afinidad intrínseca con el ligando, y se utilizan vectores fagémidos, que simplifican las manipulaciones de ADN. Lowman y Wells, *Methods: A companion to Methods in Enzymology*, 3:2050216 (1991).

Un "fagémido" es un vector plasmídico que tiene un origen de replicación bacteriano, p. ej., Co1E1, y una copia de una región intergénica de un bacteriófago. El fagémido se puede utilizar en cualquier bacteriófago conocido, incluyendo bacteriófago filamentosos y bacteriófago lambda. El plásmido también contendrá generalmente un marcador seleccionable para la resistencia a antibióticos. Los segmentos de ADN clonados en estos vectores pueden propagarse en forma de plásmidos. Cuando se proporcionan células que albergan estos vectores con todos los genes necesarios para la producción de partículas de fago, el modo de replicación del plásmido cambia a la replicación de círculo rodador para generar copias de una hebra del ADN plasmídico y partículas de empaquetamiento del fago. El fagémido puede formar partículas de fago infecciosas o no infecciosas. Este término incluye fagémidos que contienen un gen de la proteína de la cubierta del fago o un fragmento del mismo unido a un gen de un polipéptido heterólogo como una fusión de genes de tal manera que el polipéptido heterólogo se presenta sobre la superficie de la partícula de fago.

El término "vector de fago" significa una forma replicativa de doble hebra de un bacteriófago que contiene un gen heterólogo y susceptible de replicación. El vector de fago tiene un origen de replicación de fago que permite la replicación del fago y la formación de partículas de fago. El fago es preferiblemente un bacteriófago filamentosos, tal como un fago M13, f1, fd, Pf3 o un derivado de los mismos, o un fago lambda, tal como lambda, 21, phi80, phi81, 82, 424, 434, etc., o un derivado de los mismos.

## Figuras

**Figura 1: Estudio de unión del péptido de unión a ZnO-fluoresceína VRRDDARTRHK (SEQ ID NO: 16).** (A) El péptido de unión a ZnO (0,1 mg/ml) y los polvos inorgánicos de ZnO o Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> se mezclaron en tampón de unión (Tris 50 mM/Tween<sup>®</sup> al 0,5%/NaCl 15 mM (pH = 7,6)) durante 1 h y después se lavaron durante la noche con el mismo tampón. El polvo se examinó a continuación mediante microscopía óptica con fluorescencia. (B) Interacción del péptido de unión a ZnO con dos tipos de sustratos de acero galvanizado. El Galva Gi206031 es skinpasado, descromado y tiene un aspecto Z caracterizado por muy pocos defectos, mientras que el Galva DX510 es no skinpasado, descromado, Epasivado y tiene un aspecto A con algunos defectos. (C) Interacción del péptido de unión a ZnO con (i) zinc metálico, (ii) óxido de zinc (iii) hidróxido de zinc (iv) aluminio o (v) óxido de aluminio puros. Los óxidos se han formado calentando el sustrato de zinc 1 min a 200°C y el sustrato de aluminio 1 min a 800°C. Los hidróxidos se han formado atacando el sustrato con NaOH 0,1 M durante 10 min a temperatura ambiente. Todos los sustratos se saturaron primero con BSA al 1% antes de la unión.

**Figura 2: Efecto del pre-tratamiento alcalino o de calentamiento del sustrato galvaGi206031 sobre su interacción con el péptido de unión a ZnO.** Parte superior (Izquierda) sustrato no tratado, es decir lavado con una mezcla de etanol/acetona (Medio) Sustrato lavado 1 min a 60°C con Novaclean al 1,5%. (Derecha) Sustrato lavado 1 min a 60°C con Novaclean al 1,5% y calentado 2 minutos a 260°C. Los sustratos se observaron bajo el microscopio óptico con fluorescencia. La intensidad de fluorescencia de la fluoresceína se midió en una longitud de onda de emisión de 535 nm ( $\lambda$  excitación = 485 nm) sobre 20 líneas horizontales por muestra. La intensidad media se calculó sobre 10 muestras. Parte inferior: Análisis XPS de la superficie Galva Gi206031 después de la incubación en tampón de unión (Tris 50 mM/Tween<sup>®</sup> al 0,5%/NaCl 15 mM (pH = 7,6)) después de diferentes pretratamientos de lavado. (Primera línea) Sustrato no tratado es decir sustrato lavado solo con una mezcla 50/50 de etanol y acetona. (Segunda Línea) Sustrato lavado 1 min a 60°C con Novaclean al 1,5%. (Tercera línea) Sustrato lavado 1 min a 60°C con Novaclean al 1,5% y calentado 2 minutos a 260°C. Las composiciones de las muestras elementales se expresan en porcentaje atómico.

**Figura 3: (Parte superior) Estudio de la interacción cinética entre el péptido de unión ZnO (0,1 mg/ml) y el sustrato galva206031.** Los sustratos se lavaron con un detergente alcalino, se saturaron con BSA al 1% y a continuación se llevaron a cabo interacciones de unión durante 1,5, 15 o 60 min. A continuación, los sustratos se lavaron durante la noche con Tris 50 mM/Tween<sup>®</sup> al 0,5%/NaCl 15 mM (pH = 7,6) y se observaron mediante microscopía de fluorescencia. **(Parte inferior) estudio de desorción del péptido de unión a ZnO sobre galva206031: efecto de lavados exhaustivos con tampones ácidos o alcalinos después de la interacción péptido-sustrato.** El péptido de unión a ZnO (0,1 mg/ml) y el sustrato de acero galvanizado se mezclaron en tampón de unión (Tris 50 mM/ Tween<sup>®</sup> al 0,5%/NaCl 15 mM (pH = 7,6)) durante 1 h y después se lavaron durante la noche con un tampón a pH 2, 4, 10, o 14 que contenía Tween al 2%. Los sustratos se examinaron a continuación mediante microscopía óptica con fluorescencia. El último sustrato se calentó 10 min a 200°C. El péptido con ZnO-fluoresceína en solución en las mismas condiciones es todavía fluorescente.

**Figura 4: Adherencia diferencial de péptido de unión a ZnO a múltiples superficies.** Interacción de péptido de unión a ZnO con un sustrato de zinc parcialmente recubierto con una capa de 50 nm de Ag (parte derecha). La Ag se depositó sobre la lámina de Zn mediante PVD y se colocaron máscaras en algunos lugares con el fin de mantener los cuadrados de composición de Zn. El sustrato se sometió a tratamiento térmico para formar el óxido y a continuación se llevó a cabo la unión. (Parte derecha) Observación del sustrato bajo fluorescencia después del reconocimiento del péptido de unión a ZnO.

**Figura 5: Cuatro rondas de inmunoprecipitación con el kit de presentación en fagos PhD12 frente a un sustrato de acero inoxidable y TiO<sub>2</sub>.** La tabla muestra la disminución del número de fagos después de cada ronda. Se secuenciaron aproximadamente 30 fagos después de la tercera y cuarta ronda de selección. La secuencia del péptido de consenso para el acero inoxidable y TiO<sub>2</sub> se describen en el marco. La secuencia del péptido para acero inoxidable se produjo en 70% de los clones y la secuencia para TiO<sub>2</sub> en 50% de los clones.

**Figura 6: Técnicas indirectas para medir la unión de los fagos que contienen la secuencia de consenso al sustrato de interés.** (A) Representación esquemática del método utilizado para etiquetar fluorescentemente el fago. Un anticuerpo para la cubierta del fago se liga a la biotina. La conexión biotina-estreptavidina se utiliza para anclar al fago una fluoresceína conjugada con estreptavidina. (B) Mediciones de fluorescencia de los fagos que contienen la secuencia del péptido para acero inoxidable en la interacción con el sustrato de acero inoxidable (dos parches circulares a la izquierda), de los fagos que contienen la secuencia del péptido Ti en la interacción con el sustrato de acero inoxidable (primer parche circular a la derecha) y de los fagos que contienen una secuencia de péptidos al azar en la interacción con el sustrato de acero inoxidable (parche circular del extremo derecho). La intensidad de fluorescencia se indica debajo. (C) Placas resultantes de un título de fago que muestra una clara preferencia 3:1 de fagos que contienen el péptido para TiO<sub>2</sub> para el sustrato de TiO<sub>2</sub> en comparación con el sustrato de acero inoxidable.

**Figura 7: Interacción de péptidos sintéticos con un colorante de fluoresceína N-terminal con sus respectivos sustratos.** (A) Reconocimiento del péptido de unión a TiO<sub>2</sub> con el sustrato de TiO<sub>2</sub> o Si. Reconocimiento del péptido de unión a TiO<sub>2</sub> amidado para el sustrato de TiO<sub>2</sub>. (B) Reconocimiento del péptido de unión a acero inoxidable para los sustratos de acero inoxidable o Si. Reconocimiento del péptido de unión a acero inoxidable amidado para el sustrato de acero inoxidable. (C) Reconocimiento del péptido de unión de acero inoxidable para los sustratos de acero inoxidable o Si (control negativo).

**Figura 8: Mediciones QCM de la adsorción del péptido de unión a TiO<sub>2</sub> sintético, péptido de unión a acero inoxidable y péptido de unión a acero inoxidable amidado sobre sustratos de acero inoxidable.** Se utilizó péptido de unión a TiO<sub>2</sub> como control negativo. El desplazamiento en la frecuencia de resonancia se representa gráficamente como una función del tiempo. Los sensores QCM se estabilizaron primero en el tampón de unión Tris 50 mM/Tween<sup>®</sup> al 0,5%/NaCl 15 mM (pH = 7,6). Los péptidos se cargaron a un tiempo de 5 min y se inyectó tampón para enjuagar una vez que la curva de adsorción se estabilizó.

**Figura 9: Mediciones QCM de la adsorción del péptido de unión a acero inoxidable sintético, péptido unión a TiO<sub>2</sub> y péptido de unión a TiO<sub>2</sub> amidado sobre sustratos de TiO<sub>2</sub>.** Se utilizó péptido de unión de acero inoxidable como control negativo. El desplazamiento en la frecuencia de resonancia se representa gráficamente como una función del tiempo. Los sensores QCM se estabilizaron primero en el tampón de unión Tris 50 mM/Tween<sup>®</sup> al 0,5%/NaCl 15 mM (pH = 7,6). Los péptidos se cargaron a un tiempo de 5 min y se inyectó tampón para enjuagar una vez que la curva de adsorción se estabilizó.

**Figura 10: Adherencia diferencial del péptido de unión a TiO<sub>2</sub>/acero inoxidable a múltiples superficies.** El péptido sintético para TiO<sub>2</sub>-fluoresceína se incubó con un sustrato compuesto de una parte izquierda de acero inoxidable y una parte derecha de TiO<sub>2</sub>.

**Figura 11: Estrategias disponibles con el fin de aplicar la clasificación de una mezcla nanopolvo.** En un enfoque (Figura 11A) el GEPI dirigido a partículas X se añade a la suspensión acuosa de una combinación de partículas X e Y que se va a clasificar. El GEPI anclará específicamente sobre las partículas X. En un primer ejemplo (Figura A1), la dispersión acuosa de partículas Y y [partículas X - GEPI] se puede procesar adicionalmente sobre un soporte que presenta una gran afinidad por el GEPI o incluso más generalmente para moléculas basadas en aminoácidos: las partículas Y permanecerán en suspensión y las partículas X serán recuperadas después de la elución desde el soporte de afinidad. En un segundo ejemplo, el péptido de unión a materiales inorgánicos (GEPI) comprende una etiqueta; tal como por ejemplo una etiqueta de histidina o cualquier otro radical químico o biológico que permite una unión de afinidad adicional a un soporte complementario adecuado; ejemplos son sistemas de tipo biotina-estreptavidina o sistemas de tipo histidina-iones metálicos. En otro ejemplo más, el GEPI puede injertarse con un aducto químico o biológico super-hidrofobo/-hidrófilo y la clasificación se podría procesar basándose en esta característica específica físico-química recién inducida del complejo [partícula X-GEPI-aducto]. En otro enfoque (Figura 11 B), el GEPI dirigido a partículas X es conectado/injertado a un soporte y la combinación de nanopartículas adecuadamente dispersadas en una suspensión acuosa es procesada sobre el soporte funcionalizado. En un ejemplo (Figura B2) el GEPI podría ser injertado sobre un marco de material macroporoso de naturaleza orgánica, inorgánica o biológica; la suspensión de nanopartículas que se va a clasificar se pone en contacto/tamiza con el marco funcionalizado, las partículas X se conectan/adhieren al instante a GEPI-X y las partículas Y fluyen. En un ejemplo alternativo (Figura B1) el GEPI se puede inmovilizar sobre una matriz como cuentas de cromatografía o sobre una resina o sobre una membrana de cualquier tipo de composición química y cualquier forma física; en consecuencia, la suspensión de nanopartículas que se va a clasificar se filtra/tamiza sobre la matriz, resina, membrana (filtración tangencial, por ejemplo) funcionalizadas, las partículas X se conectan/adhieren al instante a GEPI-X y las partículas Y fluyen. El marco o matriz funcionalizados también pueden ser tubos de cerámica o cualquier otro.

Habiendo descrito generalmente la invención, la misma se entenderá más fácilmente mediante la referencia a los siguientes ejemplos.

#### Ejemplo 1: Materiales y Métodos

##### Material

- 5 Se adquirieron polvos de ZnO (99,99%), Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (99,98%) y Cu<sub>2</sub>O (99,9%) de Sigma-Aldrich. Los sustratos de acero galvanizado fueron suministrados por la empresa siderúrgica ArcelorMittal. Los sustratos galvanizados tienen sus superficies recubiertas por una fina capa de ZnO para evitar la corrosión. El acero galvanizado de la referencia Gi206031 es skinpasado, descromado y tiene un aspecto Z (pocos defectos en la superficie, buena calidad). El
- 10 acero galvanizado de referencia DX510 es no skinpasado, es decir de rugosidad heterogénea, cromado, E-pasivado con una fina capa de fosfato y tiene un aspecto A (más defectos). Los sustratos de acero galvanizado fueron caracterizados mediante espectroscopia Auger y de tiempo de vuelo (TOF)-SIMS (datos no mostrados). Las láminas de metal puro (99,9%) de Zn, Si, Ag y Al fueron adquiridas de Goodfellow (Alemania). La sal sódica de fluoresceína fue adquirida de Fluka (Alemania). El péptido de unión a ZnO VRRDDARTHRK (SEQ ID NO: 16) con un colorante de fluoresceína en el extremo N proviene de Eurogentec (Lieja, Bélgica).
- 15 Los kits de presentación en fagos PhD12 y PhD7C se adquirieron de New England Biolabs. Los sustratos de acero inoxidable y TiO<sub>2</sub> fueron ofrecidos por ArcelorMittal. El acero inoxidable es una aleación de CrFe-Ni. El sustrato de TiO<sub>2</sub> es un recubrimiento por depósito físico en fase de vapor (PVD) amorfo de 50 nm sobre un sustrato de acero inoxidable. Se utilizaron dos tipos de configuración de sustrato. Las primeras tres rondas de selección se realizaron sobre discos de 5 mm de diámetro de sustrato inorgánico mientras que la cuarta ronda se realizó en una profundidad de 5 mm moldeada en una lámina de acero inoxidable o TiO<sub>2</sub>.
- 20

##### Medios

- 25 Tween<sup>®</sup>-20 (Sigma-Aldrich), isopropil-β-D-tiogalactosidasa (IPTG) (Eurogentec, Lieja, Bélgica), 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactosidasa (X-Gal) (Eurogentec, Lieja, Bélgica), tetraciclina (Fluka), PEG-8000 (Sigma-Aldrich) anticuerpos anti-fd fueron adquiridos de Sigma-Aldrich. La fluoresceína conjugada con estreptavidina se adquirió de Molecular Probes.

##### Preparación de péptidos

Los péptidos se solubilizaron en tampón de unión Tris 50 mM/Tween<sup>®</sup> al 0,5%/NaCl 15 mM (pH = 7,6) a una concentración de 0,1 mg/ml.

##### Preparación de sustratos

- 30 Los polvos se lavaron con tampón de unión antes de la interacción. sustratos de acero galvanizado se lavaron primero 10 min con una mezcla de etanol/acetona y después con Novaclean 271 F al 1,5% durante 1 min a 60°C. Novaclean es un detergente alcalino comercial (grupo Arnaud, Francia). Las láminas de Zn y Al puras se lavaron 10 min con una mezcla de etanol/acetona. El óxido de metal se formó calentando el sustrato de zinc 1 min a 200°C y el sustrato de aluminio 1 min a 800°C. Los hidróxidos se formaron al atacar sustratos con NaOH 0,1 M durante 10 min
- 35 a RT. Los sustratos de acero inoxidable y TiO<sub>2</sub> se lavaron con una mezcla de acetona/etanol. Todos los sustratos se lavaron a continuación con agua y se incubaron en tampón de unión antes de la interacción con el péptido.

##### Estudios de unión

- 40 Todos los sustratos o polvos lavados se saturaron durante 2 h con BSA al 1% antes de la unión. El péptido de unión a ZnO (0,1 mg/ml) y los polvos/sustratos inorgánicos se mezclaron en tampón de unión Tris 50 mM/Tween<sup>®</sup> al 0,5%/NaCl 15 mM (pH = 7,6) durante 1 h y a continuación se lavaron durante la noche con un tampón Tris 50 mM/Tween<sup>®</sup> al 0,5%/NaCl 15 mM (pH = 7,6). Los sustratos de acero inoxidable y TiO<sub>2</sub> se pusieron en contacto con el péptido de unión a acero inoxidable/TiO<sub>2</sub> (0,1 mg/ml) y se incubaron en tampón de unión (Tris 50 mM/Tween<sup>®</sup> al 0,5%/NaCl 15 mM (pH = 7,6)) durante 1 h y después se lavaron durante la noche con Tris 50 mM/Tween<sup>®</sup> al 0,5%/NaCl 15 mM (pH = 7,6).

##### 45 Análisis con microscopio

- Después de la unión, los polvos/sustratos se examinaron mediante microscopía óptica con fluorescencia. Se llevó a cabo la formación de imágenes confocal utilizando un microscopio confocal láser invertido Leica TCS SP2 (Leica Microsystems, Alemania). Las imágenes digitalizadas fueron adquiridas utilizando un 63x (NA 1.2). La fluoresceína se visualizó mediante el uso de una longitud de onda de excitación de 488 nm y la emisión de luz se registró a 535
- 50 nm. La adquisición se ajustó para evitar cualquier diafonía de las tres emisiones de fluorescencia. Se llevaron a cabo series de secciones ópticas para analizar la distribución espacial de la fluorescencia, se registraron con una etapa Z que oscilaba entre 1 y 2 μm. El procesamiento de imágenes, incluyendo la sustracción del fondo, se llevó a cabo con el soporte lógico AnalyS (versión 2.5).

## Análisis XPS

Las mediciones XPS se realizaron en un espectrómetro de electrones para el sistema de análisis de superficie multi-técnica. Este sistema está equipado con un analizador de energía de electrones de espejo cilíndrico de doble fase. La fuente de fotones es una fuente de rayos de doble ánodo Cameca SCX 700. Se utiliza una fuente de fuente de rayos X Al K $\alpha$  no monocromatizada ( $h\nu = 1486,6$  eV) como la fuente de excitación en todos los casos. Utilizando la líneas de fotoelectrones Au 4f<sub>7/2</sub> y Cu 2p<sub>3/2</sub>, se realizó una calibración de energía del espectrómetro. Las cargas electrostáticas de la superficie se detectaron para algunas muestras, lo que dio como resultado efectos de retraso variables, por lo tanto todas las escalas de energía que correspondían a los espectros XPS referidos se normalizaron a partir de la posición de la energía de la línea de fotoelectrones C 1 s del carbono atmosférico (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>: 285 eV. Las mediciones de fotoemisión se llevaron a cabo en una serie de muestras antes y después de la eliminación parcial de la contaminación por carbono superficial por pulverización catódica de iones. La pulverización catódica se llevó a cabo durante 10 min en la cámara de análisis de ultra alto vacío (UHV) con un haz de iones Ar<sup>+</sup> de 0,6 keV (30 mA cm<sup>-2</sup>). Las composiciones de muestras elementales se evaluaron mediante XPS utilizando las áreas integradas de los picos de nivel básico C 1 s, N 1 s, O 1 s, A12p, Ca 2P3, Cu2P3, Zn 2p3. El contenido de la fracción molar X<sub>i</sub> de un elemento *i* (con *i* = 0, C ...) en un sustrato analizado se calculó con la relación: X<sub>i</sub> = A<sub>i</sub>/S<sub>i</sub>/Σ A<sub>i</sub>/S<sub>i</sub> siendo A<sub>i</sub> la zona del pico relacionada con el átomo *i*, y S<sub>i</sub> el factor de sensibilidad del átomo *i*.

## Selección de péptidos de unión a materiales inorgánicos por presentación en fagos

Los experimentos se realizaron de acuerdo con el procedimiento de inmunoprecipitación descrito en el protocolo de los kits PhD12 o PhD7C de Biolabs. Se realizaron cuatro rondas de selección por afinidad para sustratos de acero inoxidable o TiO<sub>2</sub> con el fin de extraer los péptidos consenso. Los fagos eluidos de la cuarta ronda se titularon sobre placas de agar y se tomaron muestras de aproximadamente 30 clones de fagos individuales para recuperar secuencias peptídicas.

## Secuenciación de ADN

Se llevó a cabo la secuenciación S de los fagos M13 después de 4 rondas de selección con el cebador de secuenciación inversa 96 gIII (5' CCC TCA TAG TTA GCG TAA CG-3' (SEQ ID NO: 30)).

## Medición de la afinidad fago-sustrato con

## (i) Anticuerpos fluorescentes

Los sustratos se expusieron a 20  $\mu$ l de fago (10<sup>6</sup> fagos/ $\mu$ l determinado mediante titulación). Después de 30 minutos, las muestras recibieron un lavado intermedio con solución salina tamponada con Tris que contenía BSA al 1% y Tween<sup>®</sup>-20 al 0,5% (TBST-BSA). A continuación las muestras se expusieron a 20  $\mu$ l de anti-fd biotilado (dilución 1/50 de la solución de partida) durante 30 minutos. Se realizó un segundo lavado intermedio y las muestras se expusieron finalmente durante 30 minutos a 20  $\mu$ l de fluoresceína conjugada con estreptavidina (dilución 1/100 de la solución de partida). A continuación las muestras recibieron un lavado final con 4X TBST-BSA, 4X TBST, 4X TBS, 4X H<sub>2</sub>O.

## (ii) mediciones de titulación

Los sustratos se expusieron a 20  $\mu$ l de fago (10<sup>6</sup> fago/ $\mu$ l determinado mediante titulación). Después de 30 minutos, las muestras recibieron un lavado intermedio con TBS/BSA al 1%/Tween<sup>®</sup>-20 al 0,5%. A continuación los fagos eluyeron a pH 2 y se titularon como se describe en el kit de presentación en fagos. Los resultados de la titulación fueron placas con placas víricas azules. El número de placas se correspondía con el número de fagos que se unían al sustrato. La población de fagos se diluyó antes de cultivarla en placas de modo que el número de placas en una placa dada se podía contar con la mano.

## Medición de la afinidad del péptido por el sustrato con

## (i) Un colorante de fluoresceína

Las tres secuencias consenso fueron solicitadas por Eurogentec (Lieja, Bélgica) con el colorante de fluoresceína en el extremo N-terminal. Los péptidos sintéticos se solubilizaron en tampón de unión Tris 50 mM/Tween<sup>®</sup> al 0,5%/NaCl 15 mM (pH = 7,6) y se pusieron en contacto con los respectivos sustratos como se describe en la sección de unión. Los sustratos se caracterizaron mediante análisis microscópicos.

## (ii) Mediciones QCM-D

Una QCM consiste en un disco de cuarzo fino intercalado entre un par de electrodos. La frecuencia de resonancia del cristal, cuando es excitado por una tensión CA, depende de la masa oscilante total, incluyendo el agua acoplada. La QCM proporciona de ese modo una medida de la "masa húmeda". Una capa adsorbida "blanda" (viscoelástica) amortiguará la oscilación del cristal. La disipación se puede medir a múltiples frecuencias y mediante la aplicación de un modelo viscoelástico, se pueden determinar la masa, el espesor, el módulo de cizalla elástico y la viscosidad de cizalladura de la película que se adhiere. El aparato QCM-D (D300, Q-Sense, Suecia) de los autores de la presente

invención se compone de una celda de flujo de placas paralelas cuya superficie inferior es un chip sensor QSX 303 (Q-Sense). Se utilizaron acero inoxidable y cristales de cuarzo Ti. El cristal de cuarzo de corte AT de 5 MHz se recubrió en un lado con Ti (Q-sense AB, Núm. de catálogo QSX310) para las mediciones de Ti-péptido. La composición química de los electrodos se confirmó mediante análisis XPS (espectro de XPS no mostrado). Las mediciones QCM se llevaron a cabo a una velocidad de flujo de 25 µl/min en una celda líquida estancada donde la solución entra en contacto con el acero inoxidable o el lado con Ti del sensor de cristal de cuarzo. Para cada una de las mediciones, se cargó primero el tampón de unión Tris 50 mM/Tween® al 0,5%/NaCl 15 mM (pH = 7,6) en la celda líquida. Después de la consecución de líneas de base estables para f y D, se añadió la solución de péptido sintético diluido en el mismo tampón en la celda líquida para reemplazar el tampón de unión. La concentración de las muestras de péptidos utilizadas en las mediciones QCM-D se ajustó a 0,1 mg/ml. Los valores fl 1 se presentaron para los análisis.

Ejemplo 2:

### 2.1 Estudio de unión del péptido de unión a ZnO con sustratos de acero galvanizado

El estudio de unión de una solución de fluoresceína (0,1 mg/ml) con sustratos de polvo de ZnO y acero galvanizado demuestra que el colorante solo no tiene afinidad por los sustratos de los autores de la presente invención. La fluoresceína se conectó a continuación covalentemente al extremo N-terminal del péptido para ZnO VRTRDDARTHRK (SEQ ID NO: 16) para visualizar todas las interacciones péptido-sustrato. Los experimentos de unión se realizaron por primera vez sobre polvos. El péptido (0,1 mg/ml) se incubó con polvo de ZnO en tampón de unión Tris 50 mM/Tween® al 0,5%/NaCl 15 mM (pH = 7,6) durante 1 h, los polvos se lavaron durante la noche con el mismo tampón y se examinaron mediante microscopía óptica con fluorescencia. Como se muestra en la Figura 1A, el péptido para ZnO interactúa específicamente con el polvo de ZnO. Se observa una baja interacción residual con el polvo de Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.

A continuación, se estudió la interacción entre el péptido de unión a ZnO y 2 tipos de superficies planas de acero galvanizado. Se sabe que los sustratos galvanizados se recubren con una fina capa de ZnO con el fin de evitar la corrosión. Los dos sustratos galvanizados fueron (i) Galva Gi206031 que es skinpasado, descromado y con un aspecto Z caracterizado por muy pocos defectos y (ii) Galva DX510 que es no skinpasado, descromado, E-pasivado y con un aspecto A caracterizado por algunos defectos. Curiosamente, el péptido de unión a materiales inorgánicos se une fuertemente a ambos sustratos galvanizados (Figura 1B), pero con diferentes perfiles de reconocimiento en función de la calidad de la superficie. No se observó interacción con la superficie de Si de control negativo.

Con el fin de poner de relieve la especificidad del péptido de unión a ZnO para el componente de ZnO y para deshacerse de las características de falta de homogeneidad e inestabilidad de las superficies galvanizadas, los experimentos se realizaron sobre láminas de zinc puro tratadas con el fin de tener (i) metal puro (ii) óxido de zinc puro o (iii) hidróxido de zinc puro. Se utilizaron láminas planas de aluminio y óxido de aluminio planas como controles negativos. La Figura 1C muestra que el péptido para ZnO reconoce la forma de óxido de cinc con una alta especificidad.

El pre-tratamiento de la superficie es también un parámetro importante a caracterizar en el campo de los sustratos galvanizados. Los sustratos de acero galvanizado se sometieron a varias condiciones de lavado y después se incubaron con péptidos de unión a ZnO fluorescentes. Parece ser que la afinidad de péptido de unión a ZnO para el sustrato de acero galvanizado aumenta después del pretratamiento alcalino y con calor del sustrato. La intensidad de fluorescencia del péptido unido al sustrato sometido a lavado alcalino es 5 veces mayor que en el sustrato original. Por otra parte, hay un aumento de fluorescencia de 3 veces si el sustrato ha sido calentado después del lavado alcalino (Figura 2).

En resumen, los péptidos de unión a ZnO marcados aparecen como buenos marcadores para defectos de composición química sobre sustratos de acero galvanizado y para la verificación de la eficacia del pre-tratamiento.

### 2.2 Caracterización de la superficie de acero galvanizado

Con el fin de averiguar por qué el péptido de unión a ZnO reconoce sustratos desengrasados y/o calentados, con mayor afinidad, se realizaron análisis XPS. La siguiente Tabla 3 (así como la figura) proporciona el porcentaje atómico de cada elemento en la superficie de acero galvanizado sometida a (i) un lavado de acetona/etanol, (ii) un lavado de detergente alcalino y (iii) un lavado alcalino más calentamiento a 260°C. Como se puede observar, el porcentaje atómico del aluminio en el sustrato lavado con una mezcla de acetona y etanol es alto en comparación con el porcentaje de zinc. Este resultado explica por qué la intensidad de fluorescencia es baja. Después del lavado alcalino, el porcentaje atómico de aluminio disminuye drásticamente en beneficio del porcentaje de zinc. Después del lavado alcalino y el calentamiento, el efecto es aún más fuerte, la cantidad de aluminio es casi cero y el porcentaje de zinc alcanza un máximo. En resumen, el porcentaje atómico de zinc y aluminio en las superficies de acero galvanizado está en buena correlación con las intensidades de fluorescencia de los péptidos para ZnO.

Análisis XPS del sustrato Galva Gi206031 en tampón de unión	C1s (% at)	N1s (% at)	O1s (% at)	Al2p (% at)	Ca2p3 (% at)	Cu2p3 (% at)	Zn2p3 (% at)
sustrato sin tratar	61,81	0,78	24,07	9,54	0,17	0	2,55
sustrato desengrasado	46,08	1,44	33,39	0,7	0,26	0,45	15,92
sustrato desengrasado y calentado	50,51	0,51	28	0,23	0	0	19,55

**Tabla 3:** Porcentaje atómico de cada elemento en la superficie de acero galvanizado sometida a (i) un lavado con acetona/etanol (sustrato no tratado), (ii) un lavado de detergente alcalino (sustrato desengrasado) y (iii) un lavado alcalino más un calentamiento a 260°C (sustrato desengrasado y calentado).

5 Para comprobar si los diferentes perfiles de intensidad no se deben a diferencias en la capacidad de humectación del sustrato, se midieron los ángulos de contacto entre el agua y las superficies de acero galvanizado sometidas a diferentes condiciones de lavado. Se determinó un valor de  $79,1^\circ \pm 2,6$  para sustratos lavados con etanol, un valor de  $7,5^\circ \pm 0,2$  para los sustratos lavados con detergente alcalino y un valor de  $73,6^\circ \pm 2,8$  para sustratos desengrasados y calentados. En consecuencia, las diferencias en la intensidad no se deben a diferencias en la capacidad de humectación del sustrato debido a que se puede observar un elevado perfil de intensidad con ángulos de contacto bajos o altos.

### 2.3 Cinética, resistencia y durabilidad de la interacción del péptido para ZnO - superficie de acero galvanizado

15 Se consideraron la cinética, la resistencia y la durabilidad de la interacción del péptido de unión a ZnO con la superficie de acero galvanizado de referencia Gi206031. En ese objetivo, los péptidos para ZnO se mezclaron durante 1,5, 15, o 60 min con el sustrato y después se lavaron durante la noche. Como se muestra en la Figura 3, el reconocimiento es realmente rápido y ha alcanzado su nivel máximo después de 1 min de contacto de unión.

20 A continuación, se investigó la fuerza de unión de péptido de unión a ZnO para el sustrato de acero galvanizado. Los sustratos sumergidos en péptidos de unión de ZnO se lavaron a continuación exhaustivamente con tampón ácido o alcalino y se midió la fluorescencia residual. También se investigó la resistencia térmica de la unión. La Figura 3 muestra que la interacción péptido-sustrato es fuerte, los péptidos persisten sobre el sustrato después de los lavados con tampón a pH 10 y 4. El tratamiento térmico interrumpe solo parcialmente la interacción. Los péptidos solamente se retiran del sustrato galvanizado después de lavados exhaustivos con un tampón de pH 2 o 14. El propio péptido todavía es fluorescente bajo las mismas condiciones de pH y térmicas.

25 A continuación, se investigó la durabilidad del recubrimiento con péptido sobre el acero mediante la medición de la intensidad de los péptidos-fluoresceína unidos sobre las superficies de acero después de 2 semanas. La fluorescencia de la muestra se reduce en un factor de 2 veces después de 2 semanas a temperatura ambiente, pero la fluoresceína sola en las mismas condiciones experimenta a la misma disminución debido a fotoblanqueo (Boxer, 1979).

### 2.4 Adherencia diferencial de los péptidos de unión a ZnO a superficies inorgánicas

30 Con el fin de poner de relieve la adherencia diferencial de los péptidos de unión a ZnO a múltiples superficies, se construyó un sustrato patrón que consistía en una capa de plata de 50 nm depositada mediante PVD sobre una lámina de zinc puro con máscaras en algunos lugares con el fin de mantener los cuadrados de zinc. Sustrato se sometió a tratamiento térmico para formar una capa de óxido y se llevó a cabo la unión. Como se muestra en la Figura 4, el péptido de unión a ZnO reconoce la zona de ZnO con una afinidad diez veces mayor que la zona de óxido de plata. Los bordes del cuadrado son irregulares lo que se pone de manifiesto por la unión del péptido fluorescente.

40 En esta fase, el péptido de unión a ZnO fluorescente aparece como una buena herramienta detectora de defectos sobre las superficies de acero galvanizado. Con el fin de validar este concepto sobre otro tipo de superficies inorgánicas, péptidos se aislaron frente a otras dos superficies inorgánicas (acero inoxidable y  $TiO_2$  amorfo) y se utilizaron para detectar defectos de recubrimiento.

Ejemplo 3: Selección de péptidos de unión a  $TiO_2$  y acero inoxidable y su uso como detectores de control de calidad

#### 3.1 Selección de péptidos de unión a acero inoxidable y $TiO_2$ mediante presentación en fagos

45 Una biblioteca de virus que expresaban secuencias de péptidos al azar se expuso al sustrato inorgánico de interés: superficies de acero inoxidable y  $TiO_2$  amorfo. Se sometieron a ensayo dos bibliotecas diferentes de Biolabs: PhD12 y PhDC7C. Ambas bibliotecas se basan en el bacteriófago M13 que expresa una modificación en la proteína menor

de la cubierta pIII. M13 es un fago filamentoso con una cápsida compuesta de aproximadamente 2.700 copias de la proteína principal de la cubierta (pVIII). La proteína pIII modificada es expresada en un extremo del ensamblaje viral y tiene cinco copias. Al final de cada una de estas copias se encuentra la fusión de péptidos al azar que se utiliza para identificar a través de selección. La biblioteca de presentación en fagos PhD12 utiliza una biblioteca sin restricciones de doce aminoácidos. La biblioteca de presentación en fagos PhDC7C que contiene una biblioteca sin restricciones de siete aminoácidos también se sometió a ensayo. Sin restricciones se refiere al hecho de que la secuencia de péptidos al azar está flanqueada por cisteínas. Las cisteínas forman un enlace disulfuro que fuerza la fusión de péptido a una estructura de tipo anular. Esto limita el espacio de la libertad conformacional disponible para el péptido asegurando así un ajuste más específico al sustrato. Los experimentos se repitieron a continuación con este kit PhDC7C con el fin de seleccionar los péptidos con mayor afinidad por el sustrato. La diversidad de estas bibliotecas es, respectivamente, de  $2,7 \times 10^9$  para el kit PhD 12 y  $1,2 \times 10^9$  para PhDC7C.

### 3.2 Selección de una nueva superficie conformada.

Las primeras etapas de selección se realizaron sobre discos de acero inoxidable o de TiO<sub>2</sub> de 5 mm de diámetro y se tomaron muestras de toda la superficie (caras superior e inferior, más bordes) de los discos sin discriminación entre las caras superior/inferior y los bordes. Los bordes están elaborados de acero inoxidable para ambas muestras, no están recubiertos por TiO<sub>2</sub>. Después de tres rondas de selección sobre un sustrato de parche circular, se llevó a cabo una última ronda de selección en un pocillo de 5 mm profundidad de una lámina de acero inoxidable o TiO<sub>2</sub>. Esta superficie complementaria no muestra bordes y está totalmente recubierta. Al mantener los fagos que no se unen a esta superficie, los autores de la presente invención aislaron péptidos que reconocían acero inoxidable. Por el contrario, al mantener los fagos que reconocen esta superficie, se aislaron los péptidos que reconocían TiO<sub>2</sub>.

### 3.3 Secuenciación después de cuatro rondas de inmunoprecipitación.

En el primer experimento con el kit PhD12, se secuenciaron aproximadamente treinta fagos después de tres o cuatro rondas de selección. La reducción de la diversidad de la biblioteca y el posterior enriquecimiento para la secuencia consenso se reflejan en la siguiente Tabla 4. Esto dio como resultado una secuencia de péptido consenso para el acero inoxidable y TiO<sub>2</sub>. La secuencia peptídica de unión a acero inoxidable MTWDPSLASPRS (SEQ ID NO: 31) se produjo en 70% de los clones y la secuencia peptídica de unión a TiO<sub>2</sub> LNAAVPFTMAGS (SEQ ID NO: 32) en 50% de los clones (Figura 5). Los experimentos de inmunoprecipitación también se realizaron con la biblioteca PhDC7C. Se realizaron tres rondas de selección en el pocillo de 5 mm de profundidad de la lámina de sustrato. La diversidad de la biblioteca disminuyó rápidamente. El número de fagos seleccionados después de tres rondas de selección es cero. La secuenciación se realizó a continuación, después de dos rondas de inmunoprecipitación. No se puso de relieve ninguna secuencia consenso. Este resultado se puede explicar por el hecho de que el bucle de disulfuro imponía una restricción estructural a los péptidos aleatorizados y podía "congelar" una conformación necesaria para la unión a la diana.

Número de fagos	Inicio	Ronda 1	Ronda 2	Ronda 3	Ronda 4
Sustrato de acero inoxidable	$2,7 \cdot 10^9$	$10^7$	$2 \cdot 10^5$	$5 \cdot 10^3$	100
Sustrato de TiO <sub>2</sub>	$2,7 \cdot 10^9$	$10^7$	$2 \cdot 10^5$	100	< 100

**Tabla 4:** Reducción de la diversidad de la biblioteca y posterior enriquecimiento para la secuencia consenso después de hasta cuatro rondas de selección.

### 3.4 Medición de la afinidad de fagos por el sustrato correspondiente

Se emplearon técnicas indirectas para verificar la unión de los fagos que contenían la secuencia de consenso al sustrato de interés. La primera técnica consiste en el etiquetado fluorescente de los fagos que se unen a los sustratos y después la medición de la fluorescencia del sustrato como una medida indirecta de la concentración de fago unido. En primer lugar, los esfuerzos se centraron en la secuencia del péptido consenso que reconocía el acero inoxidable. Los fagos que contenían cualquiera de los péptidos que reconocían TiO<sub>2</sub> o péptido aleatorio se utilizaron para controlar la unión de fondo no selectiva. Los tres fagos fueron etiquetados con fluorescencia utilizando un anticuerpo para el fago (anti-fd biotinilado) que está ligado a un colorante fluorescente (fluoresceína conjugada con estreptavidina a través de la conexión biotina-estreptavidina) (Figura 6A). Se investigó la especificidad del péptido para acero inoxidable. Las mediciones de fluorescencia mostraron aproximadamente una preferencia de 3:1 del péptido para acero inoxidable para el sustrato de acero inoxidable en comparación con el péptido para TiO<sub>2</sub>. La señal de fluorescencia de M13KE con la secuencia de péptido al azar está en el mismo intervalo que el fago con el péptido para TiO<sub>2</sub> (Figura 6B). En segundo lugar, se realizó el mismo experimento sobre sustratos de TiO<sub>2</sub> y se obtuvieron los mismos resultados (datos no presentados).

La segunda técnica es la titulación. La titulación es una técnica cuantitativa para medir el número de fagos que se

unen a un sustrato. No fue necesario ningún anticuerpo o colorante fluorescente para la titulación. Los autores de la presente invención sacaron ventajas del gen *lacZ* presente en el genoma del fago para el recuento de los fagos que reconocían el sustrato sobre placas de IPTG//X-gal. Aquí los autores de la presente invención se centraron en los fagos que contenían el péptido para  $\text{TiO}_2$  con el fin de caracterizar su afinidad por el sustrato  $\text{TiO}_2$ . Las placas resultantes indicaron una preferencia de 3:1 para el sustrato de  $\text{TiO}_2$  en comparación con el sustrato de acero inoxidable (Figura 6C). Estos últimos resultados están de acuerdo con los valores de intensidad obtenidos previamente con anticuerpos fluorescentes para M13.

### 3.5 Medición de la afinidad de péptidos sintéticos por el sustrato correspondiente.

Con el fin de caracterizar la afinidad del péptido sintetizado químicamente (EGT, Lieja, Bélgica) por su sustrato, se añadió un colorante de fluoresceína en el extremo N-terminal del péptido. El reconocimiento de GEPI-  $\text{TiO}_2$  para el sustrato de  $\text{TiO}_2$  es bajo (Figura 7A), así como el reconocimiento de GEPI-acero inoxidable para el sustrato de acero inoxidable (Figura 7B). La baja eficacia de unión del péptido sintético para el sustrato correspondiente podría explicarse por el hecho de que el extremo C del péptido era neutro y fusionado en el fago que era libre y de carga negativa en el péptido sintético, lo que puede suprimir por completo la unión. Para confirmar esta hipótesis, se sometió a amidación el carboxilato C-terminal del péptido sintético para bloquear la carga negativa. Las figuras 7A y 7B muestran que amidación aumenta drásticamente la interacción de los péptidos sintéticos para sus respectivos sustratos.

### 3.6 Análisis cuantitativos de la afinidad del péptido de unión a acero inoxidable/ $\text{TiO}_2$ por el sustrato correspondiente por QCM-D

El comportamiento de adsorción del péptido de unión a acero inoxidable/ $\text{TiO}_2$  sobre un electrodo de acero inoxidable/ $\text{TiO}_2$  fue estudiado por QCM-D y demostró que los péptidos sintéticos se adsorben sobre la superficie del electrodo con diferentes afinidades: desplazamiento de frecuencia después de la adsorción de los péptidos para  $\text{TiO}_2$  sobre sustratos de  $\text{TiO}_2$  es igual a 25 Hz, mientras que el desplazamiento de frecuencia después de la adsorción de los péptidos para acero inoxidable sobre sustratos de acero inoxidable es igual a 5 Hz (Figuras 8 y 9) lo que significa que los péptidos de unión a  $\text{TiO}_2$  tienen una mayor afinidad por sus sustratos que los péptidos para acero inoxidable por sustrato de acero inoxidable. Por otra parte, el péptido de unión a  $\text{TiO}_2$  tiene una buena remanencia sobre su soporte durante el lavado, mientras que los péptidos para acero inoxidable no lo hacen. Por otra parte, se debe observar que la amidación de los péptidos de unión a acero inoxidable o  $\text{TiO}_2$  conduce a una mayor afinidad por sus sustratos o a un aumento de la resistencia al lavado.

### 3.7 Adherencia diferencial de péptidos que se unen $\text{TiO}_2$ /acero inoxidable a múltiples superficies.

El sustrato modelado que consiste en un recubrimiento de PVD de  $\text{TiO}_2$  de 50 nm sobre la parte derecha de un sustrato de lámina de acero inoxidable, quedando la parte izquierda de acero inoxidable mostró que el péptido para  $\text{TiO}_2$  tiene un perfil de reconocimiento 3 veces más alto para la zona de sustrato de  $\text{TiO}_2$  en comparación con la zona de acero inoxidable (Figura 10). Como se muestra en la Figura 8, los péptidos que se unen a  $\text{TiO}_2$  sólo tienen una baja afinidad por los sustratos de acero inoxidable. El desplazamiento de frecuencia después de la adsorción es de aproximadamente 2 Hz, que es demasiado pequeño para ser detectado por fluorescencia. Por consiguiente, las pequeñas zonas fluorescentes observadas sobre la zona de acero inoxidable de la Figura 10 después de la adsorción del péptido de unión a  $\text{TiO}_2$  no se deben a una falta de especificidad de los péptidos de unión a  $\text{TiO}_2$ , sino que se deben probablemente a una pequeña contaminación durante el recubrimiento. Al mismo tiempo, los péptidos de unión a acero inoxidable se incubaron sobre el mismo sustrato modelado y también se observó un perfil de reconocimiento 3 veces más alto para la zona de acero inoxidable en comparación con la zona de  $\text{TiO}_2$  (datos no mostrados).

## 4. Clasificación de nanopolvo

### 4.1 Clasificación de polvos insolubles inorgánicos de diferente composición química de acuerdo con la invención

De acuerdo con la invención, los péptidos de unión a materiales inorgánicos fueron utilizados en un esfuerzo por aislar la forma química de interés en una mezcla de polvos inorgánicos. La mezcla de polvo inorgánico tiene que ser insoluble y dispersarse bien en medios acuosos para asegurar un buen reconocimiento. En este ejemplo, se utilizó el péptido de unión a ZnO (VRTRDDARTHCK) identificado por Kjaergaard en 2000 y sintetizado por Genescript (Piscataway, USA) para aislar la forma química de ZnO de una mezcla de polvos insolubles de ZnO y  $\text{Cu}_2\text{O}$ . En ese objetivo, un grupo amino del péptido de unión a ZnO (120  $\mu\text{g}$ ) se unió primero al grupo epoxi de las cuentas magnéticas Dynabeads M-270 (6 mg,  $4 \cdot 10^8$  cuentas) (Invitrogen) de acuerdo con el procedimiento del fabricante. La unión del péptido a las cuentas magnéticas se visualizó por microscopía óptica bajo fluorescencia gracias al colorante FITC anclado al extremo N-terminal del GEPI para ZnO. A continuación se incubó un exceso de cuentas funcionalizadas con péptido durante 1 h con una mezcla de polvo de ZnO y  $\text{Cu}_2\text{O}$  bien dispersado (véase la Tabla 5 para las respectivas cantidades). Se determinaron los parámetros de dispersión óptima (Tween 20 al 1,5%, sonicación a 30% durante 5 minutos) de los polvos insolubles tanto de ZnO como de  $\text{Cu}_2\text{O}$  por granulometría (Malverne Mastersizer 2000). Una vez que las cuentas funcionalizadas están en contacto con la mezcla de polvo, el polvo insoluble de ZnO debe unirse a las cuentas magnéticas funcionalizadas, mientras que el polvo de  $\text{Cu}_2\text{O}$  debe

permanecer en el flujo. Después de 1 h de incubación de las cuentas funcionalizadas con la mezcla de polvo, las cuentas se lavaron con tampón PBS y las cuentas y el tampón se separaron por magnetización. Esta etapa de lavado/separación se repitió 10 veces. La composición química de la agrupación de fracciones lavadas se analizó por adsorción atómica. Los polvos unidos a las cuentas magnéticas funcionalizadas se hicieron eluir por medio de un tampón de citrato (pH 3, 0,1 M) y se separaron por magnetización. Se realizaron dos etapas de elución. La agrupación de fracciones eluidas se analizó por adsorción atómica. La composición química de las fracciones iniciales así como de las fracciones lavadas (10 veces con PBS) y eluidas (pH 3, solución de citrato 0,1 M) se proporcionan en la Tabla 5. El experimento se repitió varias veces con una cantidad fija de cuentas y diversas cantidades de ZnO y Cu<sub>2</sub>O. Dos ejemplos de los resultados se dan en la Tabla 5.

Experimento 1	Zn (mg/l)	Cu (mg/l)	% Zn	% Cu
Cantidad inicial	900	4415	100	100
Fracciones lavadas	421	5319	46,7	120,4
Fracciones eluidas	543	154,1	60,2	3,4
Experimento 2	Zn (mg/l)	Cu (mg/l)	% Zn	% Cu
Cantidad inicial	3450	5400	100	100
Fracciones lavadas	1336	5572	40,1	103
Fracciones eluidas	1825	49,5	52,8	0,9

**Tabla 5:** Separación de polvo insoluble de ZnO de una mezcla de ZnO:Cu<sub>2</sub>O a través de péptidos de unión a materiales inorgánicos de ZnO unido a cuentas magnéticas. Análisis de adsorción atómica de la composición de Cu y Zn en las fracciones iniciales, lavadas o eluidas.

Estos resultados demuestran que los péptidos de unión a materiales inorgánicos se pueden utilizar como herramientas para separar un polvo inorgánico insoluble de una mezcla de polvos insolubles de diversas composiciones químicas. En este ejemplo, la clasificación se lleva a cabo gracias al péptido de unión a ZnO unido a cuentas magnéticas. La mezcla de ZnO:Cu<sub>2</sub> inicial se enriquece en forma de ZnO en un factor de 18 (experimento 1) a 58 (experimento 2) veces en un procedimiento de una etapa dependiendo de la cantidad inicial de ZnO y Cu<sub>2</sub>O.

#### 4.2 Pruebas preliminares con polvos de ZnO y Cu<sub>2</sub>O

Las pruebas preliminares se realizaron con polvos de ZnO y Cu<sub>2</sub>O. El objetivo del experimento era separar el polvo de ZnO de una mezcla insoluble de péptido de unión a ZnO y Cu<sub>2</sub>O. El péptido de unión a ZnO descrito previamente en esta solicitud se preparó en cantidades adecuadas y se ancló a través de su grupo amino sobre el grupo epoxi de cuentas magnéticas de acuerdo con el procedimiento de fabricación (Dynabeads, Invitrogen). El péptido inorgánico medió la interacción entre las cuentas magnéticas y el polvo diana. Las cuentas magnéticas funcionalizadas con el péptido se pusieron en contacto con la mezcla de ZnO y Cu<sub>2</sub>O y se utilizaron para aislar el polvo de ZnO de la mezcla de ZnO-Cu<sub>2</sub>O mediante por simple magnetización. El procedimiento completo de reconocimiento y separación se describe en detalle más arriba. Además, esta tecnología se puede ampliar a la clasificación de otras partículas insolubles inorgánicos incluyendo, pero no limitadas a Fe(1O3)3, titanato de bario y nanotubos de carbono. El GEPI que reconoce el polvo de interés tiene que ser aislado primero mediante presentación de fagos. Una vez identificados, la especificidad del péptido inorgánico tiene que ser destacada.

#### 4.3 Pruebas preliminares con nanopolvos de Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

Las pruebas preliminares se ejecutan con nanopolvos de Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> de forma cristalina rombohédrica o cúbica (tamaño 20-30 nm). Los péptidos de unión a materiales inorgánicos que reconocen específicamente cada una de las 2 formas cristalográficas se seleccionan utilizando técnicas de presentación de fagos. Se someten a ensayo dos bibliotecas diferentes de Biolabs: PhD12 y PhDC7C. Ambas bibliotecas se basan en el bacteriófago M13 que expresa una modificación en la proteína menor de la cubierta pIII. M13 es un fago filamentoso con una cápsida compuesta de aproximadamente 2.700 copias de la proteína principal de la cubierta (pVIII). Cinco copias de la proteína pIII modificada se expresan en un extremo del ensamblaje viral y al final de cada una de estas copias es la fusión de péptidos al azar la que los autores de la presente invención tratan de identificar a través de la selección.

Una vez que se identifican y se preparan en cantidades adecuadas los 2 péptidos que reconocen específicamente

5 cada una de las 2 formas cristalográficas, éstos se anclan sobre la superficie de partículas con altas movilidades magnetoforéticas. El péptido de unión a materiales inorgánicos media la interacción entre la partícula magnética y la nanopartícula objetivo. Los péptidos de unión a materiales inorgánicos están anclados sobre nanopartículas de óxido de hierro encapsuladas en sílice modificada con amina o ácido carboxílico. Las partículas magnéticas también llevan un marcador luminiscente. Otro enfoque consiste en injertar el péptido de unión a materiales inorgánicos sobre cuentas de agarosa y ejecutar la clasificación del nanopolvo diana fuera de la suspensión acuosa después de un procedimiento por lotes o en columna.

La tecnología se puede ampliar a la clasificación de otras nanopartículas incluyendo, pero no limitadas a, nanotubos de  $\text{Fe}(\text{IO}_3)_3$ , titanato de bario (óxidos ferro-eléctricos), y carbono.

## 10 Referencias

- Brown, S. (1997) *Nature Biotechnology* (15), 269-272
- Chen, H., Su, X., Neoh, K. G., Choe, W. S. (2006) *Anal. Chem.* 78(14): 4872-4879
- Gaskin, D. J. H., Starck, K., Vulfson, E. N. (2000) *Biotechnology Letters* 22: 1211-1216,
- 15 Józszai V, Nagy Z, Osz K, Sanna D, Di Natale G, La Mendola D, Pappalardo G, Rizzarelli E, Sóvágó I. *J Inorg Biochem.* 2006 Agosto; 100(8): 1399-409. Transition metal complexes of terminally protected peptides containing histidyl residues.
- Lee, W. S., Mao, C., Flynn, C. E., Belcher, A. M. (2002) *Science* (296), 892-895.
- Mao, C., Flynn, C. E., Hayhurst, A., Sweeney, R., Qi, J., Georgiou, G., Iverson B., Belcher, A. M. (2003) *PNAS* 100(12): 6946-6951
- 20 Mao, C., Solis, D. J., Reiss, B. D., Kottmann, T., Sweeney, R. Y., Hayhurst, A., Georgiou, G., Iverson B., Belcher, A. M. (2004). *Science* (303), 213-217.
- Naik, R. R., Lawrence, L. B., Clarson, S. J., Stone, M. O. (2002) *Journal of nanoscience and nantechnology* 2: 95-100
- Oren EE, Tamerler C, Sarikaya M.1: *Nano Lett.* 2005 Mar; 5(3): 415-9. Metal recognition of septapeptides via polypod molecular architecture.
- 25 Sanghvi, A. B., Miller, K., Belcher, M. A., Schmidt, C. (2005) *Nature Materials* 4: 496-502
- Sano, K. y Shiba, K. (2003) *J. Am. Chem. Soc.* 125 : 14234-14235
- Schembri, M. A., Kjaergaard, K. K., Klemm, P. (1999) *FEMS Microbial Lett.* 170, 363-371
- Tamerler, C. y Sarikaya, M. (2007) *Acta Biomaterialia* 3(3): 289-99.
- 30 Wang, S., Humphreys, E., Jagota, A. (2003) *Nature Materials* 2: 196-200
- Zuo, R., Ornek, D., Wood, T. (2005) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 68 : 505-509
- Kjaergaard, K., Sorensen, J., Schembri, M., Klemm, P. (2000). *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 10-14.
- Dincer S, Tamerler C, Oren EE, Sarikaya M, datos no publicados.
- Whaley S., English, D., Hu, E., Barbara, P., Belcher, A. (2000) *Nature*, 405, 665-668.
- 35 Xu, Z., Jinchun, C., Peng, Y., Wantai, Y. (2005). *J. Inorg. Biochem.* (99), 1692-1697.

**Listado de secuencias**

<110> Université de Liège ArcelorMittal Liège Research

<120> Péptidos de unión a materiales inorgánicos y métodos de control de calidad que los usan

<130> R1943 PCT

5 <150> US61/078,348

<151> 2008-07-04

<150> US61/090,300

<151> 2008-08-20

<160> 32

10 <170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 14

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: péptido de unión a material inorgánico"

<400> 1

Met His Gly Lys Thr Gln Ala Thr Ser Gly Thr Ile Gln Ser  
1 5 10

<210> 2

20 <211> 21

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: péptido de unión a material inorgánico"

25 <400> 2

Ser Lys Thr Ser Leu Gly Gln Ser Gly Ala Ser Leu Gln Gly Ser Glu  
1 5 10 15

Lys Leu Thr Asn Gly  
20

<210> 3

<211> 7

<212> PRT

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: péptido de unión a material inorgánico"

<400> 3

Asp Arg Thr Ser Thr Trp Arg  
1 5

35 <210> 4

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

40 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: péptido de unión a material inorgánico"

<400> 4

Gln Ser Val Thr Ser Thr Lys  
1 5

<210> 5

<211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 5 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: péptido de unión a material inorgánico"  
  
 <400> 5  
 Ser Val Thr Gln Asn Lys Tyr  
 1 5  
  
 <210> 6  
 <211> 7  
 10 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: péptido de unión a material inorgánico"  
  
 <400> 6  
 15 Ser Pro His Pro Gly Pro Tyr  
 1 5  
  
 <210> 7  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 20 <220>  
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: péptido de unión a material inorgánico"  
  
 <400> 7  
 Val Pro Ser Ser Gly Pro Gln Asp Thr Gly Thr Thr  
 1 5 10  
  
 <210> 8  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 25 <220>  
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: péptido de unión a material inorgánico"  
  
 <400> 8  
 30 Ala Tyr Ser Ser Gly Ala Pro Pro Met Pro Pro Phe  
 1 5 10  
  
 <210> 9  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 35 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: péptido de unión a material inorgánico"  
  
 <400> 9  
 Asn Pro Ser Ser Leu Phe Arg Tyr Leu Pro Ser Asp  
 1 5 10  
  
 40 <210> 10  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 45 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: péptido de unión a material inorgánico"  
  
 <400> 10  
 Met Ser Pro His Pro His Pro Arg His His His Thr  
 1 5 10

- <210> 11  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial
- 5 <220>  
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: péptido de unión a material inorgánico"
- <400> 11  
 Arg Gly Arg Arg Arg Leu Ser Cys Arg Leu Leu  
 1 5 10
- 10 <210> 12  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial
- <220>  
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: péptido de unión a material inorgánico"
- 15 <400> 12  
 Lys Pro Ser His His His His His Thr Gly Ala Asn  
 1 5 10
- <210> 13  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 20 <213> Secuencia artificial
- <220>  
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: péptido de unión a material inorgánico"
- <400> 13  
 Val Lys Thr Gln Ala Thr Ser Arg Glu Glu Pro Pro Arg Leu Pro Ser  
 1 5 10 15
- Lys His Arg Pro Gly  
 20
- 25 <210> 14  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial
- <220>  
 30 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: péptido de unión a material inorgánico"
- <400> 14  
 Met Asp His Gly Lys Tyr Arg Gln Lys Gly Ala Thr Pro Gly  
 1 5 10
- <210> 15  
 <211> 16  
 35 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial
- <220>  
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: péptido de unión a material inorgánico"
- <400> 15  
 Asn Thr Arg Met Thr Ala Arg Gln His Ala Asn His Lys Ser Thr Gln  
 40 1 5 10 15
- <210> 16  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial
- 45 <220>

<223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: péptido de unión a material inorgánico"

<400> 16  
Val Arg Thr Arg Asp Asp Ala Arg Thr His Arg Lys  
1 5 10

5 <210> 17  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: péptido de unión a material inorgánico"

10 <400> 17  
His Thr Gln Asn Met Arg Met Tyr Glu Pro Trp Phe  
1 5 10

<210> 18  
<211> 12  
<212> PRT  
15 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: péptido de unión a material inorgánico"

<400> 18  
Asp Val Phe Ser Ser Phe Asn Leu Lys His Met Arg  
1 5 10

20 <210> 19  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
25 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: péptido de unión a material inorgánico"

<400> 19  
Val Val Arg Pro Lys Ala Ala Thr Asn  
1 5

<210> 20  
<211> 9  
30 <212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: péptido de unión a material inorgánico"

<400> 20  
Arg Ile Arg His Arg Leu Val Gly Gln  
1 5

35 <210> 21  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
40 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: péptido de unión a material inorgánico"

<400> 21  
Arg Lys Leu Pro Asp Ala Pro Gly Met His Thr Trp  
1 5 10

<210> 22  
<211> 9  
45 <212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: péptido de unión a material inorgánico"

<400> 22  
 Cys His Lys Lys Pro Ser Lys Ser Cys  
 1 5

5 <210> 23  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: péptido de unión a material inorgánico"

<400> 23  
 Arg Arg Thr Val Lys His His Val Asn  
 1 5

15 <210> 24  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: péptido de unión a material inorgánico"

<400> 24  
 Ala Gln Asn Pro Ser Asp Asp Asn Asn Thr His Thr His  
 1 5 10

20 <210> 25  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: péptido de unión a material inorgánico"

<400> 25  
 Arg Leu Gln Leu Ala Ile Pro Leu Gln Gly Ser Gly  
 1 5 10

30 <210> 26  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: péptido de unión a material inorgánico"

<400> 26  
 Thr Pro Pro Arg Pro Ile Gln Tyr Asn His Thr Ser  
 1 5 10

40 <210> 27  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: péptido de unión a material inorgánico"

<400> 27  
 Asn Asn Pro Met His Gln Asn  
 1 5

45 <210> 28  
 <211> 12  
 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: péptido de unión a material inorgánico"

<400> 28

5 His Trp Ser Ala Trp Trp Ile Arg Ser Asn Gln Ser  
 1 5 10

<210> 29

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: péptido de unión a material inorgánico"

<400> 29

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

<210> 30

15 <211> 20

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: péptido de unión a material inorgánico"

20 <400> 30

ccctcatagt tagcgtaacg 20

<210> 31

<211> 12

<212> PRT

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: péptido de unión a material inorgánico"

<400> 31

Met Thr Trp Asp Pro Ser Leu Ala Ser Pro Arg Ser  
 1 5 10

30 <210> 32

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

35 <223> /nota="Descripción de la secuencia artificial: péptido de unión a material inorgánico"

<400> 32

Leu Asn Ala Ala Val Pro Phe Thr Met Ala Gly Ser  
 1 5 10

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para el aislamiento de partículas de polvo que comprenden una entidad inorgánica de interés de una mezcla de partículas de polvo, que comprende las etapas de:
- 5 (a) poner en contacto el polvo con un péptido de unión a materiales inorgánicos capaz de unirse específicamente a la entidad inorgánica de interés,
- y
- (b) aislar las partículas de polvo a las que se ha unido el péptido de unión a materiales inorgánicos.
2. El método de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente la etapa de anclar el péptido de unión a materiales inorgánicos a un soporte sólido.
- 10 3. El método de la reivindicación 2, en donde el soporte sólido se selecciona entre una cuenta magnética, una resina, una tela o una membrana.
4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el péptido de unión a materiales inorgánicos es específico para al menos una de una composición química, una morfología o una forma cristalográfica de la entidad inorgánica de interés.
- 15 5. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la entidad inorgánica de interés es un metal, un óxido de metal, un material semiconductor, o carbono.
6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la entidad inorgánica de interés consiste en al menos un material seleccionado del grupo que consiste en aluminio, antimonio, berilio, cadmio, cobre, cromo, oro, hierro, plomo, selenio, paladio, platino, acero inoxidable, titanio, zinc, silicio, germanio; óxidos de los materiales anteriores; y carbono.
- 20 7. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende además las etapas de
- (a1) seleccionar un péptido contra la entidad inorgánica de interés por medio de tecnologías de presentación que es capaz de unirse específicamente a la entidad inorgánica de interés; y
- (a2) sintetizar o expresar el péptido de unión a materiales inorgánicos seleccionado en (a1), que se va a
- 25 llevar a cabo antes de la etapa (a).
8. El método de la reivindicación 7, en donde el péptido de unión a materiales inorgánicos se selecciona por medio de presentación en fagos, presentación en células bacterianas o de levadura o presentación in vitro.
9. Un péptido de unión a materiales inorgánicos que comprende la secuencia de aminoácidos MTWDPSLASPRS (SEQ ID NO: 31).
- 30 10. Un péptido de unión a materiales inorgánicos que comprende la secuencia de aminoácidos LNAVPFTMAGS (SEQ ID NO: 32).
11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde la entidad inorgánica de interés es  $TiO_2$  y el péptido de unión a materiales inorgánicos capaz de unirse específicamente a dicha entidad inorgánica de interés es el péptido de la reivindicación 10.

35

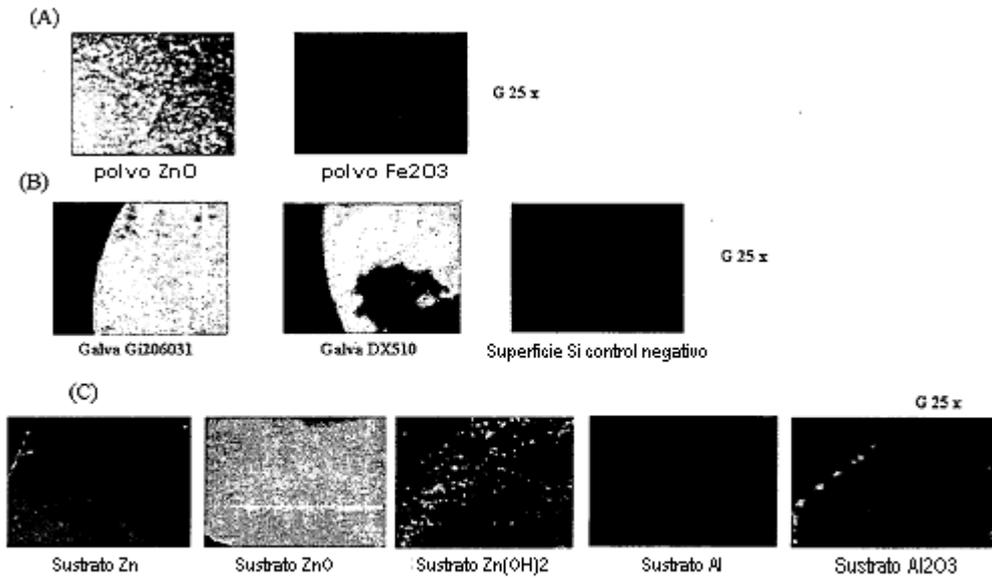


Figura 1



Intensidad de fluorescencia de fluoresceína (485/535 nm)	50000	250000	700000
--	-------	--------	--------

Análisis XPS de sustrato Galva Gi206031 en tampón de unión	C1s (% at)	N1s (% at)	O1s (% at)	Al2p (% at)	Ca2p3 (% at)	Cu2p3 (% at)	Zn2p3 (% at)
Sustrato no tratado	61,81	0,78	24,07	9,54	0,17	0	2,55
Sustrato desengrasado	46,08	1,44	33,39	0,7	0,26	0,45	15,92
Sustrato desengrasado y calentado	50,51	0,51	28	0,23	0	0	19,55

Figura 2

GEPI ZnO - Galva G206031



Tiempo de mezcla:

1 min	5 min	15 min	60 min
188000	194000	220000	230000

GEPI ZnO - Galva G206031

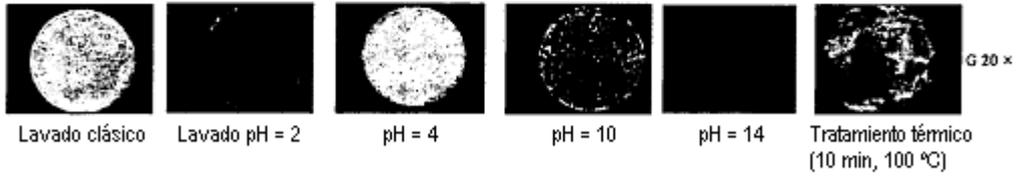


Figura 3

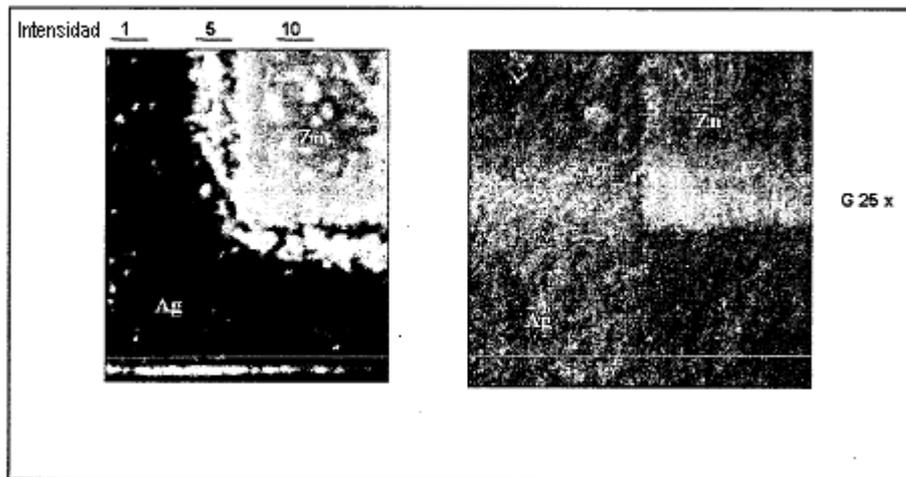


Figura 4

Número de fagos	Inicio	Ronda 1	Ronda 2	Ronda 3	Ronda 4
Sustrato de acero inoxidable	$2,7 \cdot 10^9$	$10^7$	$2 \cdot 10^5$	$5 \cdot 10^3$	100
Sustrato de TiO <sub>2</sub>	$2,7 \cdot 10^9$	$10^7$	$2 \cdot 10^5$	100	< 100'

**Disminución de la diversidad de la biblioteca ronda a ronda**

**Enriquecimiento en secuencia consenso**

Secuencia consenso para acero inoxidable  
 MTWDPSLASPRS (SEQ ID NO:31)

Secuencia consenso para TiO<sub>2</sub> después de 4 rondas de selección:  
 LNAAVPFTMAGS (SEQ ID NO:32)

**Figura 5**

(A)



Estreptavidina-fluoresceína  
 Ab anti-fd biotinilado  
 Fagos ( $10^{10}$ ) con secuencia de péptido consenso  
 Sustrato de acero inoxidable

(B) 620 x

Fago que contiene secuencia consenso para acero inoxidable



48,3



49

Fago que contiene secuencia consenso para Ti



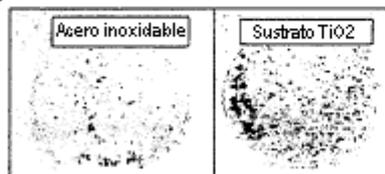
18,2

Fago con secuencia al azar



18,7

(C)



**Figura 6**

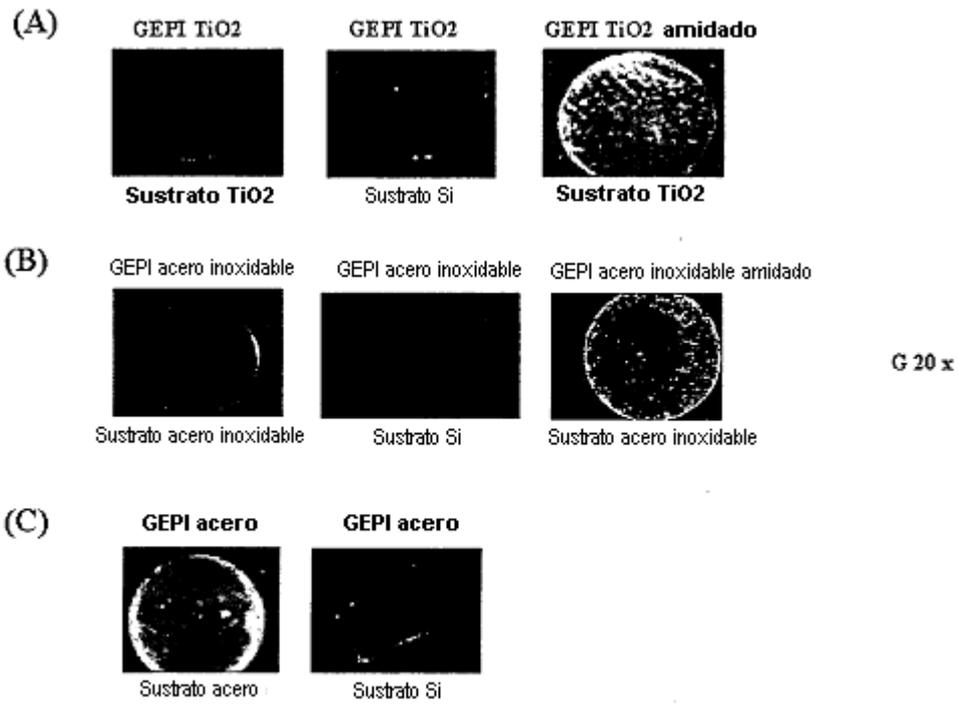


Figura 7

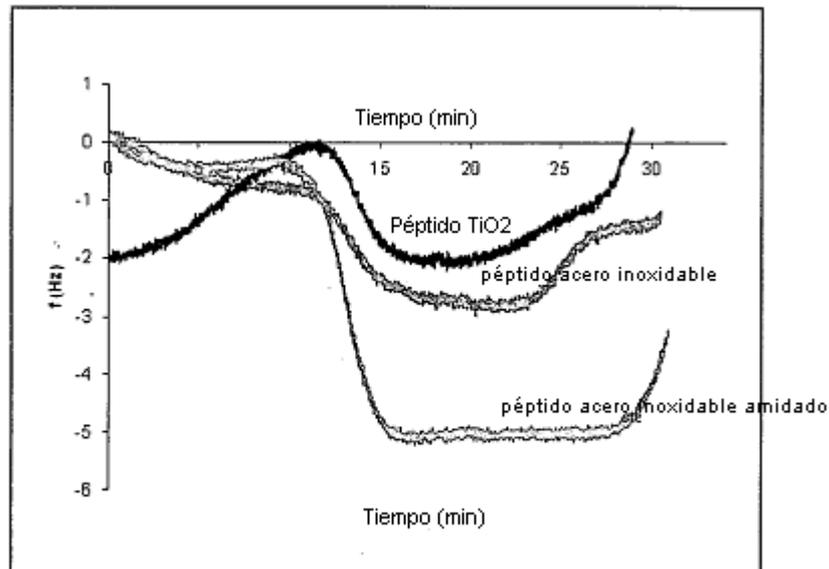


Figura 8

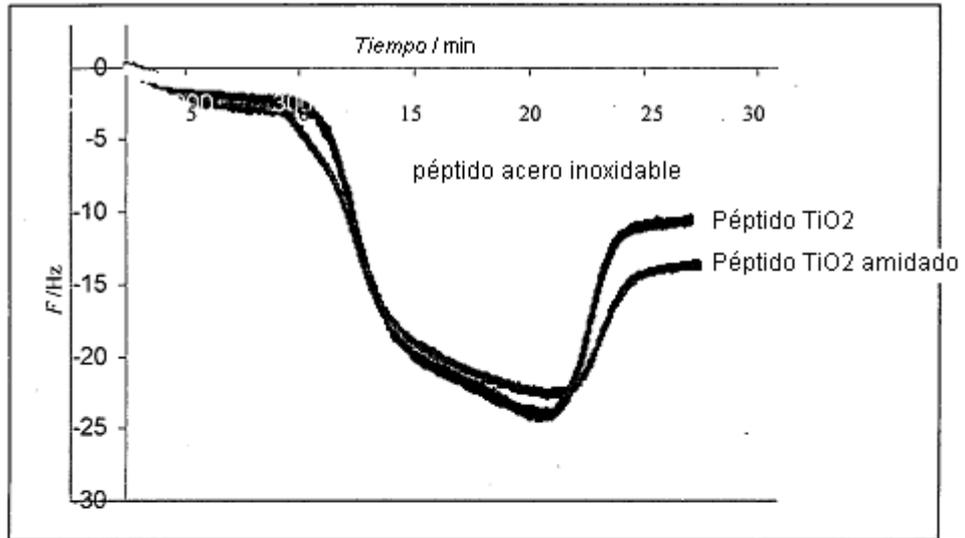


Figura 9

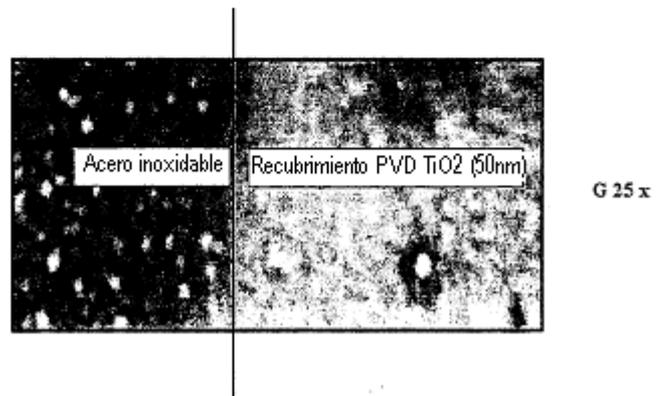
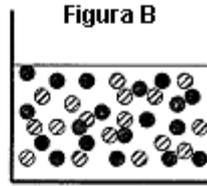
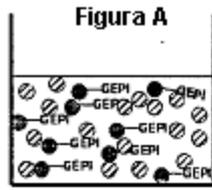
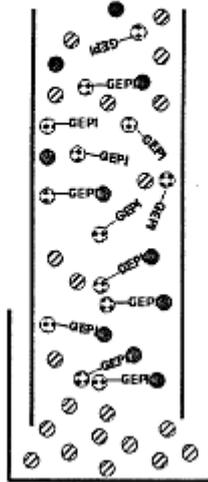
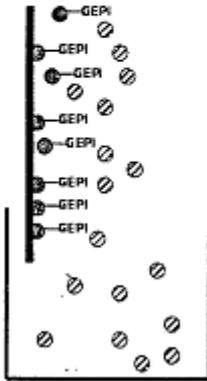


Figura 10

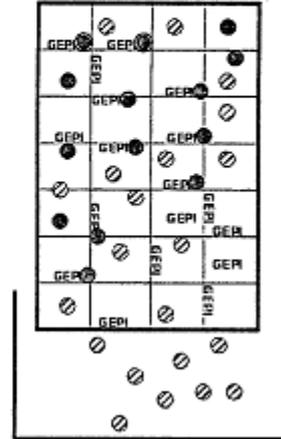


**Figura B 1**

**Figura A 1**



**Figura B 2**



**Figura 11**