

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 603 589**

51 Int. Cl.:

**C40B 40/06** (2006.01)

**C12N 15/10** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.11.2012 PCT/EP2012/072178**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.05.2014 WO14071978**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.11.2012 E 12784580 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.10.2016 EP 2917388**

54 Título: **Ácidos nucleicos que codifican polipéptidos quiméricos para la identificación sistemática de bibliotecas**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**28.02.2017**

73 Titular/es:

**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)  
Grenzacherstrasse 124  
4070 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**CASAGOLDA VALLRIBERA, DAVID;  
KRONER, FRANK y  
SCHRAEML, MICHAEL**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 603 589 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

Ácidos nucleicos que codifican polipéptidos quiméricos para la identificación sistemática de bibliotecas

5 La presente divulgación se refiere a una biblioteca de polipéptidos quiméricos que comprende uno o más fragmentos de la familia de peptidil-prolil cis/trans isomerasa o FKBP que presenta uno o más polipéptidos en uno o más miembros de FKBP y a su uso en métodos para la identificación sistemática y selección de sustitutos de péptido restringido que presentan actividad de unión frente a moléculas diana predeterminadas.

10 Antecedentes de la invención

Además de anticuerpos específicos de diana, existe una necesidad en las ciencias biológicas y en los campos aplicados relacionados de moléculas de polipéptido capaces de realizar interacciones de proteína-proteína específicas. En particular, existe el deseo de evitar generaciones de anticuerpos en animales y centrar el descubrimiento en identificar dominios polipeptídicos que se unan a una diana predeterminada. Sin embargo, un obstáculo importante de los polipéptidos es su flexibilidad intrínseca. Éste es en particular el caso de los polipéptidos lineales cortos, por ejemplo, secuencias de aminoácidos que comprenden de aproximadamente 5 a aproximadamente 50 aminoácidos. Como solución, los polipéptidos lineales cortos suelen hacer la transición a un gran número de estados estructurales que son casi equivalentes energéticamente. Aunque en algunos casos las conformaciones ligeramente preferentes pueden ser más frecuentes, por lo general son altamente dependientes del entorno.

En el campo de anticuerpos y fragmentos de anticuerpos, se conoce la técnica de uso de un armazón para modificar por ingeniería dominios polipeptídicos presentados por el armazón. Por lo tanto, se han diseñado ampliamente por ingeniería dominios tales como bucles variables de regiones de unión a antígenos de anticuerpos para producir segmentos de secuencia de aminoácidos que tengan una unión mejorada (por ejemplo, afinidad y/o especificidad) a dianas conocidas (por ejemplo, desvelado en Knappik, A. y Plückthun A. J. Mol. Biol. 296 (2000) 57-86; EP 1025218). Por ejemplo, la modificación por ingeniería de marcos que no son anticuerpos, se ha revisado en Hosse, R.J. *et al.*, Protein Sci., 15 (2006) 14-27. Los armazones de proteínas que no son anticuerpo o alternativos tienen ventajas considerables con respecto a los anticuerpos tradicionales debido a su pequeño tamaño, estabilidad elevada y capacidad para expresarse en hospedadores procariontes. Los nuevos métodos de purificación se aplican fácilmente; se conjugan fácilmente con fármacos/toxinas, penetran de forma eficaz en tejidos y se formatean fácilmente en aglutinantes mono o multiespecíficos (Skerra, A, *et al.*, J. Mol. Recognit. 13 (2000) 409-410; Binz, H.K. *et al.*, Nature Biotechnol. 23 (2005) 1257- 1268).

El establecimiento de una técnica de plataforma consistente para desarrollar de forma específica polipéptidos restringidos capaces de unirse a una diana de una manera más eficaz en comparación con polipéptidos lineales es un desafío técnico. Para la identificación y selección de estructuras (líder) deseadas se conocen métodos de presentación evolutiva que incluyen presentación de fagos, presentación de ribosomas, presentación de ARNm y presentación de superficie celular. Tales métodos se pueden aplicar para seleccionar y optimizar los polipéptidos de unión a diana a partir de bibliotecas con un gran número de secuencias de aminoácidos candidatas.

45 Knappe, T.A., *et al.*, (J. Mol. Biol. 368 (2007) 1458-1468) informaron que la región Flap de FKBP12 se puede sustituir por el dominio de IF de la chaperona de SlyD de *E. coli* relacionada estructuralmente. El polipéptido quimérico de FKBP12-SlyD presenta un aumento de 200 veces de la actividad de peptidil-prolil cis/trans isomerasa en comparación con el polipéptido aislado.

El SlyD y FKBP12 de *E. coli* (C23A y C23S de tipo silvestre y mutantes) se pueden producir de forma recombinante en *E. coli* con alto rendimiento en forma soluble (Standaert, R.F., *et al.*, Nature 346 (1990) 671-674).

El FKBP derivado de organismos termófilos y SlyD de *E. coli* se puede usar como chaperonas en la expresión recombinante de polipéptidos quiméricos en *E. coli* (Ideno, A., *et al.*, Appl. Microbiol. Biotechnol. 64 (2004) 99-105). Los polipéptidos SlyD y FKBP12 de *E. coli* son polipéptidos que se pueden plegar de forma reversible (Scholz, C., *et al.*, J. Biol. Chem. 271 (1996) 12703-12707).

Low C., *et al.*, J. Mol. Biol. 398 (2010) 375-390 informan sobre la estructura cristalina y la caracterización funcional de SlyD de metalochaperona de *Thermus thermophilus*.

La secuencia de aminoácidos del polipéptido FKBP12 comprende un único resto de triptófano en la posición 60. Por lo tanto, los mutantes de FKBP12 se pueden analizar para integridad estructural simplemente analizando la fluorescencia del triptófano (DeCenzo, M.T., *et al.*, Protein Eng. 9 (1996) 173-180). Se puede realizar un ensayo de actividad catalítica restante del mutante de FKBP12 determinando la actividad restante de rotamasa (Brecht, S., *et al.*, Neuroscience 120 (2003) 1037-1048; Schories, B., *et al.*, J. Pept. Sci. 13 (2007) 475-480; Timerman, A.P., *et al.*, J. Biol. Chem. 270 (1995) 2451-2459). También es posible determinar la integridad estructural de mutantes de FKBP12 determinando la unión a FK506 o Rapamicina (DeCenzo, M.T., *et al.*, Protein Eng. 9 (1996) 173-180).

McNamara, A., *et al.*, (J. Org. Chem. 66 (2001) 4585-4594) informaron sobre péptidos restringidos por una unión alifática entre dos sitios C (alfa): diseño, síntesis, y propiedades de conformación inesperadas de un péptido unido en  $i, (i+4)$ .

5 Suzuki, *et al.*, (Suzuki, R., *et al.*, J. Mol. Biol. 328 (2003) 1149-1160) informan sobre la estructura de solución tridimensional de una FKBP arcaica con una doble función de actividades de peptidil-prolil-cis-trans isomerasa y chaperona. En el documento EP 1 516 928 se informa sobre el vector de expresión, hospedador, polipéptido fusionado, proceso para producir un polipéptido fusionado y proceso para producir proteína. Knappe, T. A., *et al.*, informan que la inserción de un dominio de chaperona convierte FKBP 12 en un potente catalizador de plegamiento de proteínas (J. Mol. Biol. 368 (2007) 1458-1468). En el documento WO 2007/077008 se informa sobre un polipéptido quimérico con actividades superiores de chaperona y plegamiento. En el documento WO 03/000878 se describe el uso de chaperonas de FKBP como herramienta de expresión. En el documento EP 1 621 555 se informa sobre un inmunógeno, composición para uso inmunológico y método para producir anticuerpo usando los mismos. Rebuzzini, G. (trabajo de PhD en la Universidad de Milano-Bicocca (Italia) (2009)) informa sobre un estudio del dominio de helicasa NS3 del virus de la hepatitis C para su aplicación en un inmunoensayo de quimioluminiscencia.

En el documento WO 2007/077008 se informa sobre proteínas de fusión quiméricas con actividades superiores de chaperona y plegamiento. La conversión de FKBP 12 en un potente catalizador de plegamiento de proteínas mediante la inserción de un dominio de chaperona se describe en Knappe *et al.*, (Knappe, T.A., *et al.*, J. Mol. Biol. 368 (2007) 1458-1468).

#### Sumario

La composición, como se informa en el presente documento, es una composición de moléculas de ácido nucleico (ARN y/o ADN) que codifican una población de especies de polipéptido quimérico, en la que cada molécula de ácido nucleico codifica una especie de polipéptido quimérico de acuerdo con la fórmula I



en la que

X es una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia variable,  
 $S_2$  y  $S_1$  son secuencias de aminoácidos no variables y no solapantes obtenidas a partir (i) de un polipéptido con actividad de peptidil-prolil cis/trans-isomerasa (actividad de PPlasa) o (ii) a partir de un polipéptido de la familia del dominio de plegamiento de FKBP, - entre dos aminoácidos representa un enlace peptídico, y X está insertado en el lugar del dominio de inserción de Flap (dominio de IF) del polipéptido de (i) o del polipéptido de (ii).

En una realización de todos los aspectos como se informa en el presente documento, X comprende una secuencia de aminoácidos de 5 a 500 restos.

En una realización de todos los aspectos como se informa en el presente documento, X comprende una secuencia de aminoácidos de 10 a 250 restos.

En una realización de todos los aspectos como se informa en el presente documento, X comprende una secuencia de aminoácidos de 50 a 150 restos.

En una realización de todos los aspectos como se informa en el presente documento, X comprende una secuencia de aminoácidos de 5 a 75 restos, de forma específica de 10 a 70 restos, de forma más específica de 10 a 30 restos, de forma más específica de 10 a 20 restos, de forma más específica 12, 13, 14, 15 o 16 restos.

En una realización de todos los aspectos como se informa en el presente documento, X está formado de acuerdo con la fórmula II



en la que

O es una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia variable,  
 U y Z se seleccionan independientemente entre sí, en la que cualquiera está presente o ausente y, si estuviera presente, cada uno de U y/o Z es una secuencia de aminoácidos no variable que comprende de 1 a 10 restos, y U, si estuviera presente, se une con un enlace peptídico a  $S_2$ , and Z, si estuviera presente, se une con un enlace peptídico a  $S_1$ .

En una realización de todos los aspectos como se informa en el presente documento, cada uno de U y/o Z es una secuencia de aminoácidos de 1 a 5 restos, y en particular de 4 restos.

En una realización de todos los aspectos como se informa en el presente documento, U, si estuviera presente, es la secuencia de aminoácidos GAGS (SEQ ID NO: 1), y Z, si estuviera presente, es la secuencia de aminoácidos GSSG (SEQ ID NO: 2) o la secuencia de aminoácido GSS (SEQ ID NO: 3).

- 5 En una realización de todos los aspectos como se informa en el presente documento, la secuencia de aminoácidos de O está formada por un subconjunto de los restos de aminoácidos de origen natural.

10 En una realización de todos los aspectos como se informa en el presente documento, cada resto de la secuencia de aminoácidos de O se selecciona independientemente entre el listado de restos de aminoácidos que consiste en Y, F, L, P, D, V, R, Q, S, I, E, G, W, A, H, T, N, K, y M.

15 En una realización de todos los aspectos como se informa en el presente documento, en la población de especies codificadas de polipéptidos quiméricos, la frecuencia relativa media de aparición de un resto de aminoácido en particular en la secuencia de aminoácidos de O es de un 8,5 % a un 11,5 % para Y, de un 8,5 % a un 11,5 % para F, de un 8,5 % a un 11,5 % para L, de un 5 % a un 8 % para P, de un 4,5 % a un 7,5 % para D, de un 4,5 % a un 7,5 % para V, de un 4,5 % a un 7,5 % para R, de un 4 % a un 7 % para Q, de un 4 % a un 7 % para S, de un 3,5 % a un 6,5 % para I, de un 3 % a un 6 % para E, de un 3 % a un 6 % para G, de un 3 % a un 6 % para W, de un 3 % a un 6 % para A, de un 2,5 % a un 5,5 % para H, de un 2 % a un 5 % para T, de un 1 % a un 4 % para N, de un 0,5 % a un 3,5 % para K, y de un 0,5 % a un 2,5 % para M.

20 En una realización de todos los aspectos como se informa en el presente documento, las secuencias de aminoácidos codificadas de  $S_2$  y  $S_1$  son fragmentos de un polipéptido de origen natural, en la que, en el polipéptido de origen natural, un dominio de IF está situado entre  $S_2$  y  $S_1$ .

25 En una realización de todos los aspectos como se informa en el presente documento, las secuencias de aminoácidos codificadas de  $S_2$  y  $S_1$  son fragmentos de un polipéptido de origen natural que es (i) un polipéptido con actividad de peptidil-prolil cis/trans-isomerasa (actividad de PPlasa) o (ii) un polipéptido de la familia del dominio de plegamiento de FKBP.

30 En una realización de todos los aspectos como se informa en el presente documento, las secuencias de aminoácidos codificadas de  $S_2$  y  $S_1$  son fragmentos de un polipéptido SlyD.

35 En una realización de todos los aspectos como se informa en el presente documento, las secuencias de aminoácidos codificadas de  $S_2$  y  $S_1$  son fragmentos de un polipéptido obtenido a partir de un termófilo.

En una realización de todos los aspectos como se informa en el presente documento, las secuencias de aminoácidos codificadas de  $S_2$  y  $S_1$  son fragmentos de un polipéptido obtenido a partir de una bacteria termófila o una Arquea termófila.

40 En una realización de todos los aspectos como se informa en el presente documento, las secuencias de aminoácidos codificadas de  $S_2$  y  $S_1$  son fragmentos de un polipéptido obtenido a partir de un termófilo de la familia de Thermaceae.

45 En una realización de todos los aspectos como se informa en el presente documento, las secuencias de aminoácidos codificadas de  $S_2$  y  $S_1$  son fragmentos de un polipéptido obtenido a partir de *Thermus thermophilus*.

50 En una realización de todos los aspectos como se informa en el presente documento, las secuencias de aminoácidos codificadas de  $S_2$  y  $S_1$  son fragmentos de un polipéptido obtenido a partir de una Arquea hipertermófila.

En una realización de todos los aspectos como se informa en el presente documento, las secuencias de aminoácidos codificadas de  $S_2$  y  $S_1$  son fragmentos de un polipéptido obtenido a partir de un termófilo de la clase de Thermococos.

55 En una realización de todos los aspectos como se informa en el presente documento, las secuencias de aminoácidos codificadas de  $S_2$  y  $S_1$  son fragmentos de un polipéptido obtenido a partir de *Thermococcus gammatolerans*.

60 En una realización de todos los aspectos como se informa en el presente documento, la especie codificada de polipéptido quimérico comprende un polipéptido que es un polipéptido quimérico SlyD FKBP de *Thermus thermophilus*, de forma específica está formada por un polipéptido de la secuencia de MKVGGQDKVVTIRYTLQVEGEVLDQGELSYLHGHRNLIPLGLEEALGREGG EAFQAHVPAEKAY-X-GKDLDFQVEV-VKVREATPEELLHGHA (SEQ ID NO: 4), en la que X es una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia variable a presentar por el polipéptido quimérico SlyD de *Thermus thermophilus*.

65

En una realización de todos los aspectos como se informa en el presente documento, la especie codificada de polipéptido quimérico comprende un polipéptido que es un polipéptido quimérico SlyD FKBP de *Thermus thermophilus*, de forma específica está formada por un polipéptido de la secuencia de MKVGGQDKVVTIRYTLQVEGEVLDQGELSYLHGHNRNLIPLGLEEALLEGREEG EAFQAHVPAEKAY-X-GKDLDFQVEVVKVREATPEELLHGHAGAGSGAGAGSGAGAGSPAAPVAA VPAAVGEGEGEFSTPVWISQAQGI-RAGPQRSLNPQPMRG (SEQ ID NO: 5), en la que X es una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia variable a presentar por el polipéptido quimérico SlyD de *Thermus thermophilus*. Este polipéptido comprende adicionalmente una región espaciadora codificada como una fusión C-terminal.

Además, en el presente documento se desvela el uso, en un sistema de traducción *in vitro*, de una composición de moléculas de ARN que codifican una población de especies de polipéptidos quiméricos, estando la composición especificada de acuerdo con cualquiera de las realizaciones de todos los aspectos como se informa en el presente documento, para presentar miembros o miembros emergentes de la población codificada de especies de polipéptidos quiméricos en complejos ternarios, en la que cada complejo ternario comprende una molécula de ARN de la composición de moléculas de ARN como ARNm, y un ribosoma funcional.

Además, en el presente documento se desvela el uso, en un sistema de transcripción/traducción *in vitro*, de una composición de moléculas de ADN y ARN que codifican una población de especies de polipéptidos quiméricos, estando la composición especificada de acuerdo con cualquiera de las realizaciones de todos los aspectos como se informa en el presente documento, para presentar miembros o miembros emergentes de la población codificada de especies de polipéptidos quiméricos en complejos ternarios, en la que cada complejo ternario comprende una molécula de ARN de la composición de moléculas de ARN como ARNm, y un ribosoma funcional.

Además, en el presente documento se desvela una composición que comprende una población de complejos ternarios, comprendiendo cada complejo ternario un ARNm y un ribosoma funcional, comprendiendo los ARNm de la población de complejos ternarios una composición de moléculas de ARN que codifican una población de especies de polipéptidos quiméricos de acuerdo con cualquiera de las realizaciones de todos los aspectos como se informa en el presente documento, en la que cada complejo ternario presenta un miembro o miembro emergente de una especie codificada de polipéptidos quiméricos.

En una realización de todos los aspectos como se informa en el presente documento, en un miembro emergente de una especie codificada de polipéptidos quiméricos, la distancia entre el enlace peptídico C-terminal de S<sub>2</sub> y el enlace peptídico N-terminal de S<sub>1</sub> imita la distancia de los correspondientes enlaces de peptídicos de S<sub>2</sub> y S<sub>1</sub> conectados por un dominio de IF en un polipéptido obtenido a partir (i) de un polipéptido con actividad de peptidil-prolil cis/trans-isomerasa (actividad de PPLasa) o (ii) a partir de un polipéptido de la familia del dominio de plegamiento de FKBP.

En una realización de todos los aspectos como se informa en el presente documento, en un miembro emergente de una especie codificada de polipéptidos quiméricos S<sub>2</sub> y al menos la parte N-terminal traducida de S<sub>1</sub> se pliegan como en el miembro de longitud completa correspondiente de la especie de polipéptido quimérico, teniendo el miembro un dominio de FKBP intacto.

Además, en el presente documento se desvela un método para identificar una secuencia de aminoácidos de un dominio X que se une a una diana predeterminada, comprendiendo el método las etapas de

- (1) proporcionar, como los ARNm, una composición de moléculas de ARN que codifican una población de especies de polipéptidos quiméricos de acuerdo con cualquiera de las realizaciones de todos los aspectos como se informa en el presente documento;
  - (2) poner en contacto los ARNm de la etapa (1) con un sistema de traducción *in vitro* y traducir los ARNm, y formar una composición que comprende una población de complejos ternarios, comprendiendo cada complejo ternario un ARNm y un ribosoma funcional, en la que cada complejo ternario presenta un miembro emergente de una especie codificada de polipéptidos quiméricos;
  - (3) poner en contacto los complejos ternarios obtenidos en la etapa (2) con la diana predeterminada en condiciones de unión acuosas capaces de mantener intactos los complejos ternarios y adecuadas para la unión no covalente específica de miembros emergentes con respecto a la diana, formando de ese modo una mezcla de complejos ternarios no unidos y unidos, en el que los complejos ternarios unidos comprenden miembros emergentes de especies de polipéptidos quiméricos, estando los miembros emergentes unidos a la diana;
  - (4) separar los complejos ternarios intactos unidos a la diana de los complejos ternarios no unidos lavando los complejos ternarios intactos unidos con una solución de lavado y retirando los complejos ternarios no unidos;
  - (5) disociar los complejos ternarios unidos a diana obtenidos en la etapa (4), y sintetizar los ADNc a partir del ARNm de los complejos ternarios disociados;
  - (6) determinar, en un ADNc obtenido en la etapa (5), la secuencia de ácidos nucleicos que codifica el dominio X, y deducir a partir de la misma la secuencia de aminoácidos de X,
- identificando de ese modo la secuencia de aminoácidos de un dominio X que se une a la diana predeterminada.

En una realización específica, después de la etapa (5) realizada por primera vez y antes de realizar la etapa (6), las etapas (5a) y (5b) se realizan de forma consecutiva un número de veces deseado, en la que

5 (5a) comprende sintetizar los ARNm a partir de los ADNc obtenidos en la etapa realizada en último lugar (5), proporcionando de ese modo los ARNm recién sintetizados que comprende una composición adicional de moléculas de ARN que codifican una población de especies de polipéptidos quiméricos de acuerdo con cualquiera de las realizaciones de todos los aspectos como se informa en el presente documento, seguido de (5b) comprende realizar las etapas 2 a 5 con los ARNm recién sintetizados, y la etapa (6) se realiza con el ADNc obtenido en la etapa realizada en último lugar (5).

10 En una realización específica adicional, el número de veces que se realizan las etapas (5a) y (5b) de forma consecutiva es de 1 a 12, de forma más específica el número de veces se selecciona entre 1, 2, 3, 4, 5, y 6.

15 En una realización específica adicional, la etapa (6) se realiza para una pluralidad de los ADNc obtenidos en la etapa (5) o la etapa realizada en último lugar (5), identificando de ese modo secuencias de aminoácidos de una pluralidad de especies de dominio X (especies de dominio X), en la que cada una de las especies de dominio X se obtiene a partir de una especie de polipéptido quimérico, y en la que cada especie de dominio X se une a la diana predeterminada.

20 En una realización específica adicional, en la etapa (6), las secuencias de ácidos nucleicos de los ADNc se determinan en paralelo por medio de identificación sistemática de alto rendimiento.

25 En una realización específica adicional, las secuencias de aminoácidos deducidas para el dominio X se agrupan de acuerdo con secuencias consenso, proporcionando de ese modo una o más grupos con miembros, obteniéndose cada miembro a partir de la secuencia de aminoácidos codificada por un ADNc determinado por separado, en la que los miembros dentro del mismo grupo se caracterizan por una secuencia de aminoácidos consenso común, y la secuencia de aminoácidos consenso es una subsecuencia contigua de las secuencias de aminoácidos de la especie de dominio X dentro del grupo.

30 En una realización específica adicional, se selecciona una secuencia de aminoácidos del dominio X en el grupo con el mayor número de miembros, identificando de ese modo la secuencia de aminoácidos de un dominio X que se une a la diana predeterminada.

35 En una realización específica adicional, las secuencias de aminoácidos deducidas para las especies del dominio X se agrupan de acuerdo con la identidad de secuencias, proporcionando de ese modo una o más grupos con miembros, obteniéndose cada miembro a partir de la secuencia de aminoácidos codificada por un ADNc determinado por separado, en la que los miembros dentro del mismo grupo se caracterizan por una secuencia de aminoácidos idéntica.

40 En una realización específica adicional, se selecciona la secuencia de aminoácidos del dominio X del grupo con el mayor número de miembros, identificando de ese modo la secuencia de aminoácidos de un dominio X que se une a la diana predeterminada.

45 Además, en el presente documento se desvela un método para producir un polipéptido restringido, siendo el polipéptido restringido un aglutinante específico de una diana predeterminada, comprendiendo el método las etapas de

50 (1) identificar, de acuerdo con un método de acuerdo con cualquiera de las realizaciones de todos los aspectos como se informa en el presente documento, una secuencia de aminoácidos de un dominio X que se une a la diana predeterminada, en la que el dominio X se identifica como un dominio que sustituye al dominio de IF en (i) un polipéptido con actividad de peptidil-prolil cis/trans-isomerasa (actividad de PPlasa) o (ii) un polipéptido de la familia del dominio de plegamiento de FKBP;

(2) proporcionar un polipéptido lineal que comprende la secuencia de aminoácidos del dominio X identificada en la etapa (1);

55 (3) conectar el extremo N-terminal y el extremo C-terminal del polipéptido de la etapa (2), en el que la distancia del extremo N-terminal y el extremo C-terminal conectados del polipéptido imita la distancia del extremo N-terminal y el extremo C-terminal conectados del dominio de IF, de (i) el polipéptido con actividad de peptidil-prolil cis/trans-isomerasa (actividad de PPlasa) o (ii) el polipéptido de la familia del dominio de plegamiento de FKBP;

60 produciendo de ese modo el polipéptido restringido, siendo el polipéptido restringido un aglutinante específico de la diana predeterminada.

En una realización específica, en el polipéptido restringido, la distancia entre el extremo N-terminal y el extremo C-terminal conectados del polipéptido es de  $4 \times 10^{-10}$  m a  $6 \times 10^{-10}$  m.

65

En una realización específica adicional, en la etapa (3), el extremo N-terminal y el extremo C-terminal del polipéptido están conectados de forma covalente con un grupo de unión.

En una realización específica adicional, la secuencia de aminoácidos del polipéptido está libre de restos de cisteína.

En una realización específica adicional, ya sea en la etapa (2) o en la etapa (3), se añade un resto de cisteína a cada uno del extremo N-terminal y el extremo C-terminal del polipéptido, an y se forma un puente a disulfuro entre los dos restos de cisteína añadidos, produciendo de ese modo el polipéptido restringido, siendo el polipéptido restringido un aglutinante específico de la diana predeterminada.

En una realización específica adicional, se añade un resto de aminoácido adicional a un resto de cisteína añadido.

Además, en el presente documento se desvela un método para evaluar una diana predeterminada (diana) en una muestra de la que se sospecha que contiene la diana, comprendiendo el método las etapas de

- (1) identificar, de acuerdo con un método de acuerdo con cualquiera de las realizaciones de todos los aspectos como se informa en el presente documento, una secuencia de aminoácidos de un dominio X que se une a la diana predeterminada, en la que el dominio X se identifica como un dominio que sustituye al dominio de IF en (i) un polipéptido con actividad de peptidil-prolil cis/trans-isomerasa (actividad de PPlasa) o (ii) un polipéptido de la familia del dominio de plegamiento de FKBP;
- (2) proporcionar un polipéptido quimérico que comprende un polipéptido de acuerdo con la fórmula I



en la que

X es la secuencia de aminoácidos identificada en la etapa (1),

S<sub>2</sub> y S<sub>1</sub> son secuencias de aminoácidos no variables y no solapantes obtenidas a partir (i) de un polipéptido con actividad de peptidil-prolil cis/trans-isomerasa (actividad de PPlasa) o (ii) a partir de un polipéptido de la familia del dominio de plegamiento de FKBP, - entre dos aminoácidos representa un enlace peptídico, y X está insertado en el lugar del dominio de inserción de Flap (dominio de IF) del polipéptido de (i) o del polipéptido de (ii);

(3) poner en contacto la muestra con el polipéptido quimérico de la etapa (2) en condiciones que permitan la unión específica del polipéptido quimérico a la diana, formando de ese modo una mezcla de polipéptido quimérico no unido y, si la diana estuviera presente, polipéptido quimérico unido, estando el polipéptido quimérico unido, unido a la diana, proporcionando de ese modo una muestra tratada;

(4) retirar, en condiciones que permitan la unión específica, el polipéptido quimérico no unido de la muestra tratada de la etapa 3, proporcionando de ese modo una muestra sondeada;

(5) detectar el polipéptido quimérico en la muestra sondeada de la etapa (4), en el que la presencia de polipéptido quimérico en la muestra sondeada es indicativa de que la diana está presente en la muestra;

evaluando de ese modo la diana predeterminada en la muestra de la que se sospecha que contiene la diana predeterminada.

En una realización específica, en la etapa (5) el polipéptido quimérico se detecta de forma cuantitativa en la muestra sondeada de la etapa (4).

Además, en el presente documento se desvela un método para evaluar una diana predeterminada (diana) en una muestra de la que se sospecha que contiene la diana, comprendiendo el método las etapas de

(3) proporcionar un polipéptido restringido que es un conector específico de la diana predeterminada, siendo el polipéptido restringido producido con un método de acuerdo con cualquiera de las realizaciones de todos los aspectos como se informa en el presente documento;

(3) poner en contacto la muestra con el polipéptido restringido de la etapa (1) en condiciones que permitan la unión específica del polipéptido restringido a la diana, formando de ese modo una mezcla de polipéptido restringido no unido, y si la diana estuviera presente, polipéptido restringido unido, estando el polipéptido restringido unido, unido a la diana, proporcionando de ese modo una muestra tratada;

(3) retirar, en condiciones que permitan la unión específica, el polipéptido restringido no unido de la muestra tratada de la etapa 3, proporcionando de ese modo una muestra sondeada;

(4) detectar el polipéptido restringido en la muestra sondeada de la etapa (4), en el que la presencia de polipéptido restringido en la muestra sondeada es indicativa de que la diana está presente en la muestra;

evaluando de ese modo la diana predeterminada en la muestra de la que se sospecha que contiene la diana predeterminada.

En una realización específica, en la etapa (4), el polipéptido restringido se detecta de forma cuantitativa en la muestra sondeada de la etapa (3).

#### Descripción Detallada

5 El número de posibilidades conformacionales en un polipéptido se puede reducir introduciendo una "restricción" para reducir la flexibilidad de la cadena polipeptídica. Un ejemplo no limitante de restricción de polipéptidos de origen natural incluye la formación de macrociclos a través de enlaces disulfuro. Sin restricción en el lugar, las interacciones intramoleculares que mantienen una cadena polipeptídica en una estructura plegada específica son débiles. Solo un gran número de interacciones débiles puede compensar la entropía conformacional perdida cuando el polipéptido adopta una única conformación mayor. Por lo general, una conformación en particular de un polipéptido se estabiliza reduciendo la entropía conformacional que se pierde al plegarse en una conformación de este tipo. Dicha pérdida de entropía también se conoce como "gasto de entropía". Cuando el objeto es la unión a una diana predeterminada, una restricción que bloquea la conformación activa de un polipéptido de unión a diana da como resultado un aumento de la afinidad con respecto a la diana con el objetivo, ya que hay poca pérdida de entropía conformacional al unirse a la diana. En la técnica se conocen varios enfoques para estabilizar un polipéptido a modo de restricción, incluyendo medios de química orgánica sintética. Los polipéptidos restringidos se discuten en Rizo J. y Gierasch L.M. Annu. Rev. Biochem. 61 (1992) 387-418 y en cualquier parte.

20 Como se usa en el presente documento, las expresiones "polipéptidos limitados conformacionalmente", "polipéptidos restringidos estructuralmente", "polipéptidos restringidos" y "polipéptidos restringidos conformacionalmente" se usan indistintamente y se pretenden hacer referencia a polipéptidos que, por ejemplo a través de enlaces intramoleculares, se estabilizan conformacionalmente y permanecen en una conformación lo suficientemente constante como para mantener el nivel del polipéptido de función y actividad de manera más coherente. Estos incluyen polipéptidos modificados que tienen cualquier modificación química (es decir, al menos una), por ejemplo, una modificación química para incorporar una unión molecular; modificación química para promover la formación de un puente disulfuro; etc., de tal manera que el péptido estructuralmente restringido adopta un número más limitado de estructuras que el péptido no modificado. Se entiende que una especie de polipéptidos restringidos en solución puede no tener la confirmación deseada todo el tiempo. En cambio, en una población de péptidos estructuralmente limitados en solución, la confirmación deseada está presente al menos aproximadamente un 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, o más del tiempo que la secuencia de péptido nativo u original en solución antes de su modificación. La estructura de una especie de polipéptidos en solución se puede determinar por diversos métodos conocidos por los expertos en la materia que incluyen, pero no se limitan a, difracción de rayos X y espectroscopía de RMN. Se puede aplicar cristalografía de rayos X para determinar la estructura de un polipéptido restringido cuando se empaqueta en forma de un cristal.

40 Como se usa en el presente documento, la expresión "resto de aminoácido de unión" se refiere a un resto de aminoácido en una secuencia de aminoácidos que, cuando se une a un resto de aminoácido no adyacente, da como resultado el ciclado de al menos una porción del péptido.

45 El término "diana" en el presente documento se refiere a una estructura predeterminada a la que se une un agente de unión específico como se define en el presente documento. La diana puede ser polipéptido, carbohidrato, ácido nucleico, lípido, hapteno u otro compuesto de origen natural o sintético. Los términos antígeno, epítipo antigénico y epítipo están incluidos en el término "diana".

50 Como se usa en el presente documento, la expresión "armazón de proteína" o "armazón" se refiere a una entidad polipeptídica que se pliega de forma estable y conformacionalmente constante capaz de presentar una multitud de secuencias de aminoácidos como un segmento o dominio separado (es decir, no como un armazón) en una región de superficie localizada. Un armazón es particularmente útil para descubrimiento y modificación por ingeniería de tales dominios separados capaces de interactuar con y/o unirse de forma específica a una diana predeterminada tal como un antígeno o un epítipo antigénico, un sitio activo de una molécula bioactiva, etc. Las propiedades físicas deseables de un armazón de proteína incluyen estabilidad térmica elevada y reversibilidad de plegamiento y desplegamiento térmico.

55 Como se usa en el presente documento, el término "presentar" y "presentación" se refiere a la provisión de una o más estructura(s) y en particular de una multitud de estructuras que pueden formar parte o ser toda una biblioteca, en la que la estructura o estructuras llegan a estar disponibles para sección basándose en una característica especificada. La característica especificada por ser una característica física, química o funcional. Una realización específica de una estructura presentada es un polipéptido presentado. Un ejemplo del mismo es una composición con complejos de ternarios (tripartita), en la que cada complejo ternario comprende un ribosoma funcional, un ARNm que codifica un polipéptido, y un polipéptido emergente codificado por el ARNm en el complejo en particular. Otra realización específica de una estructura presentada es un segmento de secuencia de aminoácidos presentada comprendida en un polipéptido. Un ejemplo para esto último es un armazón de proteína con un dominio separado presentado, en el que el dominio comprende un segmento de secuencia de ácidos nucleicos.

65

Los métodos de presentación desvelados de forma específica en el presente documento relacionan la función codificante de una molécula de ácido nucleico y las características físicas, químicas y/o funcionales del polipéptido codificado por la molécula de ácido nucleico. Cuando se usa tal método de presentación, se pueden seleccionar polipéptidos que tengan una característica física, química y/o funcional y la molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido seleccionado se aísla fácilmente. En la técnica se conocen varios métodos de presentación que unen la funcionalidad codificante de una molécula de ácido nucleico con el producto polipeptídico asociado, por ejemplo, presentación de bacteriófago (presentación de fagos), presentación de ribosomas, compartimentalización y presentación de emulsión, presentación de levaduras, presentación de puromicinas (también conocida como presentación de ARNm), presentación de bacterias, presentación en plásmido, presentación covalente, presentación de CIS y similares.

El término "biblioteca" se refiere a una mezcla de polipéptidos heterogéneos o moléculas de ácido nucleico, también denominadas "población" de polipéptidos o moléculas de ácido nucleico. La biblioteca está formada por una pluralidad de "especies", cada una de las cuales tiene una secuencia de aminoácidos y nucleótidos sustancialmente única. Las diferencias de secuencias entre especies de biblioteca son responsables de la diversidad presente en la biblioteca o población. La presente divulgación, la biblioteca puede tomar la forma de una mezcla sencilla de polipéptidos o moléculas de ácido nucleico, o puede estar presente en forma de complejos biológicos en un entorno bioquímico para traducción o transcripción y traducción combinadas.

En una realización desvelada en el presente documento, la biblioteca puede comprender una población de moléculas de ácido nucleico en forma de ARN, en las que cada ARN comprende un marco de lectura abierto que codifica una especie de polipéptido en particular. El ARN, como se desvela en el presente documento, puede servir como un molde para traducción *in vitro*; en tal caso, el ARN comprende todas las características estructurales necesarias para formar un complejo ternario junto con un ribosoma funcional y para iniciar y sostener la traducción de la especie de polipéptido codificada por el ARN. Una molécula de ARN que incluye estas características estructurales requeridas para la traducción se denomina "ARNm", "molécula de ARNm" o "molécula de ARN como ARNm". En una realización específica de presentación de ribosomas, el ARNm incluye una o más característica(s) estructurales que evitan la disociación del ribosoma, la especie de polipéptido traducido y el ARNm que codifica la especie de polipéptido. En una realización específica de presentación de ARNm, el ARNm está conectado a una molécula de puromicina a través de un resto de unión.

Un entorno bioquímico para traducción o transcripción y traducción combinadas se puede proporcionar en forma de extractos sin células que incluyen opcionalmente una polimerasa de ARN dependiente de ADN, siendo los extractos conocidos en la técnica de transcripción y/o expresión de proteína *in vitro*, y en la técnica de presentación de ribosomas. Por consiguiente, en una realización específica, la biblioteca puede estar presente como una población de complejos ternarios (siendo un ejemplo los complejos biológicos), comprendiendo cada complejo ternario un ARNm y un ribosoma funcional, comprendiendo los ARNm de la población de complejos ternarios una composición de moléculas de ARN que codifican una población de especies de polipéptidos, en la que cada complejo ternario presenta un miembro emergente de una especie codificada de polipéptidos quiméricos. Por lo tanto, lo mencionado anteriormente también representa la biblioteca de especies de polipéptidos emergentes. Por lo general, un solo complejo ternario contiene solamente una especie de las bibliotecas de polipéptido de ARNm/ emergente.

Después de la presentación de ARNm, el ARNm se puede transcribir de forma inversa en ADNc. Una molécula de ácido nucleico en forma de ADN tal como ADNc se puede multiplicar por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En tal caso, las secuencias de cebadores extendidas son útiles para fusionar opcionalmente, por ejemplo, una secuencia promotora cadena arriba de la secuencia de nucleótidos que codifica una especie de polipéptido en particular.

En una realización que incluye transcripción/traducción, una biblioteca de moléculas de ácido nucleico que codifica la biblioteca de especies polipeptídicas está inicialmente presente en forma de moléculas de ADN. Cadena arriba del marco de lectura abierto cada molécula de ADN incluye una secuencia promotora que facilita la transcripción del ARNm. En una realización específica a modo de ejemplo, el promotor es un promotor T7 o una variante funcional del mismo, y la polimerasa T7 o una variante funcional de la misma es la polimerasa de ARN dependiente de ADN usada para transcribir ADN para formar ARNm.

La expresión "miembro" representa un solo objeto, por lo general un polipéptido de una molécula de ácido nucleico, que pertenece a un grupo, en el que todos los miembros del grupo comparten menos una característica común, por lo general una secuencia contigua compartida de restos de aminoácidos o nucleótidos. En una realización específica, todos los miembros de un grupo determinado son idénticos. El término "especie", tal como se usa en el presente documento, representa un grupo dentro de una población, teniendo el grupo uno o más miembros, en el que en el caso de una pluralidad de miembros todos los miembros del mismo grupo son idénticos. Por lo general en una población está comprendida una multitud de especies diferentes.

La expresión "aminoácido" en el contexto de la presente invención se usa en su sentido más amplio y pretende incluir L a-aminoácidos o restos de origen natural, así como miméticos de los mismos. El usado normalmente y las abreviaturas de tres letras para los aminoácidos de origen natural que se usa en el presente documento: A = Ala;

C = Cys; D = Asp; E = Glu; F = Phe; G = Gly; H = His; I = Ile; K = Lys; L = Leu; M = Met; N = Asn; P = Pro; Q = Gln; R = Arg; S = Ser; T = Thr; V = Val; W = Trp; e Y = Tyr (Lehninger, A.L., (1975) Biochemistry, 2ª ed., pp. 71 -92, Worth Publishers, New York).

5 Un "mimético de aminoácido" se refiere a un resto, distinto de un aminoácido de origen natural, que sirve conformacional y funcionalmente como un sustituyente para un aminoácido en particular en un compuesto que contiene péptido sin interferir de forma adversa hasta un alcance significativo con la función del compuesto (por ejemplo, unión a una diana). En algunas circunstancias, la sustitución con un mimético de aminoácido en realidad puede mejorar las propiedades del compuesto (por ejemplo, interacción del compuesto con la diana). Los ejemplos  
10 de miméticos de aminoácidos incluyen D-aminoácidos. Se pueden preparar péptidos sustituidos con uno o más D-aminoácidos usando procedimientos de síntesis de péptidos bien conocidos.

Un "polipéptido" es un polímero de dos o más restos de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos, ya sea producido de forma natural o de forma bioquímica *in vitro* o por medio de síntesis química. Los polipéptidos con una  
15 longitud de menos de aproximadamente 12 restos de aminoácidos también se pueden denominar "péptidos" y los que tienen una longitud entre aproximadamente 12 y 30 restos de aminoácidos se pueden denominar "oligopéptidos". Los polipéptidos también se pueden someter a procesos de maduración o de modificación post-traduccionales que pueden incluir, pero no se limitan a: glicosilación, escisión proteolítica, lipidación, escisión del péptido señal, escisión propeptídica, fosforilación y similares. El término "proteína" en el presente documento se usa  
20 para hacer referencia a una macromolécula que comprende una o más cadenas polipeptídicas.

La expresión "polipéptido quimérico" se refiere a un polipéptido cuya secuencia de aminoácidos representa un producto de fusión de subsecuencias de las secuencias de aminoácidos de al menos dos orígenes distintos. Una proteína quimérica por lo general no se produce por manipulación directa de secuencias de aminoácidos, sino más bien se expresa a partir de una molécula de ácido nucleico "quimérico" que codifica la secuencia de aminoácidos quimérica. Por lo tanto, el polipéptido quimérico se puede crear a través de la unión en marco de dos o más secuencias de ácidos nucleicos codificantes que originalmente codifican polipéptidos o dominios polipeptídicos separados. En una realización específica, la traducción de la secuencia codificante fusionada da como resultado un polipéptido único con propiedades funcionales obtenidas a partir de cada uno de los polipéptidos originales o dominios polipeptídicos.  
25  
30

Un "dominio" como se hace denomina en el presente documento, es una estructura polipeptídica terciaria independiente del resto de una proteína a la que se puede unir el dominio, ya sea de forma covalente o de otro modo. Los dominios pueden ser responsables de propiedades funcionales específicas de polipéptidos o proteínas, y en muchos casos se pueden añadir, eliminar o transferir a otros polipéptidos sin pérdida de la función del propio dominio. En una realización específica en el presente documento, un dominio es capaz de unirse de forma específica a una diana.  
35

El "porcentaje de identidad de secuencias" se determina comparando dos secuencias alineadas de forma óptima con respecto a una ventana de comparación, en la que la porción de la secuencia en la ventana de comparación puede comprender adiciones o deleciones (es decir, espacios) en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o deleciones) para un alineamiento óptimo de las dos secuencias. El porcentaje se calcula determinando el número de posiciones en las que se produce la misma base de ácido nucleico o resto de aminoácido en ambas secuencias para producir el número de posiciones emparejadas, dividiendo el número de posiciones emparejadas entre el número total de posiciones en la ventana de comparación y multiplicando el resultado por 100 para producir el porcentaje de identidad de secuencias.  
40  
45

El término "idéntico", en el contexto de dos o más secuencias de ácidos nucleicos o polipéptidos, se refiere a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales. Las secuencias son "sustancialmente idénticas" entre sí si tienen un porcentaje especificado de nucleótidos o restos de aminoácidos que son los mismos (por ejemplo, una identidad de al menos un 20 %, al menos un 25 %, al menos un 30 %, al menos un 35 %, al menos un 40 %, al menos un 45 %, al menos un 50 %, al menos un 55 %, al menos un 60 %, al menos un 65 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, o al menos un 95 % con respecto a la región especificada), cuando se comparan y se alinean para una correspondencia máxima con respecto a una ventana de comparación, o región designada tal como se mide usando uno de los siguientes algoritmos de comparación de secuencias o mediante alineamiento manual e inspección visual. Estas definiciones también se refieren al complemento de una secuencia de ensayo. Opcionalmente, la identidad existe con respecto a una región que tiene una longitud de al menos aproximadamente 50 nucleótidos, o más habitualmente con respecto a una región que tiene una longitud de 100 a 500 o 1000 o más nucleótidos.  
50  
55  
60

Los términos "similitud" o "porcentaje de similitud" en el contexto de dos o más secuencias de polipéptidos, se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que tienen un porcentaje especificado de restos de aminoácidos que son los mismos o similares tal como se define mediante una sustitución conservativa de aminoácidos (por ejemplo, similitud de un 60 %, opcionalmente similar en un 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, o un 95 % con respecto a una región especificada), cuando se comparan y alinean para una correspondencia máxima con respecto a una ventana de comparación, o región designada tal como se mide usando uno de los siguientes algoritmos de  
65

comparación de secuencias o mediante alineamiento manual e inspección visual. Las secuencias son "sustancialmente similares" entre sí si son similares en entre sí en al menos un 20 %, al menos un 25 %, al menos un 30 %, al menos un 35 %, al menos un 40 %, al menos un 45 %, al menos un 50 %, o al menos un 55 %. Opcionalmente, esta similitud existe con respecto a la región que tiene una longitud de al menos aproximadamente 50 aminoácidos, o más habitualmente con respecto a la región que tiene una longitud de al menos aproximadamente 100 a 500 o 1000 o más aminoácidos. Para comparación de secuencias, por lo general una secuencia actúa como una secuencia de referencia, con la que se comparan las secuencias de ensayo. Cuando se usa un algoritmo de comparación de secuencias, las secuencias de ensayo y de referencia se introducen en un ordenador, se diseñan coordenadas de subsecuencias, si fuera necesario, y se diseñan parámetros de programa de algoritmo de secuencias. Normalmente se usan parámetros de programa por defecto, o se pueden diseñar parámetros alternativos. A continuación el algoritmo de comparación de secuencias calcula el porcentaje de identidades o similitudes de las secuencias para las secuencias de ensayo con respecto a la secuencia de referencia, basándose en los parámetros del programa.

Como se usa en el presente documento, se entiende que "detectar", "detección" y similares se usan en un ensayo realizado para identificación de un analito específico en una muestra, un producto a partir de una construcción de indicador en una muestra, o una actividad de un agente en una muestra.

Se entiende que los intervalos proporcionados en el presente documento son notaciones para todos los valores dentro del intervalo. Esto incluye todas las secuencias individuales cuando se proporciona un intervalo de SEQ ID NOs. Por ejemplo, se entiende que un intervalo de 1 a 50 incluye cualquier número, combinación de números, o subintervalo del grupo que consiste en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, o 50.

Los términos "un", "uno" y "el" por lo general incluyen referentes en plural, a menos que el contexto lo indique claramente de otro modo. Como se usa en el presente documento, se entiende que "pluralidad" se refiere a más de uno. Por ejemplo, una pluralidad se refiere a al menos dos, tres, cuatro, cinco, o más. A menos que se indique de forma específica o sea evidente a partir del contexto, como se usa en el presente documento, se entiende que el término "o" es inclusivo.

A menos que se indique de forma específica o sea evidente a partir del contexto, como se usa en el presente documento, se entiende que el término "aproximadamente" esta dentro de un intervalo de tolerancia normal en la técnica, por ejemplo dentro de 2 desviaciones estándar de la media. Aproximadamente se puede entender como dentro de un 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 %, 0,5 %, 0,1 %, 0,05 %, o un 0,01 % del valor indicado. A menos que sea evidente a partir del contexto, todos los valores numéricos proporcionados en el presente documento se pueden modificar con el término aproximadamente.

Una "muestra", como se usa en el presente documento, se refiere a un material biológico que se aísla de su entorno (por ejemplo, sangre o tejido de un animal, células, o medio acondicionado a partir de cultivo tisular) y se sospecha que contiene, o se sabe que contiene un analito, tal como un virus, un anticuerpo, o un producto de una construcción de indicador. Una muestra también puede ser una fracción purificada parcialmente de un tejido o fluido corporal.

Un agente, polipéptido, ácido nucleico, u otro compuesto "se une de forma específica a" una diana, por ejemplo, antígeno, polipéptido, ácido nucleico, u otro compuesto, cuando la diana se une con una preferencia de al menos 50 veces, de forma específica al menos 100 veces, de forma específica al menos 500 veces, de forma específica al menos 1000 veces, de forma específica al menos 5000 veces, de forma específica al menos 10.000 veces en comparación con un compuesto no específico, o una combinación de compuestos no específicos. Que se une de forma específica se puede usar en relación con uno de dos o más compuestos relacionados que tienen estructuras físicamente relacionadas. Las preferencias y afinidades de unión, absolutas o relativas, se pueden determinar, por ejemplo, mediante la determinación de la afinidad para cada par por separado o mediante el uso de ensayos de competición u otros métodos bien conocidos por los expertos en la materia.

La expresión "selección", como se usa en el presente documento, se refiere al proceso de una técnica de selección por afinidad que selecciona péptidos o polipéptidos, de forma específica polipéptidos quiméricos (también denominados de forma colectiva "aglutinantes") que se unen a una diana predeterminada (dada). El proceso de selección implica cuatro etapas principales para selección de aglutinantes. La primera etapa es proporcionar una biblioteca de presentación. En una realización específica, la biblioteca de presentación es una composición que comprende una población de complejos ternarios como se describe en cualquiera de las realizaciones que se desvelan en el presente documento. La segunda etapa es la etapa de captura. Esta implica poner en contacto la biblioteca de presentación con la diana deseada. En una realización específica, la diana está inmovilizada. A modo de interacción de unión específica, solamente los dominios de unión presentados específicos presentados por cualquiera de los péptidos, polipéptidos y polipéptidos quiméricos se unen a la diana. La tercera etapa es una etapa de separación, posterior a la etapa de captura, para separar los miembros unidos de la biblioteca de presentación de los miembros no unidos por medio de retirada de los miembros no unidos. En una realización específica, la separación se realiza como una etapa de lavado en la que una mezcla que comprende diana inmovilizada con miembros unidos de la biblioteca de presentación se lava, retirando de ese modo los miembros no unidos. Como

resultado de la etapa de separación, los miembros unidos a diana de la biblioteca de presentación se retienen. La cuarta etapa es la etapa de recuperación en la que los miembros unidos o componentes de los mismos se recuperan y/o enriquecen y/o purifican, para procesamiento y/o caracterización adicional.

5 La expresión "representa un polipéptido que tiene la siguiente secuencia de aminoácidos" representa un polipéptido de una secuencia de aminoácidos dada y también incluye variantes de la misma que tienen las mismas propiedades que el polipéptido con respecto a X. En una realización, la expresión representa un polipéptido con una identidad de secuencias de aminoácidos de al menos un 70 %. En una realización el término representa un polipéptido con una identidad de secuencias de aminoácidos de al menos un 80 %. En una realización el término representa un polipéptido con una identidad de secuencias de aminoácidos de al menos un 90 %. En una realización el término representa un polipéptido con una identidad de secuencias de aminoácidos de al menos un 95 %. En una realización el término representa un polipéptido con una identidad de secuencias de aminoácidos de al menos un 98 %.

15 La expresión "SlyD de *E. coli*" representa un polipéptido que tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

**MKVAKDLVVSLAYQVRTEDGVLVDESPVSAPLDYLGHGSLISGLETEALE  
GHEVGDKFDVAVGANDAYGQYDENLVQRVPKDVFMGVDELQVGMRFLL  
AETDQGPVPVEITAVEDDHVVVDGNHMLAGQNLKFNVEVVAIREATEEEL  
AHGHVHGAHDHHDHHDH (SEQ ID NO:6).**

20 Como se informa en el presente documento, esta secuencia de aminoácidos y variantes de la misma son aspectos individuales.

Si un polipéptido se produce en o se obtiene a partir de *E. coli*, el resto de metionina amino-terminal normalmente no se retira por escisión de forma eficaz con proteasas, por lo tanto, el resto de metionina amino-terminal está parcialmente presente en el polipéptido producido. Para representar esto, toda la secuencia se proporciona con el resto de metionina de partida.

25 La expresión "SlyD de *Thermus thermophilus*" representa un polipéptido que tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

**MKVGQDKVVITIRYTLQVEGEVLDQGELSYLHGHRNLIPGLEEALEGREEG  
EAFQAHVPAEKAYGPHDPEGVQVVPLSAFPEDAEEVPGAQFYAQDMEGN  
PMPLTVVAVEGEEVTVDNFHPLAGKDLDFQVEVVKVREATPEELLHGHA  
H (SEQ ID NO:7).**

30 Como se informa en el presente documento, esta secuencia de aminoácidos y variantes de la misma son aspectos individuales.

35 La expresión "SlyD de *Thermococcus gammatolerans*" representa un polipéptido que tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

**MKVERGDFVLFNYVGRYENGEVFDTSYESVAREQQGIFVEEREYSPIGVTVG  
AGEIIPGIEEALLGMELGEKKEVVVPPEKGYGMPREDLIVPVPIEQFTSAGLE  
PVEGMYVMTDAGIAKILKVEEKTVRLDFNHPLAGKTAIFEIEVVEIKKAGE  
A (SEQ ID NO:8).**

40 Como se informa en el presente documento, esta secuencia de aminoácidos y variantes de la misma son aspectos individuales.

La expresión "FKBP12 humano" representa un polipéptido que tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

MGVQVETISPGDGRTPFKRGQTCVVHYTGMLEDGKKFDSSRDRNKPFKFM  
LGKQEVIRGWEEGVAQMSVGQRAKLTISPDYAYGATGHPGIIPPHATLVFD  
VELLKLE (SEQ ID NO:9).

Como se informa en el presente documento, esta secuencia de aminoácidos y variantes de la misma son aspectos individuales.

5 La expresión "FKBP13 de *Arabidopsis thaliana*" representa un polipéptido que tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

ETTSCEFSVSPSGLAFCDKVVGYGPEAVKGLIKAHYVGKLENGKVFSSY  
NRGKPLTFRIGVGEVIKQWDQILGSDGIPPMLTGGKRTLRIPELAYGDRG  
AGCKGGSCLIIPASVLLFDIEYIGKA (SEQ ID NO:10).

10 Como se informa en el presente documento, esta secuencia de aminoácidos y variantes de la misma son aspectos individuales.

15 La expresión "polipéptido quimérico de FKBP12" representa un polipéptido que tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

MRSQVQVETISPGDGRTPFKRGQTAVVHYTGMLEDGKKFDSSRDRNKPFK  
FMLGKQEVIRGWEEGVAQMSVGQRAKLTISPDYAYG-X-TLVFDVELLKLE  
(SEQ ID NO:11),

20 en la que X es una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia variable a presentar por el polipéptido quimérico de FKBP12.

Como se informa en el presente documento, esta secuencia de aminoácidos y variantes de la misma son aspectos individuales.

25 La expresión "polipéptido quimérico de SlyD de *Thermus thermophilus*" representa un polipéptido que tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

MRSKVGQDKVVITRYTLQVEGEVLDQGELSYLHGHRNLIPGLEEALEGRE  
EGEAFQAHVPAEKAY-X-GKDLDFQVEVVKVREATPEELLHGHAH (SEQ  
ID NO:12),

30 en la que X es una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia variable a presentar por el polipéptido quimérico de SlyD de *Thermus thermophilus*.

Como se informa en el presente documento, esta secuencia de aminoácidos y variantes de la misma son aspectos individuales.

35 La expresión "polipéptido quimérico de SlyD de *Thermococcus gammatolerans*" representa un polipéptido que tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

MKVERGDFVLFNYVGRYENGEVFDTSYVESVAREQQGIFVEEREYSPIGVTVG  
AGEIIPGIEEALLGMELGEKKEVVPPEKGYGMP-X-  
AGKTAIFEIEVVEIKKAGEA (SEQ ID NO:13)

40 en la que X es una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia variable a presentar por el polipéptido

quimérico de SlyD de *Thermococcus gammatolerans*.

Como se informa en el presente documento, esta secuencia de aminoácidos y variantes de la misma son aspectos individuales.

5 La expresión "polipéptido quimérico FKBP13 de SlyD de *Thermus thermophilus*" representa un polipéptido que tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

GDRGAGCGS-X-GSSCLIPPASVLDQVEVVKVREATPEELLHGHAH (SEQ ID NO: 14),

10 en la que X es una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia variable a presentar por el polipéptido quimérico FKBP13 de SlyD de *Thermus thermophilus*.

15 Como se informa en el presente documento, esta secuencia de aminoácidos y variantes de la misma son aspectos individuales.

La expresión "polipéptido quimérico FKBP13 de *Arabidopsis thaliana*" representa un polipéptido que tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

ETTSCEFSVSPSGLAFCDKVVGYGPEAVKGQLIKAHYVGKLENGKVFSSY  
NRGKPLTFRIGVGEVIKQWDQILGSDGIPPMLTGGKRTLRIPELAYGDRG  
20 AGCGS-X-GSSCLIPPASVLLFDIEYIGKA (SEQ ID NO:15),

en la que X es una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia variable a presentar por el polipéptido quimérico FKBP13 de *Arabidopsis thaliana*.

25 Como se informa en el presente documento, esta secuencia de aminoácidos y variantes de la misma son aspectos individuales.

La expresión "polipéptido quimérico SlyD FKBP de *Thermus thermophilus*" representa un polipéptido que tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

30 MKVGQDKVVTIRYTLQVEGEVLDQGELSYLHGHRNLIPGLEEALLEGREEG  
EAFQAHVPAEKAY-X-GKDLDFQVEVVKVREATPEELLHGHA (SEQ ID  
NO:16),

en la que X es una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia variable a presentar por el polipéptido quimérico de SlyD de *Thermus thermophilus*.

35 Como se informa en el presente documento, esta secuencia de aminoácidos y variantes de la misma son aspectos individuales.

40 Una realización específica de un polipéptido quimérico SlyD FKBP de *Thermus thermophilus* es un polipéptido que tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

MKVGQDKVVTIRYTLQVEGEVLDQGELSYLHGHRNLIPGLEEALLEGREEG  
EAFQAHVPAEKAY-X-  
GKDLDFQVEVVKVREATPEELLHGHA GAGAGSGAGAGSPAAVPAA  
45 VPAAVGEGEGEFSTPVWISQAQGIRAGPQRLSNPQPMRG (SEQ ID NO:17),

en la que X es una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia variable a presentar por el polipéptido quimérico de SlyD de *Thermus thermophilus*. Esta realización específica incluye una región espaciadora codificada como una fusión C-terminal tal como se presenta en la definición.

Como se informa en el presente documento, esta secuencia de aminoácidos y variantes de la misma son aspectos individuales.

En una realización más específica de la misma, X es GAGS-O-GSS, en el que O es una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia variable a presentar por el polipéptido quimérico de SlyD de *Thermus thermophilus*.

Los polipéptidos quiméricos, como se informa en el presente documento, se basan en a polipéptidos a partir de la familia de proteínas del dominio FKBP (es decir, proteínas con actividad de PPlasa), tales como FKBP12 humano (Handschumacher, R.E., *et al.*, Science 226 (1984) 544-547), o FKBP13 de *Arabidopsis thaliana*, o SlyD de *E. coli*, o SlyD de *Thermus Thermophilus*, o SlyD de *Thermococcus gammatolerans*. Los polipéptidos quiméricos, como se informa en el presente documento, son un almacén para la presentación de polipéptidos comprendidos en la secuencia de aminoácidos de X.

La secuencia de aminoácidos de X puede sustituir el dominio Flap (restos de aminoácidos A85 a A96) y en el dominio beta-contracción (restos de aminoácidos S39 a P46) en la parte de FKBP12 y/o el dominio de IF (restos de aminoácidos G69 a D120) en la parte de SlyD.

Cualquier secuencia de aminoácidos se puede insertar como dominio X, tal como hélices, he motivos de hélice-giro-hélice, estructuras superenrolladas, manojos de hélice, motivos de giro-bucle, estructuras de beta-horquilla, láminas beta, motivos de lámina-hélice, motivos de lámina-giro-lámina, etc. También es posible presentar estructuras terciarias nativas definidas, dominios individuales de un polipéptido de múltiples dominios o subdominios, dominios de unión, fragmentos de anticuerpo, enzimas, etc. Son particularmente adecuados los polipéptidos o dominios de origen natural que comprenden aproximadamente 100 aminoácidos o más que, en su estado nativo, se caracterizan por extremos N-terminales y C-terminales estrechamente localizados entre sí (en el intervalo de  $4 \times 10^{-10}$  m a aproximadamente  $10 \times 10^{-10}$  m).

Los polipéptidos quiméricos, como se informa en el presente documento, son armazones adecuados para imitar una pluralidad estructural de motivos de estructura secundaria péptica (incluyendo los dominios X y O).

El SlyD de *Thermus Thermophilus* (Loew, C., *et al.*, J. Mol. Biol. 398 (2010) 375-390) se origina a partir de la bacteria arcaica *Thermus Thermophilus*. El SlyD de *Thermococcus gammatolerans* se origina a partir de las Arqueas *Thermococcus gammatolerans*. Ambas proteínas muestran una estabilidad termodinámica elevada en contraste con FKBP12 humano, FKBP13, FKBP12/13 quimérico, así como con SlyD de *E. coli*.

El SlyD de *Thermus thermophilus* así como el SlyD de *Thermococcus gammadurans* son proteínas altamente estables con la capacidad de plegarse de forma reversible incluso cuando su dominio Flap se está sustituyendo con una inserción X de aminoácido extraño. Estas moléculas se pueden usar en presentación ribosomas, básicamente de acuerdo con el método de Mattheakis, L. C., *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci USA 91 (1994) 9022-9026) para presentar una secuencia de polipéptidos X en los marcos de of SlyD de *Thermus thermophilus* o SlyD de *Thermococcus gammadurans*. El denominado complejo ternario consiste en (1) las subunidades ribosómicas unirás al (2) ARNm que codifica la información genética del (3) polipéptido quimérico presentado de forma ribosómica o polipéptido quimérico emergente.

Los polipéptidos quiméricos, como se informa en el presente documento, se pueden usar para generar una multitud de secuencias variables. Las bibliotecas se pueden identificar sistemáticamente para seleccionar entre los polipéptidos quiméricos las especies de las que la secuencia de aminoácidos de (ii) es capaz de unirse de forma específica a una diana. En el aglutinante seleccionado resultante, la secuencia de aminoácidos se inserta en la una o más partes obtenidas a partir del uno o más polipéptidos con actividad de PPlasa o que pertenecen a la familia de FKBP.

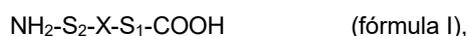
Una realización en particular desvelada en el presente documento es la identificación sistemática de biblioteca a modo de presentación de ribosomas. Un concepto importante de presentación de ribosomas es traducir una biblioteca de moléculas de ARNm con una cantidad de ribosomas funcionales. Si una molécula de ARNm no tiene codón de parada, el ribosoma frecuentemente se desplazará hacia el extremo de la molécula de ARNm. El polipéptido correspondiente emerge del ribosoma mientras que su extremo está todavía dentro del túnel ribosómico, y su último aminoácido todavía está conectado al peptidil-ARNt. La liberación del polipéptido del ribosoma normalmente está catalizada por los factores de liberación, que son proteínas que se unen a los codones de parada UGA, UGG y UAA, tomando el lugar de un ARNt en codones de "sentido" normales. En ausencia de codones de parada, esta unión de factores de liberación no se produce. Además, el ARNm solamente se puede liberar del ribosoma después de que la proteína recién sintetizada y el ARNt ya se hayan disociado, y esto está causado por el factor de reciclado ribosómico. Por lo tanto, los ribosomas que traducen el ARNm sin codones de parada quedarán atrapados en una forma en la que el polipéptido traducido ha emergido del ribosoma y el ARNm todavía está conectado al ribosoma, conectando de este modo el fenotipo (el polipéptido traducido) y el genotipo (el ARNm). Por lo tanto, la reacción real consiste en una breve reacción de traducción *in vitro* que se detiene en las condiciones apropiadas.

Una realización en particular que se desvela en el presente documento es una composición de moléculas de ácido nucleico (ADN y/o ARN) de acuerdo con cualquiera de las realizaciones de todos los aspectos como se informa en el presente documento, con las moléculas de ácido nucleico codificando una población de especies de polipéptidos

quiméricos, en la que, en cada molécula de ácido nucleico, la secuencia que codifica la especie en particular de polipéptido quimérico está fusionada con una secuencia adicional que codifica una unión C-terminal. En una realización específica, la unión es capaz de llenar un túnel ribosómico.

5 Los polipéptidos, como se informa en el presente documento, son particularmente útiles en diferentes realizaciones de presentación, incluyendo presentación de fagos, presentación de ARNm y presentación de ribosomas. De forma específica, la presente divulgación presenta una composición de moléculas de ácido nucleico que codifican una población de polipéptidos que, de forma más específica, son polipéptidos quiméricos. Estos se pueden usar para presentación de estructura peptídica, secundaria y terciaria incluyendo métodos para identificación sistemática/selección para unión a diana de un dominio variable comprendido en los polipéptidos quiméricos. Los polipéptidos, como se informa en el presente documento, se pueden producir de forma recombinante, son termodinámicamente estables, monoméricos y solubles en soluciones acuosas.

15 Un aspecto, como se divulga en el presente documento, es una composición de moléculas de ácido nucleico (ARN y/o ADN) que codifica una población de especies de polipéptido quimérico, en la que cada molécula de ácido nucleico codifica una especie de polipéptido quimérico de acuerdo con la fórmula I



20 en la que

X es una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia variable,  
 S<sub>2</sub> y S<sub>1</sub> son secuencias de aminoácidos no variables y no solapantes obtenidas a partir (i) de un polipéptido con actividad de peptidil-prolil cis/trans-isomerasa (actividad de PPlasa) o (ii) a partir de un polipéptido de la familia del dominio de plegamiento de FKBP,  
 25 - entre dos aminoácidos representa un enlace peptídico, y  
 X está insertado en el lugar del dominio de inserción de Flap (dominio de IF) del polipéptido de (i) o del polipéptido de (ii).

30 En una realización de todos los aspectos, como se informa en el presente documento, los ácidos nucleicos están en forma de ARNm, es decir, en la realización específica, los ácidos nucleicos son moléculas de ARN capaces de ser traducidas por ribosomas funcionales. Además, en una realización específica más, en cada uno de los ARNm, el marco de lectura que codifica el polipéptido quimérico carece de un codón de parada, en particular un codón de parada seleccionado entre el grupo que consiste en UGA, UGG, y UAA.

35 Los polipéptidos quiméricos codificados, como se informa en el presente documento, son polipéptidos quiméricos que comprenden (i) una o más partes obtenidas a partir de uno, es decir el mismo, o diferentes polipéptidos con actividad de PPlasa o que pertenecen a la familia de FKBP, y (ii) una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia variable (indicada por "X" o "dominio X") insertada entre en la misma. De forma específica, una secuencia de aminoácidos variable de X está insertada en el lugar del dominio de inserción de Flap (dominio de IF) de la parte de SlyD del polipéptido quimérico, como se informa en el presente documento.

45 En una realización de todos los aspectos, como se informa en el presente documento, X se puede seleccionar entre un fragmento de un polipéptido de origen natural o X comprende una secuencia de aminoácidos aleatoria.

50 En una realización de todos los aspectos, como se informa en el presente documento, X comprende una secuencia de aminoácidos de 5 a 500 restos, en particular de 10 a 250 restos, en particular de 50 a 150 restos, en particular de 5 a 75 restos. En realizaciones específicas, X comprende una secuencia de aminoácidos de 12, 13, 14, 15 o 16 restos.

Además, en el presente documento se desvela el uso, en un sistema de traducción *in vitro*, de una composición de moléculas de ARN que codifican una población de especies de polipéptidos quiméricos, estando la composición especificada de acuerdo con cualquiera de las realizaciones de todos los aspectos como se informa en el presente documento, para presentar miembros o miembros emergentes de la población codificada de especies de polipéptidos quiméricos en complejos ternarios, en la que cada complejo ternario comprende una molécula de ARN de la composición de moléculas de ARN como ARNm, y un ribosoma funcional. Además, en el presente documento se desvela el uso, en un sistema de transcripción/traducción *in vitro*, de una composición de moléculas de ADN y ARN que codifican una población de especies de polipéptidos quiméricos, estando la composición especificada de acuerdo con cualquiera de las realizaciones de todos los aspectos como se informa en el presente documento, para presentar miembros o miembros emergentes de la población codificada de especies de polipéptidos quiméricos en complejos ternarios, en la que cada complejo ternario comprende una molécula de ARN de la composición de moléculas de ARN como ARNm, y un ribosoma funcional. Además, en el presente documento se desvela una composición que comprende una población de complejos ternarios, comprendiendo cada complejo ternario un ARNm y un ribosoma funcional, comprendiendo los ARNm de la población de complejos ternarios una composición de moléculas de ARN que codifican una población de especies de polipéptidos quiméricos de acuerdo con cualquiera de las realizaciones de todos los aspectos como se informa en el presente documento, en la que cada

complejo ternario presenta un miembro de una especie codificada de polipéptidos quiméricos o un miembro emergente de una especie codificada de polipéptidos quiméricos. Los complejos ternarios, como se desvela en el presente documento, se pueden usar en procedimientos de selección con respecto a una diana predeterminada. En los procedimientos de selección, se selecciona una secuencia de aminoácidos de X que se une de forma específica a la diana.

Para que la presentación de ribosomas permita la selección de polipéptidos funcionales con propiedades deseadas tales como unión a una diana predeterminada, el polipéptido presentado se debe plegar en su estructura tridimensional correcta mientras que todavía está unido al ribosoma. Como se desvela en el presente documento, una especie de polipéptidos quiméricos de fórmula I es particularmente útil para este fin ya que el armazón obtenido a partir (i) de un polipéptido con actividad de peptidil-prolil *cis/trans*-isomerasa (actividad de PPlasa) o (ii) a partir de un polipéptido de la familia del dominio de plegamiento de FKBP limita la conformación del dominio X que se inserta en lugar del dominio de inserción de Flap (dominio de IF) del polipéptido de (i) o del polipéptido de (ii). Debido a esta limitación, se reducen los grados de libertad para que el dominio X se pliegue, y por lo tanto se reduce el número de posibles conformaciones de X. Dado que X comprende 5 o más aminoácidos, cuanto más corta sea la secuencia de aminoácidos de X, más fuerte es este efecto estabilizante en la conformación de X. Cuanto más fuerte es el efecto estabilizante en la conformación de X, menores son los grados de libertad para X a presentar en conformaciones sustancialmente diferentes. De forma específica, el efecto estabilizante es particularmente fuerte cuando la secuencia de aminoácidos de X comprende de 5 a 500 aminoácidos, de forma más específica de 10 a 250 aminoácidos, de forma más específica de 50 a 150 aminoácidos, de forma más específica de 5 a 75 aminoácidos, de forma más específica de 10 a 30 aminoácidos, de forma más específica de 10 a 20 aminoácidos.

Además, para que la presentación de ribosomas permita la selección de polipéptidos funcionales con propiedades deseadas tales como unión a una diana predeterminada, normalmente se añade una región de "unión" o "espaciadora" y se fusiona con el extremo C-terminal de una biblioteca de polipéptidos. Tal espaciador. Está codificado genéticamente como una fusión en la posición 3' con respecto a la biblioteca de ADN de interés, que corresponde a una fusión C-terminal en el nivel de la secuencia de aminoácidos. Este espaciador polipeptídico fusionado en C-terminal llena el túnel ribosómico y proporciona una cierta flexibilidad extra, permitiendo de este modo que la proteína de interés se pliegue como una unidad independiente y segura a la diana. En realizaciones específicas, el espaciador puede comprender una secuencia de bloqueo de la traducción, tal como SecM.

En una realización específica adicional de acuerdo con la divulgación en el presente documento, el ARNm que codifican la biblioteca está protegido frente a la digestión nucleolítica, por ejemplo por la presencia de una estructura de horquilla de ARN en el extremo en la posición 3' del ARNm.

Con respecto a la estabilidad de los complejos ternarios resultantes entre ARNm, ribosomas, y polipéptido traducido, en condiciones experimentales apropiadas, los complejos son estables y se pueden mantener durante más de 10 días permitiendo de ese modo selecciones de velocidad de disociación muy amplias. Esta estabilización es posible enfriando los complejos ternarios y añadiendo una concentración elevada de  $Mg^{2+}$  al tampón, que se cree que "reticula" los grupos fosfato en el ARN ribosómico, y de este modo se puede evitar la disociación de los complejos ribosómicos a temperaturas disminuidas. Una ventaja del mantenimiento de los complejos ternarios es que parece que los polipéptidos presentados en el ribosoma son menos propensos a la agregación. Aunque las selecciones se tienen que realizar a baja temperatura, las moléculas seleccionadas tienen las mismas afinidades elevadas a temperaturas elevadas.

A modo de ilustración no limitante, las etapas de presentación de ribosomas conocidas en la técnica, por ejemplo mediante la divulgación de Lipovsek D. y Plückthun A. J. *Immunol. Methods* 290 (2004) 51-67, se pueden resumir como sigue a continuación. (1) Una biblioteca de ADN que codifican polipéptido de interés se fusiona en marco con respecto a una región de unión C-terminal mediante ligación de ADN. Este ADN no porta un codón de parada y se transcribe en el ARNm. (2) El ARNm se usa como molde para traducción *in vitro*. Después de traducir toda la secuencia codificante, el ribosoma se detiene y el polipéptido traducido que ha emergido del ribosoma se pliega en una estructura tridimensional. Como resultado, se obtienen complejos ternarios. (3) La diana se añade, por ejemplo, en forma biotinilada, y los complejos ternarios se unen y capturan, por ejemplo, mediante perlas magnéticas revestidas con estreptavidina, y se lavan para retirar los miembros de la biblioteca que se unen débilmente o que no se unen de forma específica. (4) Para recuperar la biblioteca enriquecida para secuencias de unión a diana, se añade EDTA para desestabilizar los complejos ternarios y el ARNm se aísla de los complejos ternarios disociados. Como alternativa, se puede realizar una elución competitiva con la molécula diana antes de aislar el ARNm. (5) Una reacción de transcripción inversa seguida de PCR (RT/PCR) proporciona el molde de ADN para la siguiente ronda. En esta etapa, se puede usar opcionalmente PCR propensa a error para aumentar la diversidad centrada alrededor de las secuencias enriquecidas. Dependiendo de la complejidad de la biblioteca, el tipo de armazón de proteína y de la diana, pueden ser necesarias de dos a seis rondas de selección para seleccionar proteínas con baja afinidad nanomolar o subnanomolar para la diana.

Además, en el presente documento se desvela un método o de presentación de ribosomas para identificar una secuencia de aminoácidos de un dominio X que se une a una diana predeterminada, comprendiendo el método las etapas de

(1) proporcionar, como los ARNm, una composición de moléculas de ARN que codifican una población de especies de polipéptidos quiméricos de acuerdo con cualquiera de las realizaciones de todos los aspectos como se informa en el presente documento;

(2) poner en contacto los ARNm de la etapa (1) con un sistema de traducción *in vitro* y traducir los ARNm, y formar una composición que comprende una población de complejos ternarios, comprendiendo cada complejo ternario un ARNm y un ribosoma funcional, en la que cada complejo ternario presenta un miembro emergente de una especie codificada de polipéptidos quiméricos;

(3) poner en contacto los complejos ternarios obtenidos en la etapa (2) con la diana predeterminada en condiciones de unión acuosas capaces de mantener intactos los complejos ternarios y adecuadas para la unión no covalente específica de miembros emergentes con respecto a la diana, formando de ese modo una mezcla de complejos ternarios no unidos y unidos, en el que los complejos ternarios unidos comprenden miembros emergentes de especies de polipéptidos quiméricos, estando los miembros emergentes unidos a la diana;

(4) separar los complejos ternarios intactos unidos a la diana de los complejos ternarios no unidos lavando los complejos ternarios unidos con una solución de lavado y retirando los complejos ternarios no unidos;

(5) disociar los complejos ternarios unidos a diana obtenidos en la etapa (4), y sintetizar los ADNc a partir del ARNm de los complejos ternarios disociados;

(6) determinar, en un ADNc obtenido en la etapa (5), la secuencia de ácidos nucleicos que codifica el dominio X, y deducir a partir de la misma la secuencia de aminoácidos de X,

identificando de ese modo la secuencia de aminoácidos de un dominio X que se une a la diana predeterminada.

En una realización de todos los aspectos, como se informa en el presente documento, X está formado de acuerdo con la fórmula II

U-O-Z (fórmula II),

en la que

O es una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia variable,

U y Z se seleccionan independientemente entre sí, en la que cualquiera está presente o ausente y, si estuviera presente, cada uno de U y/o Z es una secuencia de aminoácidos no variable que comprende de 1 a 10 restos, y U, si estuviera presente, se une con un enlace peptídico a S<sub>2</sub>, y Z, si estuviera presente, se une con un enlace peptídico a S<sub>1</sub>.

En una realización específica, cada uno de U y/o Z es una secuencia de aminoácidos de 1 a 5 restos, y en particular de 4 restos. De forma más específica, U, si estuviera presente, es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 (GAGS), y Z, si estuviera presente es la secuencia de aminoácidos de GSSG (SEQ ID NO: 2) o la secuencia de aminoácidos de GSS (SEQ ID NO: 3). Por un lado, cada uno del segmento GAGS y el segmento GSSG puede proporcionar un cierto grado de flexibilidad estérica que puede ser deseable. Sin embargo, dado que el ADN que codifica el segmento de GAGS se puede diseñar para que contenga un sitio de escisión de enzimas de restricción de BamHI, las etapas de clonación, que transfieren la secuencia de nucleótidos que codifican el elemento O de un vector a otro, se simplifican. El mismo razonamiento se aplica al segmento de GSSG, cuya secuencia codificante se puede diseñar para que contenga un sitio de escisión de enzimas de restricción de SacI. Por lo tanto, la secuencia de nucleótidos que codifica O se puede proporcionar de forma ventajosa como un casete de BamHI-SacI.

En una realización de todos los aspectos, como se informa en el presente documento, la secuencia de aminoácidos de O o la secuencia de aminoácidos de X está formada por un subconjunto de los restos de aminoácidos de origen natural. En una realización específica, cada resto de la secuencia de aminoácidos de O o la secuencia de aminoácidos de X se selecciona independientemente entre el listado de restos de aminoácidos que consiste en Y, F, L, P, D, V, R, Q, S, I, E, G, W, A, H, T, N, K, y M. En una realización de todos los aspectos como se informa en el presente documento, en la población de especies codificadas especies de polipéptidos quiméricos, la frecuencia relativa media de aparición de un resto de aminoácido en particular en la secuencia de aminoácidos de O o la secuencia de aminoácidos de X es de un 8,5 % a un 11,5 % para Y, de un 8,5 % a un 11,5 % para F, de un 8,5 % a un 11,5 % para L, de un 5 % a un 8 % para P, de un 4,5 % a un 7,5 % para D, de un 4,5 % a un 7,5 % para V, de un 4,5 % a un 7,5 % para R, de un 4 % a un 7 % para Q, de un 4 % a un 7 % para S, de un 3,5 % a un 6,5 % para I, de un 3 % a un 6 % para E, de un 3 % a un 6 % para G, de un 3 % a un 6 % para W, de un 3 % a un 6 % para A, de un 2,5 % a un 5,5 % para H, de un 2 % a un 5 % para T, de un 1 % a un 4 % para N, de un 0,5 % a un 3,5 % para K, y de un 0,5 % a un 2,5 % para M.

El dominio de CDR-H3 es una región específica de la cadena pesada dentro de anticuerpos, de una región determinante de la complementariedad (CDR). CDR-H3 forma parte en la unión al epítipo. Por lo tanto, puede ser deseable imitar una composición de aminoácidos de CDR-H3 en una biblioteca de "bucle individual" tal como la composición de moléculas de ácido nucleico (ARN y/o ADN) que codifican una población de especies de polipéptido quimérico, estando la composición especificada de acuerdo con cualquiera de las realizaciones de todos los aspectos como se informa en el presente documento. Por lo tanto, la frecuencia de ciertos aminoácidos puede presentar patrones dependientes de la longitud bastante diferentes en un bucle de CDR-H3. Por ejemplo, los

aminoácidos que median la afinidad irían a fundamentales, tales como Y y W aumentan en el flanco fuera de pico de CDR-H3 de caída (Zemlin, M. *et al.*, J Mol Biol 334 (2003) 733-749). Mientras que una afinidad de unión a anticuerpo se puede incrementar por unión cooperativa entre otras CDR, una estrategia de bucle individual necesita un enfoque en el posicionamiento fiscal de restos de aminoácidos que median la afinidad fundamentales y su distribución adecuada con respecto a toda la secuencia de aminoácidos variable (de forma específica X y/u O) codificada en la biblioteca de moléculas de ácido nucleico.

Cuando los restos de aminoácidos de Y (35 %), G (13 %) y S (8 %) dominan en las secuencias de línea germinal de anticuerpo humano (Zemlin M, *et al.*, mencionado anteriormente), especialmente los restos de G y S podrían generar flexibilidad, pero no la suficiente contribución de afinidad en un bucle de unión de péptidos individual. Con la ventaja técnica, se puede reducir el contenido de los restos de aminoácidos G y S en cualquiera de los dominios X y O, con el fin de mejorar la probabilidad de Identificar en la biblioteca un miembro con características de unión a diana deseadas mediadas por cualquiera de los dominios codificados X u O.

En interacciones de origen natural entre aglutinantes y sus respectivas dianas, los aminoácidos W, F, Y, I y L están sobrerrepresentados en interacciones de péptido-proteína (London, N., *et al.*, Structure 18 (2010) 188-199). Con la ventaja técnica, el contenido de los restos de aminoácidos L, F e I está sobrerrepresentado en el dominio variable X u O presentado en la biblioteca, cuando se compara con la frecuencia de su respectiva presencia en secuencias de CDR-H3 de anticuerpo. El resto de aminoácido Y está sobrerrepresentado en bucles de CDR-H3 murinos (22,48 %) y humanos (10,89 %), pero en una realización específica como se desvela en el presente documento, la secuencia de aminoácidos variable en la biblioteca incorporada contiene Y a un nivel inferior. Una sobrerrepresentación del resto de aminoácido W puede no ser ventajosa para la unión a diana para y para la solubilidad de un dominio X aislado o un dominio aislado O. Con la ventaja técnica, en cualquiera de las realizaciones de todos los aspectos como se informa en el presente documento, el contenido del resto de aminoácido W en la porción de secuencia de aminoácidos variable es inferior a un 8 %, y en particular a aproximadamente un 4 %. Se proporciona una ventaja técnica adicional evitando en el dominio variable X u O una secuencia consecutiva de una pluralidad de restos de aminoácidos W. Sin embargo, en comparación con la frecuencia de aparición de restos de aminoácidos W en CDR-H3 humano (2,56 %) y murino (2,39 %) de 13 aminoácidos de longitud, se puede ganar una ventaja técnica aumentando el contenido de W en la biblioteca, aumentando de ese modo la formación de puntos de conflicto de unión de proteína en el dominio variable de X u O.

Aunque la frecuencia del resto de aminoácido P en CDR-H3 humano y murino de of 13 aminoácidos de longitud es de un 3,65 % (humano) y un 1,82 % (murino) (Zemlin, M. *et al.*, J Mol Biol 334 (2003). 733-749), la frecuencia de aplicación del resto de aminoácido P en una biblioteca, como se especifica de acuerdo con cualquiera de las realizaciones de todos los aspectos como se informa en el presente documento, se establece de forma ventajosa en un 5 %. La estabilización de la estructura secundaria mediada por motivos ricos en prolina puede contribuir a la afinidad hacia la diana y a la estabilidad en fluidos biológicos. Dado que en una realización específica la biblioteca se une de forma flexible al FKBP de SlyD rígido con los segmentos de aminoácidos GAGS y GSSG, la prolina puede soportar la formación de estructuras secundarias autónomas en la porción variable O reduciendo de este modo la entropía estructural.

En una biblioteca como se especifica de acuerdo con cualquiera de las realizaciones de todos los aspectos como se informa en el presente documento, el resto de aminoácido M está subrepresentado (1 %) en la región variable de X u O, en contraste con segmentos de CDR-H3 humano (1,45 %) y murino (2,94 %) de 13 aminoácidos de longitud, principalmente para reducir efectos potenciales debidos a la oxidación del grupo tio presente en M.

Aunque la frecuencia del resto de aminoácido H en segmentos de CDR-H3 humano y murino con una longitud de 13 aminoácidos es de un 1,7 % (humano) y un 1,22 % (murino) (Zemlin M, *et al.*, mencionado anteriormente) una biblioteca como se especifica de acuerdo con cualquiera de las realizaciones de todos los aspectos como se informa en el presente documento, contiene H en la región variable de X u O a aproximadamente un 4 %. También se ha encontrado que el resto de aminoácido H está sobrerrepresentado en restos que forman puntos de conflicto de unión a diana (London, mencionado anteriormente).

La frecuencia de D en CDR-H3 humano y murino con una longitud de 13 aminoácidos es de un 11 % (humano) y de un 10 % (murino) (Zemlin M, *et al.*, mencionado anteriormente). En una biblioteca como se especifica de acuerdo con cualquiera de las realizaciones de todos los aspectos como se informa en el presente documento, el resto de aminoácido D se redujo a aproximadamente un 5 % en la región variable de X u O, porque D no está aparentemente sobrerrepresentado en interacciones de péptido y proteína.

Para compensar la falta del resto de aminoácido D, la frecuencia de E se estableció en aproximadamente un 5 % en la región variable de X u O en una biblioteca como se especifica de acuerdo con cualquiera de las realizaciones de todos los aspectos como se informa en el presente documento. Esta medida permite aumentar las cargas negativas. Por el contrario, en CDR-H3 humano y murino con una longitud de 13 aminoácidos, D se representa simplemente con un 2,05 % (humano) y un 1,14 % (murino) (Zemlin M, *et al.*, mencionado anteriormente).

La frecuencia del resto de aminoácido R en CDR-H3 humano y murino con una longitud de 13 aminoácidos es de un 9 % (humano) y de un 10,5 % (murino) (Zemlin M, *et al.*, mencionado anteriormente). En una biblioteca como se especifica de acuerdo con cualquiera de las realizaciones de todos los aspectos como se informa en el presente documento, R se reduce de forma ventajosa a aproximadamente un 5 %, ya que aparentemente R no está sobrerrepresentado en restos de formación de puntos de conflicto de unión de péptido-proteína (London, mencionado anteriormente).

En realizaciones específicas adicionales, la composición de aminoácidos de la región variable de dominio X o dominio O, se pueden seleccionar textos ácidos de un 11 % y restos básicos de un 14 % de modo que un 25 % de los restos cargados están equilibrados con un 25 % de restos alifáticos. El aminoácido K se reduce de forma ventajosa para evitar la aparición accidental de sitios de escisión de proteasa. Además, se pueden seleccionar restos de aminoácidos tales como A, G, S, C y T hasta un valor de agregado de un contenido teórico de un 16 %. Se pueden seleccionar aminoácidos tales como A, D, G, N, P, S, T, V, C hasta un valor de agregado de un contenido de un 36 %. Se pueden seleccionar aminoácidos aromáticos, tales como F, H, W, Y ca hasta un valor de agregado de un contenido de un 28 %. Se pueden seleccionar restos alifáticos, tales como A, I, L, V hasta un valor de agregados de un 26 %. Se pueden seleccionar restos polares, tales como D, E, H, K, N, Q, R, S, T hasta un valor de agregado de un 41 %. Se pueden seleccionar restos no polares, tales como A, C, F, G, I, L, M, P, V, W, Y hasta un valor de agregado de un 59 %. Se pueden seleccionar restos ácidos, tales como D y E can hasta un valor de agregado de un 11 %. Se pueden seleccionar restos básicos, tales como H, K, R hasta un valor de agregado de un 14 %. Se pueden seleccionar restos cargados, tales como D, E, H, K, R hasta un valor de agregado de un 25 %. Se puede seleccionar P relevante estructural hasta un valor de agregado de un 5 %.

Aparte de los métodos y procedimientos incluidos por presentación de ribosomas, también se pueden identificar aglutinantes específicos usando cualquier metodología de identificación sistemática y de presentación de biblioteca, tal como presentación de ARNm, presentación de fagos, presentación de superficie celular, y presentación viral, en particular en realizaciones específicas adicionales que usan moléculas de ácidos nucleicos que codifican polipéptido quimérico como se informa en el presente documento.

En el presente documento se desvela una composición de ácido nucleico (moléculas que codifican una población de especies de polipéptidos quiméricos, las chaperonas de SlyD de *Thermus thermophilus* y SlyD de *Thermococcus gammatdurans* están libres de restos de cisteína restos, permitiendo de este modo una presentación de polipéptidos sin ningún producto de oxidación sin controlar de cisteínas.

Además, en el presente documento se desvela un método para producir un polipéptido restringido, siendo el polipéptido restringido un aglutinante específico de una diana predeterminada, comprendiendo el método las etapas de

(1) identificar, de acuerdo con un método de acuerdo con cualquiera de las realizaciones de todos los aspectos como se informa en el presente documento, una secuencia de aminoácidos de un dominio X que se une a la diana predeterminada, en la que el dominio X se identifica como un dominio que sustituye al dominio de IF en (i) un polipéptido con actividad de peptidil-prolil cis/trans-isomerasa (actividad de PPlasa) o (ii) un polipéptido de la familia del dominio de plegamiento de FKBP;

(2) proporcionar un polipéptido lineal que comprende la secuencia de aminoácidos del dominio X identificada en la etapa (1);

(3) conectar el extremo N-terminal y el extremo C-terminal del polipéptido de la etapa (2), en el que la distancia del extremo N-terminal y el extremo C-terminal conectados del polipéptido imita la distancia del extremo N-terminal y el extremo C-terminal conectados del dominio de IF, de (i) el polipéptido con actividad de peptidil-prolil cis/trans-isomerasa (actividad de PPlasa) o (ii) el polipéptido de la familia del dominio de plegamiento de FKBP;

produciendo de ese modo el polipéptido restringido, siendo el polipéptido restringido un aglutinante específico de la diana predeterminada.

Con respecto a la etapa (2), los polipéptidos de acuerdo con la presente divulgación se pueden preparar mediante métodos de síntesis química, que son bien conocidos por el experto en la materia y se describen en el presente documento. Véase, por ejemplo, Fields *et al.*, Capítulo 3 en *Synthetic Peptides: A User's Guide*, ed. Grant, W. H. Freeman & Co., New York, N.Y., 1992, p. 77; y Bird, G. H., *et al.*, *Methods Enzymol* 446, 369-86 (2008). Por lo tanto, se pueden sintetizar péptidos usando las técnicas automatizadas de Merrifield de síntesis en fase sólida con el alfa-NH<sub>2</sub> protegido con química de cualquiera de t-Boc o Fmoc usando aminoácidos con cadena lateral protegida, por ejemplo, en un Sintetizador de Péptidos de Applied Biosystems, Modelo 430A o 431 o el sintetizador de múltiples canales de AAPPTEC, APEX 396. Una forma para preparar los péptidos que se describen en el presente documento es usando síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS). El aminoácido C-terminal se une a una resina de poliestireno reticulada a través de un enlace lábil ácido con una molécula de conector. Esta resina es insoluble en los disolventes usados para síntesis, haciendo relativamente sencillo y rápido retirar por lavado el exceso de reactivos y productos secundarios. El extremo N-terminal está protegido con el grupo Fmoc, que es estable en ácido, pero se puede retirar con base. Cualquier grupo funcional de cadena lateral está protegido con grupos lábiles en ácido, estables en base también se pueden preparar péptidos más largos uniendo péptidos sintéticos individuales usando ligación química

nativa. Como alternativa, se pueden sintetizar péptidos sintéticos más largos mediante técnicas de ADN recombinante bien conocidas. Dichas técnicas se proporcionan en manuales convencionales bien conocidos con protocolos detallados. Para construir una secuencia codificante que codifique un péptido de la presente invención, la secuencia de aminoácidos se traduce de forma inversa para obtener una secuencia de ácidos nucleicos que codifica la secuencia de aminoácidos, preferentemente con codones que son óptimos para el organismo en el que se va a expresar el gen. A continuación, se prepara una secuencia de codificante, por lo general mediante síntesis de oligonucleótidos que codifican el péptido y cualquier elemento regulador, si fuera necesario. La secuencia codificante se inserta en un vector de clonación adecuado y se transfecta en una célula hospedadora. Además, la célula hospedadora está diseñada por ingeniería poder que pueda ser capaz de incorporar los aminoácidos no naturales para la grapa de hidrocarburo. El péptido se expresa a continuación en condiciones adecuadas apropiadas para el sistema de expresión y el hospedador seleccionados. Véase Liu *et al.*, Proc. Nat. Acad. Sci (USA), 94: 10092-10097 (1997). El péptido se purifica y se caracteriza con métodos convencionales.

Los polipéptidos restringidos desvelados en el presente documento pueden comprender una porción cíclica. En una realización específica, en la etapa (3) el extremo N-terminal y el extremo C-terminal del polipéptido se conectan de forma covalente con "grupo de unión". Los polipéptidos restringidos se pueden producir como péptidos lineales que posteriormente se ciclan mediante enlaces no peptídicos, por ejemplo mediante enlaces disulfuro restos de cisteína colocados de forma distal, a menudo cisteínas N-terminales y C-terminales. Los polipéptidos se pueden restringir con cualquiera de varios medios bien conocidos. En realizaciones preferentes, los enlaces disulfuro entre dos cisteínas no adyacentes se ciclan y de ese modo limitan al polipéptido de forma conformacional.

Los polipéptidos restringidos se pueden mejorar, por ejemplo con respecto a la unión a diana, mediante su modificación. Los métodos para sintetizar péptidos restringidos con modificaciones para colocarlos dentro del alcance de la presente divulgación se conocen bien y están completamente dentro de la habilidad de los que tienen una experiencia habitual en la materia. En consecuencia, las modificaciones incluyen intercambio de aminoácido de origen natural con un compuesto natural capaz de unirse de forma covalente a con aminoácidos por medio de enlaces peptídicos.

Los aspectos y realizaciones adicionales desvelados en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, los siguientes puntos:

1. Una composición de moléculas de ácido nucleico (ARN y/o ADN) que codifican una población de especies de polipéptido quimérico, en la que cada molécula de ácido nucleico codifica una especie de polipéptido quimérico de acuerdo con la fórmula I



en la que

X es una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia variable,  
 $S_2$  y  $S_1$  son secuencias de aminoácidos no variables y no solapantes obtenidas a partir (i) de un polipéptido con actividad de peptidil-prolil cis/trans-isomerasa (actividad de PPIasa) o (ii) de un polipéptido de la familia del dominio de plegamiento de FKBP,  
 - entre dos aminoácidos representa un enlace peptídico, y  
 X está insertado en el lugar del dominio de inserción de Flap (dominio de IF) del polipéptido de (i) o del polipéptido de (ii).

2. La composición de acuerdo con el punto 1, en la que X comprende una secuencia de aminoácidos de 5 a 500 restos.

3. La composición de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 y 2, en la que X comprende una secuencia de aminoácidos de 10 a 250 restos.

4. La composición de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 3, en la que X comprende una secuencia de aminoácidos de 50 a 150 restos.

5. La composición de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 4, en la que X comprende una secuencia de aminoácidos de 5 a 75 restos, de forma específica de 10 a 70 restos, de forma más específica de 10 a 30 restos, de forma más específica de 10 a 20 restos, de forma más específica 12, 13, 14, 15 o 16 restos.

6. La composición de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 5, en la que X está formado de acuerdo con la fórmula II



en la que

O es una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia variable,  
 U y Z se seleccionan independientemente entre sí, en la que cualquiera está presente o ausente y, si

estuviera presente, cada uno de U y/o Z es una secuencia de aminoácidos no variable que comprende de 1 a 10 restos, y

U, si estuviera presente, se une con un enlace peptídico a S<sub>2</sub>, y Z, si estuviera presente, se une con un enlace peptídico a S<sub>1</sub>.

- 5
7. La composición de acuerdo con el punto 6, en la que cada uno de U y/o Z es una secuencia de aminoácidos de 1 a 5 restos, y en particular de 4 restos.
8. La composición de acuerdo con cualquiera de los puntos 6 y 7, en la que U, si está presente, es la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 (GAGS), y Z, si está presente, es la secuencia de aminoácidos GSSG (SEQ ID NO: 2) o la secuencia de aminoácidos GSS (SEQ ID NO: 3).
- 10
9. La composición de acuerdo con cualquiera de los puntos 6 a 8, en la que la secuencia de aminoácidos de O está formada por un subconjunto de los restos de aminoácidos de origen natural.
10. La composición de acuerdo con el punto 9, en la que cada resto de la secuencia de aminoácidos de O se selecciona independientemente entre el listado de restos de aminoácidos que consiste en Y, F, L, P, D, V, R, Q, S, I, E, G, W, A, H, T, N, K, y M.
- 15
11. La composición de acuerdo con el punto 10, en la que, en la población de especies de polipéptido quimérico, la frecuencia relativa media de aparición de un resto de aminoácido en particular en la secuencia de aminoácidos de O es de un 8,5 % a un 11,5 % para Y, de un 8,5 % a un 11,5 % para F, de un 8,5 % a un 11,5 % para L, de un 5 % a un 8 % para P, de un 4,5 % a un 7,5 % para D, de un 4,5 % a un 7,5 % para V, de un 4,5 % a un 7,5 % para R, de un 4 % a un 7 % para Q, de un 4 % a un 7 % para S, de un 3,5 % a un 6,5 % para I, de un 3 % a un 6 % para E, de un 3 % a un 6 % para G, de un 3 % a un 6 % para W, de un 3 % a un 6 % para A, de un 2,5 % a un 5,5 % para H, de un 2 % a un 5 % para T, de un 1 % a un 4 % para N, de un 0,5 % a un 3,5 % para K, y de un 0,5 % a un 2,5 % para M.
- 20
12. La composición de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 11, en la que las secuencias de aminoácidos codificados de S<sub>2</sub> y S<sub>1</sub> son fragmentos de un polipéptido de origen natural, en la que, en el polipéptido de origen natural, un dominio de IF está situado entre S<sub>2</sub> y S<sub>1</sub>.
- 25
13. La composición de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 12, en la que las secuencias de aminoácidos codificados de S<sub>2</sub> y S<sub>1</sub> son fragmentos de un polipéptido de origen natural que es (i) un polipéptido con actividad de peptidil-prolil cis/trans-isomerasa (actividad de PPlasa) o (ii) un polipéptido de la familia del dominio de plegamiento de FKBP.
- 30
14. La composición de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 13, en la que las secuencias de aminoácidos codificados de S<sub>2</sub> y S<sub>1</sub> son fragmentos de un polipéptido SlyD.
15. La composición de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 14, en la que las secuencias de aminoácidos codificados de S<sub>2</sub> y S<sub>1</sub> son fragmentos de un polipéptido obtenido a partir de un termófilo.
- 35
16. La composición de acuerdo con el punto 15, en la que las secuencias de aminoácidos codificados de S<sub>2</sub> y S<sub>1</sub> son fragmentos de un polipéptido obtenido a partir de una bacteria termófila o una Arquea termófila.
17. La composición de acuerdo con cualquiera de los puntos 15 y 16, en la que las secuencias de aminoácidos codificados de S<sub>2</sub> y S<sub>1</sub> son fragmentos de un polipéptido obtenido a partir de un termófilo de la familia de Thermaceae.
- 40
18. La composición de acuerdo con cualquiera de los puntos 15 a 17, en la que las secuencias de aminoácidos codificados de S<sub>2</sub> y S<sub>1</sub> son fragmentos de un polipéptido obtenido a partir de *Thermus thermophilus*.
19. La composición de acuerdo con cualquiera de los puntos 15 y 16, en la que las secuencias de aminoácidos codificados de S<sub>2</sub> y S<sub>1</sub> son fragmentos de un polipéptido obtenido a partir de una Arquea hipertermófila.
- 45
20. La composición de acuerdo con cualquiera de los puntos 15, 16, y 19, en la que las secuencias de aminoácidos codificados de S<sub>2</sub> y S<sub>1</sub> son fragmentos de un polipéptido obtenido a partir de un termófilo de la clase de Thermococcos.
21. La composición de acuerdo con cualquiera de los puntos 15, 16, 19, y 20, en la que las secuencias de aminoácidos codificados de S<sub>2</sub> y S<sub>1</sub> son fragmentos de un polipéptido obtenido a partir de *Thermococcus gammatolerans*.
- 50
22. Uso, en un sistema de traducción *in vitro*, de una composición de moléculas de ARN que codifican una población de especies de polipéptidos quiméricos, estando la composición especificada de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 21, para presentar miembros o miembros emergentes de la población codificada de especies de polipéptidos quiméricos en complejos ternarios, en la que cada complejo ternario comprende
- 55
- una molécula de ARN de la composición de moléculas de ARN como ARNm, y un ribosoma funcional.
23. Uso, en un sistema de transcripción/traducción *in vitro*, de una composición de moléculas de ADN y ARN que codifican una población de especies de polipéptidos quiméricos, estando la composición especificada de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 21, para presentar miembros o miembros emergentes de la población codificada de especies de polipéptidos quiméricos en complejos ternarios,
- 60
- en la que cada complejo ternario comprende una molécula de ARN de la composición de moléculas de ARN como ARNm, y un ribosoma funcional.
- 65
24. Una composición que comprende una población de complejos ternarios, comprendiendo cada complejo ternario un ARNm y un ribosoma funcional, comprendiendo los ARNm de la población de complejos ternarios una composición de moléculas de ARN que codifican una población de especies de polipéptidos quiméricos de

acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 21, en la que cada complejo ternario presenta un miembro o miembro emergente de una especie codificada de polipéptidos quiméricos.

25. La composición de acuerdo con el punto 24, en la que, en un miembro emergente de una especie codificada de polipéptidos quiméricos, la distancia entre el enlace peptídico C-terminal de  $S_2$  y el enlace peptídico N-terminal de  $S_1$  imita la distancia de los enlaces específicos correspondientes de  $S_2$  y  $S_1$  conectados por un dominio de IF en un polipéptido obtenido a partir (i) de un polipéptido con actividad de peptidil-prolil cis/trans-isomerasa (actividad de PPIasa) o (ii) a partir de un polipéptido de la familia del dominio de plegamiento de FKBP.

26. La composición de acuerdo con cualquiera de los puntos 24 y 25, en la que en un miembro emergente de una especie codificada de polipéptidos quiméricos  $S_2$  y al menos la parte N-terminal traducida de  $S_1$  se pliegan como en el miembro de longitud completa correspondiente de la especie de polipéptidos quiméricos, teniendo el miembro un dominio de FKBP intacto.

27. Un método para identificar una secuencia de aminoácidos de un dominio X que se une a una diana predeterminada, comprendiendo el método las etapas de

(1) proporcionar, como los ARNm, una composición de moléculas de ARN que codifican una población de especies de polipéptidos quiméricos de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 21;

(2) poner en contacto los ARNm de la etapa (1) con un sistema de traducción *in vitro* y traducir los ARNm, y formar una composición que comprende una población de complejos ternarios, comprendiendo cada complejo ternario un ARNm y un ribosoma funcional, en la que cada complejo ternario presenta un miembro emergente de una especie codificada de polipéptidos quiméricos;

(3) poner en contacto los complejos ternarios obtenidos en la etapa (2) con la diana predeterminada en condiciones de unión acuosas capaces de mantener intactos los complejos ternarios y adecuadas para la unión no covalente específica de miembros emergentes con respecto a la diana, formando de ese modo una mezcla de complejos ternarios no unidos y unidos, en el que los complejos ternarios unidos comprenden miembros emergentes de especies de polipéptidos quiméricos, estando los miembros emergentes unidos a la diana;

(4) separar los complejos ternarios intactos unidos a la diana de los complejos ternarios no unidos lavando los complejos ternarios intactos unidos con una solución de lavado y retirando los complejos ternarios no unidos;

(5) disociar los complejos ternarios unidos a diana obtenidos en la etapa (4), y sintetizar los ADNc a partir del ARNm de los complejos ternarios disociados;

(6) determinar, en un ADNc obtenido en la etapa (5), la secuencia de ácidos nucleicos que codifica el dominio X, y deducir a partir de la misma la secuencia de aminoácidos de X,

identificando de ese modo la secuencia de aminoácidos de un dominio X que se une a la diana predeterminada.

28. El método de acuerdo con el punto 27, en el que después de la etapa (5) realizada por primera vez y antes de realizar la etapa (6), las etapas (5a) y (5b) se realizan de forma consecutiva un número de veces deseado, en el que

(5a) comprende sintetizar los ARNm a partir de los ADNc obtenidos en la etapa realizada en último lugar (5), proporcionando de ese modo los ARNm recién sintetizados que comprenden una composición de moléculas de ARN que codifican una población de especies de polipéptidos quiméricos de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 21, seguido de

(5b) comprende realizar las etapas 2 a 5 con los ARNm recién sintetizados, y la etapa (6) se realiza con el ADNc obtenido en la etapa realizada en último lugar (5).

29. El método de acuerdo con el punto 28, en el que número de veces que las etapas (5a) y (5b) se realizan de forma consecutiva es de 1 a 12, de forma más específica el número de veces se selecciona entre 1, 2, 3, 4, 5, y 6.

30. El método de acuerdo con cualquiera de los puntos 27 a 29, en el que la etapa (6) se realiza para una pluralidad de ADNc obtenidos en la etapa (5) o en la etapa realizada en último lugar (5), identificando de ese modo secuencias de aminoácidos de una pluralidad de especies de dominio X (especies de dominio X), en el que cada una de las especies del dominio X se obtiene a partir de una especie de polipéptido quimérico, y en el que cada dominio especie de dominio X se une a la diana predeterminada.

31. El método de acuerdo con el punto 30, en el que en la etapa (6) las secuencias de ácidos nucleicos de los ADNc se determinan en paralelo por medio de secuenciación de alto rendimiento.

32. El método de acuerdo con cualquiera de los puntos 30 y 31, en el que las secuencias de aminoácidos deducidas para las especies de dominio X se agrupan de acuerdo con secuencias consenso,

proporcionando de ese modo uno o más grupos con miembros, obteniéndose cada miembro a partir de la secuencia de aminoácidos codificada por un ADNc determinado por separado,

en el que los miembros dentro del mismo grupo se caracterizan por una secuencia de aminoácidos consenso común, y la secuencia de aminoácidos consenso es una subsecuencia contigua de las secuencias de aminoácidos de la especie de dominio X dentro del grupo.

33. El método de acuerdo con el punto 32, en el que se selecciona una secuencia de aminoácidos del dominio X en el grupo con el mayor número de miembros con, identificando de ese modo la secuencia de aminoácidos de

un dominio X que se une a la diana predeterminada.

34. El método de acuerdo con cualquiera de los puntos 30 y 31, en el que las secuencias de aminoácidos deducidas para la especie de dominio X se agruparon de acuerdo con identidad de secuencias, proporcionando de ese modo uno o más grupos con miembros, obteniéndose cada miembro a partir de la secuencia de aminoácidos codificada por un ADNc determinado por separado,

en el que los miembros dentro del mismo grupo se caracterizan por una secuencia de aminoácidos idéntica.

35. El método de acuerdo con el punto 34, en el que se selecciona la secuencia de aminoácidos del dominio X del grupo con el mayor número de miembros, identificando de ese modo la secuencia de aminoácidos de un dominio X que se une a la diana predeterminada.

36. Un método para producir un polipéptido restringido, siendo el polipéptido restringido un aglutinante específico de una diana predeterminada, comprendiendo el método las etapas de

(1) identificar, de acuerdo con un método de acuerdo con cualquiera de los puntos 27 a 35, una secuencia de aminoácidos de un dominio X que se une a la diana predeterminada, en la que el dominio X se identifica como un dominio que sustituye al dominio de IF en (i) un polipéptido con actividad de peptidil-prolil cis/trans-isomerasa (actividad de PPLasa) o (ii) un polipéptido de la familia del dominio de plegamiento de FKBP;

(2) proporcionar un polipéptido lineal que comprende la secuencia de aminoácidos del dominio X identificada en la etapa (1);

(3) conectar el extremo N-terminal y el extremo C-terminal del polipéptido de la etapa (2), en el que la distancia del extremo N-terminal y el extremo C-terminal conectados del polipéptido imita la distancia del extremo N-terminal y el extremo C-terminal conectados del dominio de IF, de (i) el polipéptido con actividad de peptidil-prolil cis/trans-isomerasa (actividad de PPLasa) o (ii) el polipéptido de la familia del dominio de plegamiento de FKBP;

produciendo de ese modo el polipéptido restringido, siendo el polipéptido restringido un aglutinante específico de la diana predeterminada.

37. El método de acuerdo con el punto 36, en el que, en el polipéptido restringido, la distancia entre el extremo N-terminal y el extremo C-terminal conectados el polipéptido es de  $4 \times 10^{-10}$  m a  $6 \times 10^{-10}$  m.

38. El método de acuerdo con cualquiera de los puntos 36 y 37, en el que, en la etapa (3), el extremo N-terminal y el extremo C-terminal del polipéptido se conectan de forma covalente con un grupo de unión.

39. El método de acuerdo con cualquiera de los puntos 36 a 38, en el que la secuencia de aminoácidos del polipéptido está libre de restos de cisteína.

40. El método de acuerdo con cualquiera de los puntos 36 a 39, en el que, ya sea en la etapa (2) o en la etapa (3), se añade un resto de cisteína a la cada uno del extremo N-terminal y del extremo C-terminal del polipéptido, y se forma un puente disulfuro entre los dos restos de cisteína añadidos, produciendo de ese modo el polipéptido restringido, siendo el polipéptido restringido un aglutinante específico de la diana predeterminada.

41. El método de acuerdo con el punto 40, en el que se añade un resto de aminoácido adicional a un resto de cisteína añadido.

42. Un método para evaluar una diana predeterminada (diana) en una muestra de la que se sospecha que contiene la diana, comprendiendo el método las etapas de

(1) identificar, de acuerdo con un método de acuerdo con cualquiera de los puntos 27 a 35, una secuencia de aminoácidos de un dominio X que se une a la diana predeterminada, en la que el dominio X se identifica como un dominio que sustituye al dominio de IF en (i) un polipéptido con actividad de peptidil-prolil cis/trans-isomerasa (actividad de PPLasa) o (ii) un polipéptido de la familia del dominio de plegamiento de FKBP;

(2) proporcionan un polipéptido quimérico que comprende un polipéptido con la fórmula I



en la que

X es la secuencia de aminoácidos identificada en la etapa (1),

S<sub>2</sub> y S<sub>1</sub> son secuencias de aminoácidos no variables y no solapantes obtenidas a partir (i) de un polipéptido con actividad de peptidil-prolil cis/trans-isomerasa (actividad de PPLasa) o (ii) a partir de un polipéptido de la familia del dominio de plegamiento de FKBP,

- entre dos aminoácidos representa un enlace peptídico, y

X está insertado en el lugar del dominio de inserción de Flap (dominio de IF) del polipéptido de (i) o del polipéptido de (ii);

(3) poner en contacto la muestra con el polipéptido quimérico de la etapa (2) en condiciones que permitan la unión específica del polipéptido quimérico a la diana, formando de ese modo una mezcla de un polipéptido quimérico no unido y, si la diana está presente, polipéptido quimérico unido, estando el polipéptido quimérico unido, unido a la diana, proporcionando de ese modo una muestra tratada;

(4) retirar, en condiciones que permitan la unión específica, el polipéptido quimérico no unido de la muestra tratada de la etapa 3, proporcionando de ese modo una muestra sondeada;

(5) detectar el polipéptido quimérico en la muestra sondeada de la etapa (4), en el que la presencia de

polipéptido quimérico en la muestra sondeada es indicativa de que la diana está presente en la muestra; evaluando de ese modo la diana predeterminada en la muestra de la que se sospecha que contiene la diana predeterminada.

5 43. El método de acuerdo con el punto 42, en el que, en la etapa (5), el polipéptido quimérico se detecta de forma cuantitativa en la muestra sondeada de la etapa (4).

44. Un método para evaluar una diana predeterminada (diana) en una muestra de la que se sospecha que contiene la diana, comprendiendo el método las etapas de

10 (1) proporcionar un polipéptido que es un conector específico de la diana predeterminada, polipéptido restringido que se produce con un método de acuerdo con cualquiera de los puntos 36 a 41;

(2) poner en contacto la muestra con el polipéptido restringido de la etapa (1) en condiciones que permitan la unión específica del polipéptido restringido a la diana, formando de ese modo una mezcla de polipéptido restringido no unido y, si la diana estuviera presente, polipéptido restringido unido, estando el polipéptido restringido unido, unido a la diana, proporcionando de ese modo una muestra;

15 (3) retirar, en condiciones que permitan la unión específica, el polipéptido restringido no unido de la muestra tratada de la etapa 3, proporcionando de ese modo una muestra sondeada;

(3) detectar el polipéptido restringido en la muestra sondeada de la etapa (4), en el que la presencia de polipéptido restringido en la muestra sondeada es indicativa de que la diana está presente en la muestra; evaluando de ese modo la diana predeterminada en la muestra de la que se sospecha que contiene la diana predeterminada.

20 45. El método de acuerdo con el punto 44, en el que, en la etapa en la etapa (4), el polipéptido restringido se detecta de forma cuantitativa en la muestra sondeada de la etapa (3).

25 Los ejemplos, listado de secuencias y figuras que siguen a continuación se proporcionan para ayudar en la comprensión de la presente invención, cuyo alcance real se expone en las reivindicaciones adjuntas.

#### Descripción de las Figuras

- 30
- Figura 1 Composición de mezcla de Trinucleótidos de Biblioteca Lib y Lib1
- Figura 2 Trinucleótidos específicos que representan los codones en particular usados para codificar los aminoácidos
- Figura 3 Construcción de presentación de ribosomas
- 35 Figura 4 Gel de agarosa analítico que muestra el resultado del ciclo de presentación de ribosomas (+control). M: marcador de peso molecular de ADN de 100 pb. 1: fragmento de ADN adecuado para Presentación de Ribosoma de 719 pb. 2/3: controles, no se detectó amplificación de ADN, cuando se omitía la etapa RT. 4: ciclo de presentación de ribosomas completo con respecto al control positivo, el anticuerpo de unión de horquilla-péptido, que muestra una banda de ADN a 622 pb. 5: ciclo de presentación de ribosomas con respecto al control negativo, Pertuzumab, que muestra la unión de fondo del proceso.
- 40 Figura 5 Frecuencia del aminoácido obtenida a partir del enfoque de secuenciación de alto rendimiento de 228210 lecturas de longitud completa. La línea de color negro indica la distribución igual teórica del aminoácido.
- Figura 6 Geles de agarosa con color invertido, que muestran los resultados de tres rondas de selección de presentación de ribosomas con respecto a bi-DDS-TNF $\alpha$  en presencia de detergente. M: marcador de peso molecular de 100 pb. 1: Primer ciclo de presentación de ribosomas con fragmento de ADN distinto; 2/3: Muestras del segundo ciclo de presentación de ribosomas; 4: tercer ciclo de presentación de ribosomas. En cada ciclo, aparecía una banda de ADN distinta a 612 pb.
- 45
- Figura 7 SDS-PAGE con color invertido. Después de miniexpresión recombinante en 2 ml de medio, los sobrenadantes de lisado de *E. coli* de colonias de escogidas de forma arbitraria a partir de la placa de transformación se resolvieron en un SDS PAGE. M: Patrón de peso molecular. 1-4: Clones de la tercera ronda de presentación con respecto a TNF $\alpha$ . 5-11: derivados de SlyD-FKBP de *T. th.* con respecto a otra diana de proteína de 150 kDa. Las bandas de polipéptido del SlyD de derivados de *Thermus thermophilus*-FKBP forman distintas bandas a 15 kDa.
- 50
- 55 El SDS PAGE muestra tasas de expresión coherentemente elevadas de los diferentes polipéptidos de SlyD-FKBP de *Thermus thermophilus*. La concentración de la proteína expresada de forma soluble estaba en un promedio de 1,25 mg/ml a 1,7 mg/ml.
- Figura 8 Ensayo de unión a SPR, esquemático
- Figura 9 Sensograma de revestimiento que muestra el ensayo de unión a SPR como se ha descrito. 1: Señal de unión de TNF $\alpha$  1  $\mu$ M como analito en solución con el mutante TT10F7. 2: Señal de unión de TNF $\alpha$  300 nM como analito en solución con el mutante TT10F7. 3: analito de TNF $\alpha$  1  $\mu$ M en solución con respecto al mutante C10B9 de control de no unión. 4: Control negativo, estreptavidina 1  $\mu$ M como analito en solución con respecto al mutante TT10F7. La línea recta es la resta del control de tampón
- 60
- Figura 10 Ajuste de Langmuir a modo de ejemplo con RMáx local en las señales de unión a mutante TNF $\alpha$  / TT10F7 dependientes de la concentración.
- 65
- Figura 11 Cinética, calculada con respecto a un peso molecular de TNF $\alpha$  del TNF $\alpha$  homotrimérico (52 kDa) en

- presencia y ausencia del detergente TWEEN 20.
- Figura 12 SDS-PAGE de tres polipéptidos mutantes de SlyD-FKBP de *Thermus thermophilus* seleccionados de forma aleatoria generados con respecto a diferentes dianas. M: Marcador de peso molecular; 1,3,4: Mutantes de SlyD-FKBP de *T. t.* antes de incubación a 37 °C; 2,4,6: Mutantes de SlyD-FKBP de *T. t.* después de incubación a 37 °C. Indicado con una línea de color negro a 15 kDa: la cantidad total de cada mutante de SlyD-FKBP de *T. t.* persiste, aunque algunas bandas de proteína del lisado de *E. coli* desaparecían después de incubación a 37 °C.
- Figura 13 Geles de agarosa con color invertido. M: marcador de peso molecular de ADN de 100 pb. Lado izquierdo: segundo ciclo de presentación de ribosomas después de RT-PCR: 1,2: con respecto a TNF $\alpha$  con TWEEN 20; 3, 4: con respecto a TNF $\alpha$  sin TWEEN 20. Lado derecho: tercer ciclo de presentación de ribosomas después de RT-PCR: 1,2: con respecto a TNF $\alpha$  con TWEEN 20. 3, 4: con respecto a TNF $\alpha$  sin TWEEN 20.
- Figura 14 Resultados del Ejemplo 9
- Figura 15 M: marcador de peso molecular de ADN. Tercer ciclo de presentación que muestra distintas bandas de ADN a 612 pb a partir de 4 experimentos independientes, con una línea de color negro. 1,2: presentación con respecto a un anticuerpo monoclonal humano de IgG. 3;4: presentación con respecto a un anticuerpo monoclonal humano de IgG incluyendo una etapa de selección previa con el mismo anticuerpo. La caja oculta los datos experimentales no relacionados.
- Figura 16 SDS PAGE (tinción con Coomassie) y transferencia de Western anti-etiqueta de his (10 segundos de exposición) del polipéptido SlyD/FKBP12-ERCC1. M - Patrón de Novex Sharp; 1 - 2,5  $\mu$ g de polipéptido de fusión de SlyD/FKBP12-ERCC1; 2 - 5,0  $\mu$ g de polipéptido de fusión de SlyD/FKBP12-ERCC1; 3 - 10  $\mu$ g de polipéptido de fusión de SlyD/FKBP12-ERCC1; M\* - Magic Mark.
- Figura 17 Cromatograma de HPLC analítica del polipéptido de fusión de SlyD/FKBP12-ERCC1. Después de purificación con Ni-NTA, el SlyD/FKBP12-ERCC1 se eluye como un pico monomérico.
- Figura 18 El barrido de longitud de onda de 300 nm - 600 nm se realizó a una intensidad de emisión de fluorescencia que registra 600 nm/min de polipéptido de fusión de SlyD/FKBP12-ERCC1 a 25 °C, 35 °C, 45 °C, 55 °C, 85 °C.
- Figura 19 Esquema de ensayo de BIAcore para determinar la unión del polipéptido de fusión de SlyD/FKBP12-ERCC1 a FK-506.
- Figura 20 300 nM de polipéptido de fusión de SlyD/FKBP12-ERCC1 y 300 nM de FKBP12 de tipo silvestre como analitos en solución con respecto a ligando de bi-FK506 biotinilado presentado en la superficie del sensor.
- Figura 21 Cromatograma de HPLC analítica del polipéptido de fusión de SlyD/FKBP12-ctrl. Después de purificación con Ni-NTA, el SlyD/FKBP12-ctrl se eluye como un pico monomérico.
- Figura 22 Cromatograma de HPLC analítica de SlyD de polipéptido de fusión de *Thermus thermophilus*-IGF-1 (74-90).
- Figura 23 Cromatograma de HPLC analítica del polipéptido de fusión de SlyD/FKBP12-IGF-1 (74-90).
- Figura 24 Esquema de identificación sistemática de cinética de ensayo de unión de BIAcore con polipéptido de fusión de SlyD/FKBP12-ERCC1 y 300 nM de SlyD/FKBP12-ctrl como analitos en solución. Sensor de CM5, RAMFCy de captura: anticuerpo de captura Fc gamma anti ratón de conejo.
- Figura 25 Representación de Estabilidad Tardía / Unión Tardía que muestra propiedades cinéticas de anticuerpos anti-ERCC1 determinadas mediante identificación sistemática de cinética usando SlyD/FKBP12-ERCC1 como analito en solución. Todos los clones pueblan la línea de tendencia de  $10^{-5}$  1/s a valores de Unión Tardía > 40 RU lo que indica una extraordinaria estabilidad del complejo de antígeno. No se detecta unión con respecto a SlyD/FKBP12-ctrl.
- Figura 26 Propiedades de anticuerpos anti-ERCC1 determinadas con identificación sistemática de cinética. La Representación del Nivel de Captura de Unión Tardía/ Anticuerpo indica la unión de pasillos de valencia de unión mediante líneas de tendencia. Todos los clones hermanos de 500X.35 (rodeados) pueblan el pasillo de valencia entre una Proporción Molar = 0,5 y Proporción Molar = 1 y se seleccionaron para procesamiento adicional.
- Figura 27 Tabla con propiedades cinéticas de anticuerpos anti-ERCC1 determinadas mediante by identificación sistemática de cinética. BL: Unión Tardía, altura de la amplitud de la señal en unidades de respuesta relativa al final de la fase de asociación de SlyD/FKBP12-ERCC1. SL: Estabilidad tardía, altura de la amplitud de la señal en unidades de respuesta relativa al final de la fase de disociación de SlyD/FKBP12-ERCC1. kd: constante de la tasa de disociación (1/s) de acuerdo con un ajuste de Langmuir de la fase de disociación. t1/2 dis: semivida del complejo de anticuerpo-SlyD/FKBP12-ERCC1 en minutos, calculada de acuerdo con la fórmula  $t_{1/2} \text{ dis} = \ln(2)/(60 \cdot kd)$ .
- Figura 28 Cinética de concentración de un solo anticuerpo anti-ERCC1 a modo de ejemplo del clon <ERCC1>M-5.3.35 usando SlyD/FKBP12-ERCC1 como analito en solución.
- Figura 29 Transferencia de Western usando el clon <ERCC1>M-5.1.35. Se cargaron 5  $\mu$ g de lisados de células OVCAR-3 y HEK293 por calle en geles de NuPAGE SDS (Invitrogen). Una banda de ERCC1 específica se detecta a 37 kDa.
- Figura 30 Detección inmunohistoquímica de ERCC1 en FFPE tejido de cáncer humano embebido de muestra de cáncer de SCLC. Las flechas de color blanco indican células con nivel elevado de ERCC1 que aparecen en color más oscuro.
- Figura 31 Espectros de CD del UV cercano de polipéptido de tipo silvestre de SlyD de *Thermus thermophilus*,

- polipéptido de fusión de SlyD-ΔIF de *Thermus thermophilus* (FKBP) y polipéptido de fusión de SlyD de *Thermus thermophilus*-antígeno. A 20 °C, todos los polipéptidos se pliegan en su estructura nativa.
- Figura 32 Espectros de CD dependientes de la temperatura del polipéptido de fusión de SlyD-ΔIF de *Thermus thermophilus*. El calentamiento y el enfriamiento repetido muestra que el dominio de SlyD FKBP de *Thermus thermophilus* se pliega de forma reversible. El polipéptido de sus fusión de SlyD-ΔIF de *Thermus thermophilus* es estable hasta 65 °C y se despliega a 85 °C.
- Figura 33 Cinética de 12 sobrenadantes de cultivo clonal para la unión de IGF-1.
- Figura 34 Titulaciones de suero, determinadas por ELISA después de 12 semanas de inmunización de ratones Balb/C y RMNI. mE: mili Absorbancia, IGF-1: IGF-1 humano nativo (Peprotech).
- Figura 35 Identificación sistemática con ELISA de sobrenadantes de cultivo de clon con respecto a IGF-1, polipéptido de fusión de SlyD-IGF-1 (74-90) de *Thermus thermophilus* y polipéptido de tipo silvestre de SlyD de *Thermus thermophilus*. Las señales de absorción de unión elevadas eran detectables con respecto a IGF-1 y polipéptido de fusión de SlyD-IGF-1 (74-90) de *Thermus thermophilus*.
- Figura 36 Tabla con cinética de unión de anticuerpos anti IGF-1 desarrollados con polipéptido de fusión. mAb: anticuerpo monoclonal; RU: Unidad de respuesta relativa de anticuerpo monoclonal capturado en el sensor; Antígeno: antígeno en solución; kDa: peso molecular de los antígenos inyectados como analitos en solución; ka: constante de la tasa de asociación; kd: constante de la tasa de disociación; t1/2 dis: semivida del complejo de anticuerpo-antígeno calculada de acuerdo con la fórmula  $t_{1/2} \text{ dis} = \ln(2)/60 \cdot kd$ ; KD: constante de disociación; RMÁX: Señal de unión al final de la fase de asociación de la inyección de analito a 90 nM; MR: Proporción Molar; Chi<sup>2</sup>: fallo de la medición; n.d.: no detectable.
- Figura 37 Espectros de CD del UV cercano de polipéptido de tipo silvestre de SlyD de *Thermus thermophilus*, polipéptido de fusión de SlyD-ΔIF de *Thermus thermophilus* (FKBP) y polipéptido de fusión de SlyD de *Thermus thermophilus*-antígeno. A 20 °C, todos los polipéptidos se pliegan en su estructura nativa.
- Figura 38 Espectros de CD dependientes de la temperatura del polipéptido de fusión de SlyD-ΔIF de *Thermus thermophilus*. El calentamiento y el enfriamiento repetido muestra que el dominio de SlyD FKBP de *Thermus thermophilus* se pliega de forma reversible. El polipéptido de sus fusión de SlyD-ΔIF de *Thermus thermophilus* es estable hasta 65 °C y se despliega a 85 °C.
- Figura 39 Espectros de CD dependientes de la temperatura del polipéptido de fusión de SlyD-antígeno de *Thermococcus gammatolerans*. A 100 °C no se alcanza meseta de señal más baja, lo que indica que el polipéptido de fusión no se ha desplegado todavía completamente. Hasta 80 °C, el polipéptido de fusión es estable y está plagado.
- Figura 40 El polipéptido de fusión de SlyD-antígeno de *Thermococcus gammatolerans* monomérico que comprende fracción se volvió a someter a cromatografía después de ciclos repetidos de congelación y descongelación y un ensayo de tensión de temperatura. Perfil de SUX 200 a 280 nm de 300 μg de fracción de elución con Ni-NTA de polipéptido de fusión de SlyD-antígeno de *Thermococcus gammatolerans* en 100 μl de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, pH 7,0, KCl 100 mM, EDTA 0,5 mM a 0,75 ml/min. Figura 41 SDS PAGE (tinción de Coomassie) y transferencia de Western (10 segundos de incubación con anticuerpo anti-octa-etiqueta de his) del polipéptido de tipo silvestre de SlyD de *Thermus thermophilus*.
- Figura 42 Cuantificación de este enfoque de identificación sistemática de cinética para anticuerpos anti-IGF-1. Las células vacías indican que el respectivo valor no era detectable/ no se podía determinar.
- Figura 43 Cinética de 12 sobrenadantes de cultivo clonal para la unión de IGF-1.
- Figura 44 Identificación sistemática de cinética de BIAcore a modo de ejemplo de cultivo primario <IGF-1>M-11.0.15 con respecto a IGF-1, IGF-2, polipéptido de fusión de SlyD-IGF-1 (74-90) de *Thermus thermophilus* y polipéptido de tipo silvestre de SlyD de *Thermus thermophilus*.
- Figura 45 SDS PAGE (izquierda) y transferencia de Western (derecha) de SlyD-FKBP12-CD81 purificado por vía cromatográfica con Ni-NTA. M: Patrón de Novex Sharp, 1: SlyD/FKBP12-CD81; 2,5 μg, PM: 36 kD, 2: SlyD/FKBP12-CD81; 5,0 μg, 3: SlyD/FKBP12-CD81; 10 μg M\*: Magic Mark.

## 50 Ejemplo 1

Síntesis de una secuencia de ADN que codifica una secuencia variable con un subconjunto seleccionado de restos de aminoácidos de origen natural

- 55 Una biblioteca de fragmentos de ADN lineal monocatenario de 97 pb que comprendía una secuencia variable que codificaba una secuencia de aminoácidos de 13 aminoácidos se sintetizó haciendo uso de la química de fosforamidita establecida en el estado de la técnica. El fragmento de ADN era un fragmento con una secuencia de nucleótidos contigua de acuerdo con la fórmula III

60  $5'-U_D-O_D-Z_D-3'$  (fórmula III),

en la que U<sub>D</sub>, O<sub>D</sub>, y Z<sub>D</sub> estarán unidos mediante enlaces de fosfodiéster.

- 65 U<sub>D</sub> era 5'-CGA CAG TGT GGC GCA GGA TCC-3' que comprendía un sitio BamHI (SEQ ID NO: 18) y que servía como un sitio de unión para un cebador directo complementario.

Z<sub>D</sub> era 5'-GGG AGC TCG CAG GAG ACG TAG C-3' que comprendía un sitio SacI (SEQ ID NO: 19) y que servía como un sitio de unión para un cebador inverso complementario.

O<sub>D</sub> era una secuencia variable de acuerdo con la fórmula IV

5 5'-(Lib-Lib1)<sub>6</sub>-Lib-3' (fórmula IV).

10 Lib era una primera mezcla de trinucleótidos, en la que cada trinucleótido correspondía a un codón que codificaba un aminoácido de acuerdo con el código genético. La composición de los codones estaba limitada en los codones solamente para un subconjunto de los aminoácidos de origen natural que estaban presentes. El panel en la parte izquierda de la Figura 1 indica los aminoácidos para los que los codones estaban presentes en Lib. El porcentaje indicado para un aminoácido codificado en particular refleja la concentración relativa del respectivo trinucleótido en la mezcla. Todos los trinucleótidos en la mezcla representan un 100 %. En la mezcla no estaban presentes codones que codificaran a C y ningún codón que representara codones de parada.

15 Lib1 era una segunda mezcla de trinucleótidos, en la que cada trinucleótido correspondía a un codón que codificaba un aminoácido de acuerdo con el código genético. La composición de los codones estaba limitada en los codones solamente para un subconjunto de los aminoácidos de origen natural que estaban presentes. El panel en la parte derecha de la Figura 1 indica los aminoácidos para los que los codones estaban presentes en Lib1. El porcentaje indicado para un aminoácido codificado en particular refleja la concentración relativa del respectivo trinucleótido en la mezcla. Todos los trinucleótidos en la mezcla representan un 100 %. En la mezcla no estaban presentes codones que codificaran a ninguno de C, I, y W y ningún codón que representara codones de parada.

25 Para ganar de forma ventajosa el control con respecto a la composición del aminoácido codificado en la secuencia de nucleótidos variable a preparar, se aplicó química de fosforamidita. La biblioteca de oligonucleótidos se sintetizó en una síntesis a escala 1 μmolar en un sintetizador de ADN ABI 394 usando procedimiento de síntesis de ADN en fase sólida automatizado convencional y aplicando química de fosforamidita. Un dC-CPG (Sigma Aldrich, Proligo, parte n.º C401010-C04), patrón dA(Bz), dC(Bz), dG(iBu) y fosforamiditas de dT (Sigma Aldrich, Proligo, parte n.º A111031, C111031, G111031, T111031) en una concentración 0,1 M así como las dos bibliotecas de fosforamidita de trímero diferente, Lib y Lib1, se usaron como componentes básicos. Los componentes básicos de fosforamidita de trímero se adquirieron en Glen Research, mezclados en distintas proporciones considerando diferentes pesos moleculares (PM) y factores de reacción (RF) tal como lo recomienda Glen Research y diluidos con acetonitrilo con calidad para ADN en una concentración de 0,1 M de acuerdo con el siguiente cálculo tal como se representa en la Figura 2. La Figura 2 también indica los trinucleótidos específicos que representan los codones en particular usados para codificar los aminoácidos.

40 El ciclo de ADN convencional se usó para acoplamiento de dA, dG, dC y dT, el ciclo de síntesis de ARN convencional se usó para acoplamiento de Lib y Lib1, y el programa de escisión convencional se usó para escisión de la biblioteca de oligonucleótidos protegidos con 5'-DMT a partir del soporte con amoniaco conc. Los grupos protectores se escindieron por tratamiento con amoniaco conc. (17 h a t.a. y 4 h a 56 °C). La biblioteca de oligonucleótido protegido con DMT en bruto se evaporó y se purificó por RP HPLC (columna: PRP1 (Hamilton parte n.º 79352)) usando gradiente de acetato de trietamonio 0,1 M a pH 7 / acetonitrilo. Las fracciones del producto se combinaron y se desalaron por diálisis (MWCO 1000, SpectraPor 6, parte n.º 132638) con respecto a agua durante 3 días también escindiendo de ese modo el grupo DMT. Por último la biblioteca de oligonucleótido se liofilizó. El rendimiento fue: 127,6 DO<sub>260</sub> (146 nmoles).

45 Como resultado, se obtuvo una biblioteca de fragmentos de ADN lineal monocatenario de 97 pb de fórmula III.

50 De acuerdo con los segmentos de CDR-H3 de 4751 humano y 2170 murino en las bases de datos de Kabat e IMGT, la longitud media de un segmento de la secuencia de aminoácidos de CDR-H3 está entre 12 y 14 aminoácidos (Zemlin, M. *et al.*, J Mol Biol 334 (2003). 733-749). Dado que 13 aminoácidos son el valor medio entre las longitudes habituales de CDR-H3 humano y murino, la longitud del fragmento de la biblioteca para la secuencia de aminoácidos variable codificada en el presente ejemplo se estableció en 13 aminoácidos.

55 Los trinucleótidos que codifican cisteína y los codones de parada se omitieron. Se calculó que la diversidad teórica de 13 posiciones clasificadas al azar con la diversidad de 19 aminoácidos por posición era de aproximadamente  $4 \times 10^{16}$ . Esta diversidad supera la diversidad con la que se puede trabajar de forma razonable usando un enfoque de presentación de fagos. Pero se calcula que un enfoque de presentación de ribosomas es capaz de presentar al menos  $10 \times 10^{12}$  miembros en la biblioteca.

## 60 Ejemplo 2

Presentación de ribosoma con el experimento de control positivo, de dominio de SlyD FKBP de *Thermus thermophilus*

65

En primer lugar, se mostró la idoneidad básica del armazón de SlyD FKBP de *Thermus thermophilus* con el fin de selecciones de presentación de ribosomas. Se diseñó y se sintetizó un fragmento de ADN de presentación de ribosomas de 719 pb. La secuencia de SlyD FKBP de *Thermus thermophilus* de 360 pb está bajo el control de un promotor T7 y secuencias reguladoras de RBS (sitio de unión a ribosoma) del gen 10. Una secuencia de 84 pb sustituye el dominio de Inserción de Flap mediante un motivo de secuencia que codifica una horquilla del péptido, que es un motivo de diana de anticuerpo. Cadena abajo de la secuencia de SlyD FKBP de *Thermus thermophilus* de 189 pb, se fusiona un espacial o representación de ribosomas sin codón de parada. El espaciador se diseña básicamente de acuerdo con Mattheakis, L.C. *et al.*, PNAS 91 (1994) 9022-9026, pero además contiene la secuencia de bloqueo de la traducción SecM (Nakatogawa, H. y K. Ito Cell 108 (2002) 629-636; Gumbart, J. *et al.*, Biophys J 103 (2012) 331-341). En el extremo en la posición 3' de la construcción, se diseña una secuencia que codifica horquilla de ARNm para estabilizar y proteger el ARNm de la digestión con nucleasa.

La secuencia de la construcción de ADN era

5'-

GGTGATGTCGGCGATATAGGCGCCAGCAACCGCACCTGTGGCGCCGGT  
 GATGCCGGCCACGATGCGTCCGGCGTAGAGGATCGTGATCTCGATCCC  
 GCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCACAACGGTTTCCCTCTA  
 GAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGAAAGTGGG  
 CCAGGATAAAGTTGTCACCATTGCTATACCCTGCAGGTTGAAGGTGAA  
 GTGCTGGATCAGGGCGAACTCAGCTATTTACATGGTCACCGCAACCTGA  
 TTCCGGGCCTGGAGGAAGCGCTGGAAGGTCGCGAGGAAGGCGAAGCAT  
 TTCAGGCGCATGTGCCGGCAGAGAAAGCGTATGGCGCCGGATCCCCGC  
 AGCCTCTGGTGTATAACAAATTAACCTTTCAGCTGGAACCGAACCCTCA  
 TACCAAAGGGAGCTCCGGCAAAGATTTAGATTTTCAGGTGGAAGTGGT  
 TAAAGTGCGCGAAGCAACCCCGGAGGAACTGTTACATGGCCACGCGGG  
 CGCTGGCTCTGGAGCTGGTGCAGGCTCTGGTGCTGGCGCAGGTTCTCCA  
 GCAGCGGTGCCGGCAGCAGTTCCTGCTGCGGTGGGCGAAGGCGAGGGA  
  
 GAGTTCAGTACGCCAGTTTGGATCTCGCAGGCACAGGGCATCCGTGCTG  
 GTCCTCAGAGGCTTTCCAACCCCCAGCCTATGCGGGGGTT-3'

(SEQ ID NO:20)

15 En el nivel de la secuencia de aminoácidos, la construcción de presentación de ribosomas codifica una secuencia de aminoácidos sin codón de parada:

NH2-

MKVGQDKVVTIRYTLQVEGEVLDQGELSYLHGHRNLIPGLEEALEGREEG  
 EAFQAHVPAEKAYGAGSPQPLVYNKLTFFQLEPNPHTKGSSGKDLDFQVEV  
 VKVREATPEELLHGHAAGAGSGAGAGSGAGAGSPAAPVPAAPVAVGEGEG  
 EFSTPVWISQAQGIRAGPQRLSNPQPMRG-COOH

(SEQ ID NO:21)

20

La construcción de presentación de ribosomas incluía un segmento codificado de aminoácidos que generan flexibilidad (GAGS), e incluía motivos de ruptura de hélice alfa (PAAV) y también proporcionaba cargas negativas (GEGEGE) para proporcionar de forma óptima el dominio FKBP para presentación (Mattheakis, *et al.*, mencionado anteriormente).

El dominio de IF se sustituyó por el dominio II de horquilla de heterodimerización de ECD, Her-3. Por lo general con esta secuencia de polipéptidos se pliega en una estructura denominada horquilla beta. La secuencia de aminoácidos de la horquilla beta, injertada en el dominio de SlyD FKBP de *Thermus thermophilus* era: NH<sub>2</sub>-PQPLVYNKLTFLQLEPNPHTK-COOH (SEQ ID NO: 22).

I En n este experimento de presentación de ribosomas, se usó un anticuerpo de horquilla anti-beta monoclonal murino como una diana de selección para el epítipo del péptido de horquilla beta ECD de SlyD de Her-3 de FKBP de *Thermus thermophilus* presentado de forma ribosómica.

No se pudo amplificar ninguna señal de unión a ADN de fondo, lo que indica que la quimera de horquilla del péptido de SlyD de *Thermus thermophilus* presentada de forma ribosómica, unida a través de un conector polipeptídico (Mattheakis, *et al.*, mencionado anteriormente) al complejo de ribosoma-ARNm estaba correctamente plegada y presentada de forma cótraduccional. Cuando se procesa adicionalmente en un segundo ciclo de selección, no se desarrolló ninguna señal de unión de fondo. Cuando se usa trastuzumab y pertuzumab como dianas de selección de control, no se amplificaban ninguna señal de unión de fondo. En resumen, no se pudo detectar unión no específica. Esto hace que esta proteína de armazón sea ideal para su uso en tecnologías de presentación molecular, respectivamente en una selección de presentación de ribosomas.

Cebadores que se usan en el proceso de presentación de ribosomas:

Cebador R1: 5'-AACCCCCGCATAGGCTGGGG-3' (SEQ ID NO: 23)  
 Cebador F1: 5'-GGTGATGTCGGCGATATAGGCGC -3' (SEQ ID NO: 24)  
 Cebador F1A: 5'- CGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCACAACGGTTTCCC -3' (SEQ ID NO: 25)  
 Cebador Frt:

5'-  
 GGGAGACCACAACGGTTTCCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAG  
 AAGGAGATATACATATG-3'

(SEQ ID NO: 26)  
 Cebador R1A: 5'-AACCCCCGCATAGGCTGGGGGTTGGAAAGCCTCTGAGGACCAGCAGC-3' (SEQ ID NO: 27)  
 Cebador Rrt: 5'- GGAAAGCCTCTGAGGACCAGCAGCGATGCCCTGTGC -3' (SEQ ID NO: 28)

### Ejemplo 3

Amplificación a modo de ejemplo de la construcción de presentación de ribosomas, experimento de control positivo

La construcción de presentación de ribosomas del Ejemplo (mencionado anteriormente) se amplificó por PCR, sigue a continuación. 100 µl de reacción de PCR contenían dNTPs 0,2 mM (solución de reserva 10 mM, dNTPmix, Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania), 2,5 unidades de PWO Polimerasa (100 unidades de solución de reserva, Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania), Cebador F1 0,25 µM y Cebador R1 0,25 µM; tampón de PWO PCR 1x (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania) y 25 ng de molde de ADN de fragmento. El perfil de PCR era el que sigue a continuación: 5 min a 95 °C, (2 min a 94 °C, 45 segundos a 57 °C, 45 segundos a 72 °C) x 25, 5 min a 72 °C, ∞ a 4 °C. La longitud apropiada de una alícuota de 3 µl del producto de reacción de PCR se confirmó por electroforesis en gel de agarosa analítica. A continuación, el producto de PCR se resolvió en un 3 % de gel de agarosa teñido con GelRed (Biotium) y la banda de ADN diana se extrajo del gel usando el Kit II de Extracción de Gel de Qiagen de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

El sistema combinado de transcripción y traducción sin células Puresystem Classic II se usó para la producción de complejos ternarios. Se mezclaron 500 ng de producto de PCR purificado en 20 µl de tampón con 60 µl de Solución A, 24 µl de Solución B y 16 µl de H<sub>2</sub>O hasta un volumen total de 120 µl. La mezcla de traducción se incubó a 37 °C a 550 rpm durante 30 min. La traducción se detuvo por adición de 500 µl de tampón de parada enfriado con hielo (Tris 50 mM; pH 7,5 (6 °C) ajustado con AcOH, NaCl 150 mM, acetato de magnesio 50 mM, KCl 33 mM, GSSG 4 mM, solución de bloqueo de BSA al 10 % (Pierce), 5 µg/ml de ARNt, TWEEN 20 al 0,05 %). La mezcla de traducción parada se centrifugó a 1 °C durante 15 min a 10000 g. El sobrenadante se transfirió en un vial el recién preparado. Se transfirieron 25 µl de una suspensión de perlas magnéticas revestida con proteína A en 500 µl de tampón de lavado (Tris 50 mM; pH 7,5 (6 °C) ajustado con ácido acético, NaCl 150 mM, acetato de magnesio 50 mM, KCl 33 mM, solución de bloqueo de BSA al 10 % (Pierce), 5 µg/ml de ARNt, TWEEN 20 al 0,05 %). Las perlas se



## ES 2 603 589 T3

continuación: 5 min a 95 °C, (2 min a 95 °C, 45 segundos a 49 °C, 45 segundos a 72 °C) x 25, 5 min 72 °C, ∞ a 4 °C.

5 Los productos de PCR se resolvieron en un 3 % de gel de agarosa teñido con GelRed (Biotium). Las bandas de ADN diana se extrajeron a 97 pb a partir del gel usando el Kit II de Extracción de Gel de Qiagen de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

10 Ambos, el fragmento de la biblioteca general ha mencionado anteriormente y el vector que contenía la construcción de presentación de ribosomas, se dirigieron doblemente como sigue a continuación: Una reacción contenía 400 ng del fragmento de ADN de la biblioteca, 1 ml de cada una de las enzimas de restricción BamHI-HF y SacI-HF (ambos de NEB), 0,5 µl de BSA y 5 µl de tampón NEB4 10 x. La reacción de digestión del vector contenía 1,28 µg de vector (T7Pg10e\_tH3caspMA-T), 1,25 µl de cada una de las enzimas de restricción de BamHI-HF y SacI-HF, 0,5 µl de BSA y 5 µl de tampón NEB4 10 x. Ambas reacciones se realizaron siete veces en paralelo y se incubaron durante una noche a 37 °C a 400 rpm. Los productos de digestión se resolvieron en un 3 % de gel de agarosa teñido con GelRed (Biotium) para el fragmento de la biblioteca y un 1 % de gel de agarosa teñido con GelRed (Biotium) para el vector de corte. La banda de ADN del fragmento de la biblioteca se extrajo a 51 pb a partir del gel usando el Kit II de Extracción de Gel de Qiagen de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La banda de ADN del vector de corte se extrajo a partir del gel de agarosa usando el Kit II de Extracción de Gel de Qiagen de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

20 Para producir la the construcción de presentación de ribosomas, el fragmento de la biblioteca digerido se insertó en el vector de corte en una reacción de ligación como sigue a continuación: La ligación se realizó en un volumen total de 40 µl con 93 ng de fragmento de biblioteca cortado y purificado, 11 ng de vector cortado y purificado, 20 µl de tampón Quick Ligase 2 x (Stratagene) y 2 unidades de of Quick Ligase (Stratagene). La reacción se realizó diez veces a temperatura ambiente durante una hora. Las ligaciones se combinaron y se purificaron con el kit extracción de Qiagen proporcionando 200 ng de producto de ligación.

25 El molde de ADN de la biblioteca ensamblado lineal, que proporciona el punto de partida para la transcripción y traducción acopladas, se generó por PCR con el siguiente sistema:

30 En total, seis reacciones de PCR de 50 µl produjeron 1,62 µg de la construcción de presentación de ribosomas lineal. Cada reacción contenía: 20 ng de producto de ligación como molde, 5 µl de tampón de reacción 10 x (Roche), dNTPs 0,4 mM (Roche) y 0,5 mM de cada cebador F1 (5'-GGTGATGTCGGCGATATAGGCGC-3' ; SEQ ID NO: 32) y R1 (5'-CCCCAGCCTATGCG-GGGGTT-3'; SEQ ID NO: 33). El perfil de PCR era el que sigue a continuación: 5 min a 94 °C, (2 min a 94 °C, 45 segundos a 57 °C, 45 segundos a 72 °C) x 25, 5 min 72 °C, ∞ a 4 °C. Los productos de PCR se resolvieron en un 1,5 % de gel de agarosa teñido con GelRed (Biotium). La banda de ADN diana se extrajo a 698 pb a partir del gel usando el Kit de Extracción de Gel de Qiagen de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

40 Para cada diana de la ronda de selección se usaron 520 ng de molde de ADN de la biblioteca lineal para transcripción/traducción acoplada con el Sistema PURE (Ueda T. *et al.*, Methods Mol. Biol. 607 (2010) 219-225). Esto es igual a una diversidad teórica de  $1,4 \times 10^{12}$  moléculas.

45 La construcción de FKBP-SlyD de *Thermus thermophilus* de presentación de ribosomas tiene la secuencia que sigue a continuación:

5'-

GGTGATGTCGGCGATATAGGCGCCAGCAACCGCACCTGTGGCGCCGGT  
 GATGCCGGCCACGATGCGTCCGGCGTAGAGGATCGTGATCTCGATCCC  
 GCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCACAACGGTTTCCCTCTA  
 GAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGAAAGTGGG  
 CCAGGATAAAGTTGTCACCATTGCTATACCCTGCAGGTTGAAGGTGAA

GTGCTGGATCAGGGCGAACTCAGCTATTTACATGGTCACCGCAACCTGA  
 TTCCGGGCCTGGAGGAAGCGCTGGAAGGTCGCGAGGAAGGCGAAGCAT  
 TTCAGGCGCATGTGCCGGCAGAGAAAGCGTATGGCGCCGGATCCNNNN  
 NNGGGAGCTCCGG  
 CAAAGATTTAGATTTTTCAGGTGGAAGTGGTTAAAGTGCGCGAAGCAAC  
 CCCGGAGGAACTGTTACATGGCCACGCGGGCGCTGGCTCTGGAGCTGG  
 TGCAGGCTCTGGTGCTGGCGCAGGTTCTCCAGCAGCGGTGCCGGCAGC  
 AGTTCCTGCTGCGGTGGGCGAAGGCGAGGGAGAGTTCAGTACGCCAGT  
 TTGGATCTCGCAGGCACAGGGCATCCGTGCTGGTCCTCAGAGGCTTTCC  
 AACCCCCAGCCTATGCGGGGGTT-3' (SEQ ID NO:34)

Cada N indica una de las 39 nucleobases de la biblioteca definidas.

5 Ejemplo 5

Confirmación de la diversidad de la biblioteca mediante un enfoque de secuenciación de alto rendimiento  
 La diversidad de la biblioteca de la construcción de la biblioteca adecuada para presentación de ribosomas final se  
 investigó usando un Instrumento 454 GS FLY+. Un enfoque de secuenciación profunda se realizó de acuerdo con el  
 manual rápido de preparación de biblioteca (Oct. de 2009, rev. Enero de 2010) para la Serie GS FLX Titanium  
 usando el Kit de GS FLX + Series-XL+ (Mayo de 2011).

Se evaluaron 228210 lecturas de secuencias. Cada una mostraba una longitud de lectura lo suficientemente larga,  
 de modo que se pudo evaluar el motivo de inserción en biblioteca. De 228210 lecturas satisfactorias, se encontraron  
 196725 como secuencias únicas, 24983 secuencias se produjeron dos veces, 5213 secuencias se produjeron tres  
 veces, 1365 secuencias se produjeron cuatro veces, 346 secuencias se produjeron cinco veces, 116 secuencias se  
 produjeron seis veces, 35 secuencias se produjeron siete veces, 17 secuencias se produjeron ocho veces, 3  
 secuencias se produjeron nueve veces, 1 secuencia se produjo 10 veces, 3 secuencias se produjeron 11 veces, 2  
 secuencias se produjeron 12 veces, 1 secuencia se produjo 16 veces. Dado que el fragmento de la biblioteca se  
 amplificó por PCR antes de su ligación en la construcción del vector, se supone que las copias por duplicado y  
 múltiples de la secuencia también se podrían obtener a partir del proceso de amplificación de PCR De las 228210  
 lecturas, se encontraron 196725 únicas, que es un 86 % de la biblioteca de trabajo. Para cada nueva ronda de  
 selección de diana, se usaron 520 ng de molde de ADN de biblioteca lineal, que es igual a una diversidad teórica de  
 $1,4 \times 10^{12}$  moléculas. La diversidad de la biblioteca práctica se puede calcular como  $1,4 \times 10^{12} \times 0,86 = 1,2 \times 10^{12}$   
 moléculas. La conclusión de tener  $1,0 \times 10^{12}$  miembros de biblioteca funcionales es un cálculo legal.

Los resultados a mí se representan en la Figura 5.

La composición del aminoácido de 228210 lecturas de longitud completa refleja el diseño del fragmento de la  
 biblioteca. En el nivel de traducción del aminoácido, las 228210 lecturas tienen una longitud de 13 aa y todas están  
 correctamente flanqueadas por los motivos Nt-GAGS-Ct y Nt-GSSG-Ct. No se encontraron codones de parada. Tal  
 como se deseaba, los aminoácidos Y, F y L estaban sobrerrepresentados. Metionina (1,09 %) cisteína (0,03 %), y  
 lisina (1,99 %) están subrepresentadas, como se deseaba. Debido al uso de química de fosforamidita de  
 trinucleótidos, los desplazamientos del marco estaban en un intervalo insignificante.

35

Ejemplo 6Selección de Presentación de Ribosoma en TNF $\alpha$  como una diana

5 De acuerdo con la presentación de ribosomas descrita en el presente documento (por ejemplo, análoga al Ejemplo 3) t se realizaron tres rondas de selección con aumento de rigurosidad de lavado en TNF $\alpha$  como una diana. Esto se realizó en presencia o ausencia de TWEEN 20. En el presente documento se describe la selección en presencia de TWEEN. El TNF $\alpha$  recombinante humano, sin etiquetar de células HEK293 (Roche) se biotiniló químicamente usando química de EDC/NHS tal como lo realiza una persona experta en la materia. La estequiometría de la biotinilación era de 1:6, TNF $\alpha$  : reactivo de biotinilación de bi-DDS. La concentración final de TNF $\alpha$  era de 0,44 mg/ml en NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, NaCl 150 mM, 6 % de sacarosa, pH 6,0. La unión del TNF $\alpha$  biotinilado se confirmó con un experimento de SPR de Biacore, en el que se confirmó la unión de bi-DDS-TNF $\alpha$  al sensor de Biacore SA revestido con estreptavidina. Para la primera ronda de selección, se transfirieron 520 ng de molde de ADN de biblioteca lineal de 719 pb en el sistema acoplado de transcripción y traducción sin células.

15 La reacción se detuvo con tampón de parada enfriado con hielo y se centrifugó como se ha descrito. La selección previa de los complejos ternarios con perlas magnéticas era similar para las tres rondas de presentación, con t la excepción de tipos de perlas. El primer y segundo ciclos se seleccionaron previamente con 25  $\mu$ l de solución de perlas revestidas con estreptavidina, la tercera ronda de presentación se incubó previamente con 25  $\mu$ l de solución de perlas revestidas con proteína G (Dynabeads, Invitrogen).

20 Se transfirieron 20  $\mu$ l de partículas para magnéticas de estreptavidina en un tubo Eppendorf de 2 ml bloqueado previamente y se lavaron cinco veces con 500  $\mu$ l de tampón de lavado de perla (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,1 M a pH 8,0, TWEEN 20 al 0,1 %) seguido de tres lavados con tampón de lavado como se ha descrito. Después de la etapa de lavado final, las perlas se volvieron a suspender en 25  $\mu$ l de tampón de lavado.

30 La mezcla de traducción parada se añadió con cuidado a la suspensión de perlas preparada y se incubó a 4 °C con rotación de extremo a extremo durante 30 min. Las perlas se recogieron y se retiraron por centrifugación a 13000 rpm a 1 °C durante 10 min y el sobrenadante seleccionado previamente se transfirió en un tubo Eppendorf de 2 ml bloqueado nuevo.

35 A 300  $\mu$ l de la mezcla de traducción seleccionada previamente, se añadió bi-DDS-TNF $\alpha$  biotinilado en 20  $\mu$ l de tampón para alcanzar una concentración final de TNF $\alpha$  de 120 nM. La concentración de bi-DDS-TNF $\alpha$  era de 0,44 mg/ml (8,6  $\mu$ M) y por lo tanto se diluyeron 4,5  $\mu$ l en 15,5  $\mu$ l de tampón de lavado que a continuación se añadieron en los 300  $\mu$ l de mezcla de traducción parada. Incubación a 4 °C con rotación de extremo a extremo durante 30 min. Los complejos ternarios unidos a bi-DDS-TNF $\alpha$  se capturaron mediante la adición de 10  $\mu$ l de partículas de estreptavidina paramagnéticas lavadas con una incubación de 20 min a 4 °C con rotación de extremo a extremo.

40 Esto se realizó de maneras idénticas para la primera y la segunda ronda de presentación. En la tercera ronda, la concentración de la diana se redujo a 60 nM de bi-DDS-TNF $\alpha$ .

45 El lavado y la elución se realizó como se ha descrito en el protocolo de presentación (lavados rápidos con 500  $\mu$ l de tampón de lavado 5x), excepto en la tercera ronda de presentación III, en la que la presión de la selección se aumentó a través de un lavado más riguroso. En el presente documento, después de la primera etapa de lavado rápido normal, la segunda etapa de lavado incluía un tiempo de incubación de 5 min (de extremo a extremo) y la tercera etapa de lavado un tiempo de incubación de 10 min, seguido de dos etapas de lavado rápido como es habitual (todas con 500  $\mu$ l de tampón de lavado).

50 Para todos los ciclos de presentación de bi-DDS-TNF $\alpha$ , la elución del ARNm con 100  $\mu$ l de tampón de elución y las etapas de RT-PCR posteriores, se realizaron de la misma manera que se ha descrito anteriormente.

Los resultados también se representan en la Figura 6.

55 Para introducir el ADN de combinación de selección en el vector de expresión de pQE80\_ttSlyD, el vector y las combinaciones de ADN RD se sometieron a una doble digestión con BamHI-HF y SacI-HF. Cada diana se digirió de forma simultánea en dos reacciones y el vector en tres. Cada digestión de diana de 50  $\mu$ l contenía 1  $\mu$ g de combinación de ADN, 1,25  $\mu$ l de BamHI-HF, 1,25  $\mu$ l de SacI-HF, 5  $\mu$ l de tampón NEB 4 10x, 0,25  $\mu$ l de BSA y 5,75  $\mu$ l de dH<sub>2</sub>O.

60 Cada digestión de vector de 50  $\mu$ l contenía 1,2  $\mu$ g de ADN plásmido, 1,25  $\mu$ l de BamHI-HF, 1,25  $\mu$ l de SacI-HF, 5  $\mu$ l de tampón NEB 4 10x, 0,75  $\mu$ l de BSA y 35,75  $\mu$ l de dH<sub>2</sub>O.

65 Las reacciones de digestión se incubaron a 37 grados C durante 3 h. El vector digerido se purificó y se extrajo de un gel de agarosa como se ha descrito anteriormente. El ADN de la combinación de selección digerido se purificó a través de un 3 % de gel de agarosa y la banda correspondiente se extrajo con el kit II de extracción de Qiagen, debido al pequeño tamaño del fragmento.

La ligación se realizó usando el Kit de Ligación Rápida y contenía, en un volumen de reacción total de 15 µl, 25 ng de vector de ADN digerido, 1,25 ng de ADN de combinación de selección digerido, 7,5 µl de Tampón de Ligasa Rápida 2x y dH<sub>2</sub>O. La incubación durante 1 h a temperatura ambiente fue seguida de transformación de 10 µl en células DH5a de *E. coli* químicamente competentes y sembradas en placas de agar de LB/Amp.

El casete de ADN de la biblioteca de 230 pb del tercer ciclo de presentación de ribosomas y el ADN del vector de expresión de pQE80\_ttSlyD se digirieron con BamH1 y SacI. Cada digestión de casete de ADN de biblioteca de 50 µl contenía 1 µg de casete de ADN de biblioteca, 1,25 µl de BamHI-HF, 1,25 µl de SacI-HF, 5 µl de tampón NEB 4 10x, 0,75 µl de BSA y 5,75 µl de dH<sub>2</sub>O. Cada 50 µl de digestión de vector contenían 1,2 µg de ADN de plásmido, 1,25 µl de BamHI-HF, 1,25 µl de SacI-HF, 5 µl de tampón NEB 4 10x, 0,75 µl de BSA y 35,75 µl de dH<sub>2</sub>O.

La ligación se realizó usando el Kit de Ligación Rápida en 15 µl de volumen de reacción total en 25 ng de vector de ADN digerido, 1,25 ng de casete de ADN de biblioteca digerido, 7,5 µl de Tampón de Ligasa Rápida 2x y dH<sub>2</sub>O. La incubación durante 1 h a temperatura ambiente fue seguida de transformación de 10 µl de la mezcla de ligación en células DH5a de *E. coli* químicamente competentes, sembradas en agar de LB con ampicilina como marcador de selección y con incubación durante una noche a 37 °C.

El vector de expresión contenía la secuencia de ácidos nucleicos para la secuencia de SlyD-FKBP de *Thermus thermophilus*, idéntica a la construcción previa de presentación de ribosomas, pero flanqueada de forma c-terminal con una Avitag (His)8 y secuencias de codón de parada. De este modo, a través de la subclonación del fragmento de casete de biblioteca, la secuencia de SlyD-FKBP de *T. th.* circundante, se restableció, de modo que las posibles mutaciones en el nivel del aminoácido obtenido a partir del proceso de identificación sistemática se volvieron a ajustar con la secuencia de tipo silvestre.

La secuencia de SlyD-FKBP de *Thermus thermophilus* en el vector de expresión de pQE80\_ttSlyD:

NH<sub>2</sub>-

**MRSKVGQDKVVTIRYTLQVEGEVLDQGELSYLHGHRNLIPGLEEALEGRE  
EGEAFQAHVPAEKAYGAGSXXXXXXXXXXXXXXXXXGSSGKDLDFQVEVVKV**

**REATPEELLHGHGGAAAGLNDIFEAQKIEWHEGSRKHHHHHHHHH-COOH  
(SEQ ID NO:35)**

X indica la secuencia variable.

Se inóculo un bloque en pocillo profundo de 96 pocillos con 1200 µl por pocillo de medio LB/Amp, con colonias individuales de *E. coli* seleccionadas con una punta de pipeta estéril a partir de la placa de transformación. Se sellaron con un papel de aluminio transpirable y se incubaron a 37 °C en un agitador de placas a 250 rpm durante una noche.

Se usaron 200 µl de cada pocillo para inocular 1800 µl de LB/Amp en un bloque de 96 pocillos profundos incubados a 37 °C y 250 rpm durante 2 h antes de inducción de la expresión de proteína con IPTG 0,5 mM. Después de una incubación adicional durante para 3 h a 37 °C y 250 rpm, los bloques se centrifugaron durante 15 min a 3000 x g y el sobrenadante se descartó.

A cada pocillo del bloque de 96 pocillos profundos, se añadieron 50 µl del agente de lisis BPER II (Pierce) y se incubó durante 5 min a temperatura ambiente. Las células se volvieron a suspender y se lisaron mediante mezcla vigorosa. Por último, se añadieron 950 µl de tampón KPi a pH 7,4 / pocillo, se mezcló y el residuo celular se sedimentó por centrifugación durante 15 min a 3000 x g. El sobrenadante se investigó para la presencia de polipéptido SlyD-FKBP de *Thermus thermophilus* expresado de forma soluble por SDS-PAGE.

Una muestra de 65 µl del sobrenadante se mezcló con 10 µl de agente reductor 10x (Invitrogen) y 25 µl de tampón de muestra NuPAGE LDS (4x) hasta un volumen de muestra total de 100 µl.

Las muestras se incubaron a 95 °C durante 5 min y a continuación se centrifugaron durante un periodo adicional de 10 min a 10000 g. Se cargaron 10 µl del sobrenadante por muestra sobre un 4-12 % de gel BisTres NUPAGE (Invitrogen) y se sometió a electroforesis a 150 V constante durante 1 h. A continuación, el gel se tiñó y se destiñó de acuerdo con el protocolo de fabricante. El patrón de proteína era el Color Dual de Patrón de Proteína Bio-Rad Precision Plus (5 µl).

Los ejemplos también se representan en la Figura 7.

Después de secuenciación y traducción de ADN en el respectivo código del aminoácido, los clones de la tercera ronda de presentación con respecto a TNF $\alpha$  produjeron de forma sorprendente una secuencia de aminoácidos idéntica al igual que en el mutante TT10F7:

NH<sub>2</sub>-  
 MRSKVGQDKVVTIRYTLQVEGEVLDQGELSYLHGHRNLIPGLEEALEGRE  
 EGFAFQAHVPAEKAYGAGSWKPHFNLHLLYLIGSSGKDLDFQVEVVKVRE  
 ATPEELLHGHAHGGAAAGLNDIFEAQKIEWHEGSRKHHHHHHHHH-COOH  
 (SEQ ID NO:36)

5 El casete de la biblioteca en estos 4 clones tiene la secuencia NH<sub>2</sub>-GAGS-WKPHFNLHLLYLI-GSSG-COOH. (SEQ ID NO: 37)

10 En otro enfoque de secuenciación, se determinaron 31 secuencias de la tercera ronda de presentación con respecto a TNF $\alpha$ . 28 secuencias (90 %) eran idénticas y presentaban un motivo consenso de casete de biblioteca idéntico al motivo mencionado anteriormente: NH<sub>2</sub>-GAGS-WKPHFNLHLLYLI-GSSG-COOH (SEQ ID NO: 38). Las 3 secuencias restantes presentaban un motivo consenso de casete de biblioteca: NH<sub>2</sub>-GAGS-TYYKIHVLWLIYV-GSSG-COOH (SEQ ID NO: 39). Evidentemente, el proceso de selección fue conducido hasta una formación de consenso completa en la tercera ronda de presentación.

#### Ejemplo 7

20 Estudio de unión de Biacore del TT10F7 de SlyD-FKBP12 de *T.t.*

Un instrumento B3000 de Biacore (GE Healthcare) se usó para evaluar de forma cinética el clon TT10F7 de SlyD-FKBP de *Thermus thermophilus* con el motivo de la secuencia de biblioteca consenso NH<sub>2</sub>-GAGS-WKPHFNLHLLYLI-GSSG-COOH (SEQ ID NO: 40) para especificidad de unión hacia hrTNF $\alpha$ . Un sensor de la serie CM5 se montó en el sistema y se normalizó en tampón HBS-ET (HEPES 10 mM a pH 7,4, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM, Tween 20 al 0,005 % en p/v) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las muestras se diluyeron en el tampón del instrumento. En otra realización, el tampón era el tampón HBS-E (HEPES 10 mM a pH 7,4, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM) y las muestras se diluyeron en el tampón sin detergente. El sistema funcionaba a 25 °C. Se inmovilizaron 10000 RU de GAR-Fc $\gamma$  (unidades relativas de unión de fragmento de Fc $\gamma$ , IgG anti-conejo de cabra policlonal / Jackson Laboratories) de acuerdo con las instrucciones del fabricante usando química de EDC/NHS en las 4 celdas de flujo. Por último, el sensor se desactiva usando etanolamina 1 M.

35 La actividad de unión del clon TT10F7 de TT10F7 SlyD-FKBP de *Thermus thermophilus* con respecto al TNF $\alpha$  diana se sometió ensayo de forma cinética. Un anticuerpo de unión a proteína de núcleo anti-SlyD de *Thermus thermophilus* de conejo monoclonal (0612pS3A8), se capturó en todas las celdas de flujo mediante una inyección de 6 min a 5  $\mu$ l/min. El TT10F7 de SlyD-FKBP de *Thermus thermophilus* de una mini expresión de bloque de pocillo profundo de *E. coli* de 2 ml se capturó directamente a partir del lisado de *E. coli* en las celdas de flujo 2, 3 y 4. La celda de flujo 1 servía como una referencia. Otro clon de SlyD-FKBP de *Thermus thermophilus*, C10B9 (NH<sub>2</sub>-GAGS-YYVLITDNLVYFG-GSSG-COOH; (SEQ ID NO: 41)), que anteriormente se desarrolló con una especificidad de unión para una diana diferente a TNF $\alpha$  sirvió como un control de la unión. Los clones de SlyD-FKBP de *Thermus thermophilus* se capturaron de forma específica en el sensor mediante una inyección de 2 min a 30  $\mu$ l/min directamente a partir del sobrenadante de lisado de *E. coli* a centrifugado a 10000 g diluido a 1:25.

45 El caudal se estableció en 100  $\mu$ l/min. El TNF $\alpha$  trimérico totalmente intacto (P/11102/661/177, Scil Proteins) se inyectó en las diferentes etapas de concentración diluido en los tampones de muestra que se han descrito anteriormente a 0 nM, 333 nM y 1 mM durante 2 min. Se inyectó estreptavidina (11897000, Roche) como un control de no a 1  $\mu$ M. La disociación se controló durante 5 minutos.

50 La regeneración ácida de la superficie del sensor se consiguió usando una sola inyección de glicina 10 mM a pH 1,5 a 20  $\mu$ l/min durante 30 segundos, seguido de dos inyecciones consecutivas de glicina 10 mM a pH 1,7 a 20  $\mu$ l/min durante 30 segundos. La regeneración era completa.

Los resultados también se representan en la Figura 9, Figura 10 y en la Figura 11.

55 El ensayo de unión de Biacore presenta una unión dependiente de la concentración de TNF $\alpha$  como analito en solución con respecto al mutante TT10F7 presentado en anticuerpo de superficie en presencia y ausencia de TWEEN 20. Dado que TNF $\alpha$  se presentaba como proteína diana químicamente biotinilada en partículas paramagnéticas revestidas con estreptavidina, era necesario investigar la unión potencial de reacción cruzada de estreptavidina. No se pudo detectar unión a TT10F7 con estreptavidina 1  $\mu$ M como analito en solución. Además, se

confirmó que TNF $\alpha$  no se unía a otro mutante C10B9 de SlyD-FKBP de *Thermus thermophilus* no relacionado con la diana. No se pudo detectar unión con respecto al mutante C10B9 a una concentración de analito de TNF $\alpha$  1  $\mu$ M. por lo tanto, la unión de la primera generación de TT10F7 de SlyD-FKBP de *Thermus thermophilus* a TNF $\alpha$  es específica. Las señales de unión a TNF $\alpha$  dependientes de la concentración se ajustaron de acuerdo con un modelo de Langmuir para calcular la afinidad cinética.

La presentación para la selección del mutante TT10F7 se realizó en un sistema de tampón que contenía el detergente TWEEN 20. Se sabe bien que TWEEN 20 puede inducir cambios estructurales o la disociación rápida de TNF $\alpha$  (Steiner, D., *et al.*, J Mol Biol 382 (2008) 1211-1227; Hoffmann, A., *et al.*, PLoS One 7 (2012) e31298) en sus monómeros. El ensayo de Biacore se realizó en presencia y ausencia de TWEEN 20 para investigar si el aglutinante tenía una preferencia con respecto a una forma trimérica o monomérica de TNF $\alpha$ . La forma trimérica recién preparada se unió con una avidez de 258 nM en una estequiometría de 3:1. En presencia del detergente TWEEN 20 la avidez era la misma. Por lo tanto, se supone que el mutante TT10F7 está reconociendo al TNF $\alpha$  trimérico e intacto.

Para un polipéptido de unión monomérico a TNF $\alpha$ , basándose en una región de dominio de unión de solamente 13 aminoácidos de longitud, es razonable una afinidad en el intervalo micromolar.

En el presente documento, también se pueden concebir bucles así como arquitecturas de biblioteca más grandes, que combinan más bucles, por ejemplo, mediante motivos de estructura secundaria, que pueden imponer la formación de dos o más bucles.

#### Ejemplo 8

Estabilidad de almacenamiento de mutantes en lisado de *E. coli*

Una pregunta es si los polipéptidos mutantes SlyD-FKBP de *Thermus thermophilus* son lo suficientemente estables y fuertes para su uso como aglutinantes artificiales. En otro experimento, los mutantes de las terceras rondas de diferentes enfoques de presentación se expresaron en *E. coli*. Las células se lisaron como se ha descrito y los sobrenadantes de los extractos celulares en bruto se almacenaron durante cuatro semanas a 4 °C y posteriormente se incubaron a 37 °C durante 42 horas. No se suplementa con inhibidores de proteasa.

Los resultados también se representan en la Figura 12.

#### Ejemplo 9

Presentación de ribosoma con respecto a TNF $\alpha$  sin Tween

Otro experimento de presentación de ribosomas se realizó para tres ciclos con respecto a TNF $\alpha$  de la misma manera que ya se ha descrito, pero con la única excepción de que TWEEN 20 se emitía en todos los sistemas de tampón relevantes de presentación de ribosomas.

Los resultados también se representan en la Figura 13 y en la Figura 14.

Para identificar aglutinantes con respecto a TNF $\alpha$  potencialmente intacto, la presentación también se realizó omitiendo el TWEEN 20. Los geles de agarosa muestran que era posible omitir el TWEEN 20 y se obtenían bandas de ADN distintas a 612 pb. A partir de la tercera ronda de presentación, después de la subclonación, se seleccionaron 16 clones de forma arbitraria a partir de la placa de transformación. El ADN de plásmido se propagó y se secuenció, a como lo realiza una persona experta en la materia. El resultado se diferencia del de la selección en presencia de TWEEN 20. La diversidad de la secuencia era más elevada que en el experimento que usa TWEEN 20.

Para identificar aglutinantes con respecto a un TNF $\alpha$  potencialmente intacto, la presentación también se realizó omitiendo el TWEEN 20. Los geles de agarosa muestran, que omitir el TWEEN 20 era posible y se obtuvieron bandas de ADN distintas a 612 pb. A partir de la tercera ronda de presentación, después de la subclonación, se seleccionaron 16 clones de forma arbitraria a partir de la placa de transformación. El ADN de plásmido se propagó y se secuenció, a como lo realiza una persona experta en la materia. El resultado se diferencia del de la selección en presencia de TWEEN 20. La diversidad de la secuencia era más elevada que en el experimento que usa TWEEN 20.

La presión de selección en presencia de detergente era más rigurosa y un consenso ya se desarrolló en el tercer ciclo. La presión de selección en ausencia de detergente no era tan rigurosa pero presentaba 2 secuencias de replicación en la combinación secuenciada.

Como se representa en la Figura 14, EFAJG y EVI0J, así como ELU74 y D4TTN son idénticos. Las secuencias restantes eran únicas. Se puede suponer, t que podrían ser necesarios más ciclos de presentación para desarrollar una formación de consenso al igual que en el experimento que usa el detergente TWEEN 20.

El mutante TT10F7, no se produjo en la combinación secuenciada que omite el detergente. Esto refleja las diferentes condiciones de selección en la presentación sin detergente.

#### Ejemplo 10

- 5 Experimento de control de la especificidad de presentación de ribosomas
- Una característica importante de un proceso de presentación de ribosomas que trabaja de forma funcional es mostrar que la selección de la diana se puede complementar con un excedente de su diana y en solución. Esto demuestra la presencia de aglutinantes de diana específicos en la mezcla. Normalmente, esto se puede mostrar en un ciclo de presentación más avanzado, por ejemplo en la tercera ronda de presentación. Cuando se hace de este modo, el rendimiento del ADN después de la etapa de RT-PCS debería ser considerablemente menor, cuando se compara con el ciclo de selección de no competencia.
- 10
- 15 En el siguiente ejemplo se realizó una selección de presentación de ribosomas para tres rondas con respecto a un anticuerpo monoclonal humano. La presentación se realizó tal como se describe. Se incubó IgG humana 120 nM en solución en la mezcla de traducción parada durante 30 min a 4°. Para capturar la IgG se usaron partículas paramagnéticas revestidas con proteína A, y de este modo los complejos ternarios unidos se adhieren a la misma, la superficie de la perla.
- 20 De ese modo, se realizaron dos ciclos. En el tercer ciclo de presentación, se realizó otra organización experimental. Se realizó una etapa de selección previa con IgG humana 1 µM. Las perlas se centraron de nuevo y el sobrenadante se volvió a usar en un segundo experimento de selección como se ha descrito anteriormente usando la misma IgG humana presentada a 120 nM. El gel de agarosa mencionado anteriormente muestra claramente una reducción de la intensidad de la banda de ADN cuando se ha aplicado la etapa de selección previa y de este modo se indica la especificidad de IgG de los aglutinantes ya enriquecidos en la tercera ronda de presentación.
- 25
- Sumario de los experimentos de presentación
- 30 Por primera vez se pudo mostrar que SlyD-FKBP de *Thermus thermophilus* es un fuerte armazón de presentación para la presentación de una biblioteca de presentación de bucle peptídico grande y diversa.
- El motivo del bucle se inserta en un sitio, en el que el extremo N-terminal y el extremo C-terminal de la conexión rígida interdominio de FKBP-IF están alejados en aproximadamente 4,5 angstrom entre sí, que está en el intervalo de la distancia atómica de un enlace disulfuro. Por lo tanto, el dominio FKBP sujeta el péptido del bucle en una conformación pseudo restringida. El dominio FKBP es en cierto modo un sustituto para una limitación de enlace disulfuro. Dado que el armazón está libre de cisteínas, se resuelven la presentación y las dificultades en la presentación de péptidos restringidos cíclicos.
- 35
- 40 El sistema se sometió a ensayo de forma satisfactoria en un experimento en el que un motivo de horquilla de Her-3 se injertó en el dominio SlyD-FKBP de *Thermus thermophilus*. La construcción se presentó de forma ribosómica con respecto a un anticuerpo monoclonal de unión a horquilla de Her-3, con lo que de ese modo se demostraba la especificidad de unión y la idoneidad general para el proceso de presentación de ribosomas.
- 45 Se diseñó una biblioteca de presentación de acuerdo con los conocimientos con respecto a la composición de los aminoácidos en puntos de conflicto de interacción de proteína-péptido. Además, se tuvieron en cuenta las longitudes habituales de las secuencias de CDR-H3 humano y su composición de aminoácidos. La biblioteca se adaptó a los requisitos específicos de tecnologías de presentación, por ejemplo, los restos de Cys se omitieron completamente.
- 50 Todas estas consideraciones llevaron al diseño de una biblioteca de bucles de 13-mer. El casete de biblioteca de ADN de 13-mer se produjo usando química de trinucleótidos. Usando un enfoque de secuenciación profunda se calculó que los miembros finales de la biblioteca de SlyD-FKBP de *Thermus thermophilus* estaban en el intervalo de  $1,0 \times 10^{12}$  miembros funcionales.
- 55 La biblioteca se usó en procedimientos de selección de presentación de ribosomas con respecto a diferentes dianas, mientras que el mutante TT10F7, procedente de un tercer ciclo de presentación de ribosomas con respecto a un TNF $\alpha$  recombinante humano, mostraba una unión dependiente de la concentración y específica de diana.
- 60 Todos los mutantes aislados se expresaron en una cantidad elevada soluble en *E. coli*. Todos eran termodinámicamente estables.
- 65 El sistema de presentación produce mutantes de SlyD-FKBP de *Thermus thermophilus* con especificidades de unión determinadas previamente con respecto a diferentes dianas en el intervalo de las afinidades esperadas para un enfoque de biblioteca de este tipo.

Ejemplo 11

Producción de anticuerpos anti-ERCC1 asistida por armazón de antígeno de SlyD/FKB12

## 5 Inmunización

Los ratones SJL de 8-12 semanas de edad ratones se sometieron a inmunización intraperitoneal con 100 µg de un péptido obtenido a partir de ERCC1 acoplado a KHL que cubre los aminoácidos 219-245 de ERCC1 humano (Excision Repair Cross Complementing). Los derivados de ERCC1 se produjeron por vía sintética a partir de síntesis de péptidos.

Los ratones se inmunizaron 3 veces (inicial y 6 semanas y 10 semanas después del refuerzo inicial). La primera inmunización se realizó usando adyuvante de Freud completo, la segunda y tercera inmunizaciones se realizaron usando el adyuvante de Freud incompleto. El refuerzo final se realizó i.v. usando 100 µg de antígeno de péptido acoplado a KLH tres días antes de que se produjera la fusión del hibridoma. La producción de cultivos primarios de hibridomas se realizó de acuerdo con Kohler y Milstein (Kohler, G. y Milstein, C., Nature 256 (1975) 495-497). Los hibridomas se aislaron en MTP de 96 pocillos limitando la dilución y se hizo identificación sistemática para unión a antígeno por medio de ELISA. El ELISA se realizó con un desarrollo de Tecan Sunrise bajo Firmware: V 3.15 19/03/01; XREAD PLUS Versión: V 4.20. Los cultivos celulares de hibridoma primario, que presentaban una formación de color positiva después de su unión a un péptido obtenido a partir de ERCC1 biotinilado que cubría los aminoácidos 219-245 en ELISA, se transfirieron en el proceso de identificación sistemática de cinética como se describe en el presente documento.

Para evitar la selección de IHC no adecuados, solamente anticuerpos lineales de unión a péptidos, se realizaron más esfuerzos de identificación sistemática usando un enfoque basado en armazón. El enfoque de armazón deseleccionó adicionalmente anticuerpos, que unían el péptido inmunogénico en sus extremos.

Producción de SlyD/FKBP12-ERCC1

Un gen sintético que codifica SlyD/FKBP12-ERCC1 y SlyD/FKBP12-ctrl se adquirió en Sloning Biotechnology GmbH (Alemania) y se clonó en un vector de expresión pQE80L. Los polipéptidos se produjeron como construcciones de genes optimizados con codones de *E. coli* en *E. coli*, BL21 CodonPlus-RP (véase la Figura 16 y 17).

Para la purificación de los polipéptidos quiméricos en bruto se usó una etapa de cromatografía por afinidad en condiciones desnaturalizantes en presencia de agentes caotrópicos. Para el polipéptido quimérico que comprende la parte SlyD, se usa especialmente la purificación en presencia de agentes caotrópicos, ya que se pudo aislar la cantidad total de polipéptido quimérico de las células de *E. coli*. Además, el polipéptido quimérico completo se obtuvo en una conformación de bobina aleatoria. El polipéptido quimérico aún ligado al material de cromatografía por afinidad se transfirió en condiciones nativas lavando la columna con una solución salina fisiológica. Debido al plegamiento espontáneo de las partes SlyD y FKBP12 del polipéptido quimérico, la secuencia de aminoácidos insertada también se puede transferir a su conformación nativa. El polipéptido quimérico replegado se recuperó con un gradiente de imidazol en un tampón fisiológico a partir de la columna de cromatografía por afinidad. En la Figura 16 se muestra un gel de SDS y una transferencia de Western del polipéptido quimérico SlyD/FKBP12-ERCC1. La transferencia de Western de <His6> muestra la integridad C-terminal del polipéptido quimérico. No se detectan detectar otras bandas de polipéptidos.

Mediciones de fluorescencia

El polipéptido quimérico purificado por afinidad se dializó con respecto a tampón de HEPES 75 mM (pH 7,5, NaCl 150 mM, sacarosa al 6,5 % (p/v), cisteína 10 mM) y se filtró. El SlyD/FKBP12-ERCC1 se cuantificó por vía espectroscópica de UV/Vis a 7,4 mg/ml usando el coeficiente de extinción calculado para el polipéptido de 35380.301 Da (Figura 18). En la identificación sistemática de longitud de onda de 220 nm a 340 nm se obtuvo un pico de absorción a 280 nm que se obtiene a partir del Trp de FKBP12. No se pudo detectar absorción a 340 nm.

Las mediciones de fluorescencia de proteínas se usaron para someter a ensayar la naturaleza conformacional de SlyD/FKBP12-ERCC1. FKBP12 C22A como un vehículo para inserciones de polipéptido es especialmente útil porque b el resto de Trp de FKBP12 individual se puede usar para diagnosticar la integridad estructural del resto de FKBP12 (Scholz, C., *et al.*, J. Biol. Chem. 271 (1996) 12703-12707; Russo, A.T., *et al.*, J. Mol. Biol. 330 (2003) 851-866). FKBP12 C22A en su estructura nativa muestra un solo pico de emisión de fluorescencia a 320 nm (Zoldak, G., *et al.*, J. Mol. Biol. 386 (2009) 1138-1152).

Se analizaron 250 µl de 2,5 mg/ml de SlyD/FKBP12-ERCC1 en tampón de HBS-E (pH 7,4) a diferentes temperaturas. Un instrumento Cary Eclipse en la Versión: 1.1(132) del Software Scan se usó a 5 nm de ancho de banda de excitación y emisión. Un barrido de longitud de onda de 300 nm - 600 nm se realizó a 600 nm/min. La excitación de la fluorescencia intrínseca del triptófano se estableció en 294 nm. Se obtuvo un pico ancho a 350 nm (Figura 18). De acuerdo con la teoría, la emisión de fluorescencia solvatocrómica intrínseca del Trp a 350 nm se

podría inactivar fuertemente en un entorno de proteína FKBP12, mientras que aumenta con el desplegamiento de FKBP12. Una pantalla de temperatura de 25 °C a 85 °C no mostraba ningún pico de emisión de fluorescencia adicional, pero no se pudo detectar una inactivación de la fluorescencia dependiente de la temperatura de la emisión a 350 nm. The 320 nm, como indicador para la integridad estructural de FKBP12.

5 Por lo tanto, el resto de Trp individual en el polipéptido quimérico SlyD/FKBP12-ERCC1 se expone al disolvente ya a 25 °C, lo que indica que el FKBP12 quimérico en el contexto de SlyD-FKBP12 está parcial o totalmente sin plegar.

10 Por lo tanto, el armazón es una plataforma ideal para imitar y presentar una pluralidad estructural de conformaciones de péptidos no estables ya que por lo general se producen en tejido fijado en formalina, embebido en parafina durante los experimentos inmunohistoquímicos (Abe, M., *et al.*, Anal. Biochem. 318 (2003) 118-123).

#### Ensayo de unión de BIAcore a FK506

15 Un instrumento BIAcore 3000 bajo el control de la versión V4.1 del software se montó con un sensor SAcip de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Como tampón de desarrollo, se usó un tampón de HBS-EP (HEPES 10 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, P20 al 0,05 % (p/v) (solución acuosa al 10 % del tensioactivo no iónico Polisorbato 20 (Tween 20)). 1213 RU de conjugado de bi-conector-FK506 (Roche Diagnostics Mannheim, Alemania) se capturaron en la celda de flujo 4.

20 El polipéptido quimérico SlyD/FKBP12-ERCC1 purificado 300 nM y el polipéptido de control SlyD/FKBP12 300 nM se inyectaron en el sistema a 30 µl/min durante 3 min. de tiempo de asociación y 3 min. de tiempo de disociación.

25 El sensor se regeneró por inyección de una solución de glicina-HCl 10 mM (pH 1,7) durante 2 min. a un caudal de 30 µl/min.

30 El ensayo de unión de BIAcore con polipéptido quimérico SlyD/FKBP12-ERCC1 300 nM como analito en solución con respecto al ligando bi-FK506 presentado en la superficie del sensor (Figura 19) no presentaba actividad de unión (Figura 20), lo que indica una pérdida funcional de estructura del resto de FKBP12 en el polipéptido quimérico. El polipéptido de control FKBP12 (C22A) presentaba actividad de unión.

35 La incapacidad del polipéptido quimérico SlyD/FKBP12-ERCC1 para unirse a FK-506 proporciona otra evidencia para una estructura de SlyD/FKBP12-ERCC1, que se desvía de la de la conformación de FKBP12 (C22A). Esto va acompañado por una pérdida de actividad de unión del dominio de FKBP12 quimérico.

#### Análisis de cromatografía de HPLC analítica

40 Los análisis de cromatografía de HPLC analítica se realizaron con polipéptidos quiméricos para analizar el estado oligomérico del polipéptido quimérico.

45 Tal como lo recomienda el fabricante, se usó un dispositivo de HPLC Chromeleon Dionex a 25 °C con una columna TSK3000SWXL equilibrar en tampón de HBS-E (pH 7,4). El flujo del tampón era de 0,7 ml/min. Se inyectaron 100 µl de una solución que comprendía SlyD/FKBP12-ERCC1 (7,4 mg/ml) en el sistema (véase la Figura 17). En otro flujo de trabajo, se inyectó una solución que contenía el control de SlyD/FKBP12 (9,5 mg/ml) en el sistema (véase la Figura 21). En otro flujo de trabajo, se inyectó una solución que contenía SlyD-IGF-1 (74-90) de *Thermus thermophilus* (3 mg/ml) en el sistema (véase la Figura 22). En otro flujo de trabajo, se inyectó una solución que contenía SlyD/FKBP12-IGF-1(74-90) (5,4 mg/ml) en el sistema (véase la Figura 23). El detector de UV/VIS se ajustó a 280 nm. Los datos se evaluaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante usando la versión 6.80 SP2 Build 2284 del software Dionex. El sistema se calibró con el patrón de levadura oriental, Cat 46804000.

50 La Figura 17 muestra el perfil de elución en columna de SlyD/FKBP12-ERCC1 purificado por afinidad de Ni-NTA. Un 91,5 % del área de integración del perfil de elución completa se puede encontrar localizado en el pico N.º 5 (1310.319 mAU) que eluye a un tiempo de retención de 12,37 min. El perfil indica un polipéptido quimérico a SlyD/FKBP12-ERCC1 monomérico. El polipéptido quimérico monomérico ya se obtuvo justo después de una etapa de purificación inicial con Ni-NTA.

#### Uso de identificación sistemática de cinética

60 El polipéptido quimérico SlyD/FKBP12-ERCC1 se usó en análisis de unión de SPR. Para determinar la cinética de unión al anticuerpo de acuerdo con un modelo de Langmuir es útil usar analitos monoméricos y monovalentes en solución. Además, para las mediciones de SPR es útil usar un analítico con un aumento del peso molecular, es decir elevado, para aumentar la sensibilidad de la masa de las mediciones. Al mismo tiempo, se debe dar accesibilidad al epítipo.

65 Un esquema del ensayo de identificación sistemática de BIAcore se representa en la Figura 24.

La identificación sistemática de cinética se realizó en un instrumento BIAcore A100 bajo el control de la versión V1.1. Un chip BIAcore CM5 se cargó a la máquina y, de acuerdo con las instrucciones del fabricante, se dirigió de forma hidrodinámica. A partir de ese momento, el chip se acondicionó. Como tampón de desarrollo, se usa un tampón de HBS-EP (HEPES 10 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, P20 al 0,05 % (p/v)). Una composición policlonal de anticuerpos de captura de Fc anti-IgG de una concentración de 30 µg/ml en tampón de acetato sódico 10 mM (pH 4,5) se concentra previamente a las aplicaciones puntuales 1, 2, 4 y 5 en las celdas de flujo 1, 2, 3 y 4. El anticuerpo se inmovilizó de forma covalente a 10.000 RU a través de química de NHS/EDC. El sensor se desactivó a partir de ese momento con una solución de etanolamina 1 M. Las aplicaciones puntuales 1 y 2 se usaron para la determinación y las aplicaciones puntuales 2 y 4 se usaron como referencia. Antes de su aplicación al chip sensor, los sobrenadantes de hibridoma se diluyeron a 1:5 en tampón de HBS-EP. La solución diluida se aplicó a un caudal de 30 µl/min durante 1 min. Inmediatamente después de ese momento, el antígeno formulado, tal como el polipéptido quimérico de FKBP12 se inyectó a un caudal de 30 µl/min durante 2 min. A partir de ese momento, la señal se registra durante otros 5 min. El sensor se regeneró inyectando una solución de glicina-HCl 10 mM (pH 1,7) durante 2 min. a un caudal de 30 µl/min. La señal registrada poco antes del final de la inyección del antígeno se indica como unión tardía (BL). La señal registrada poco antes del final del registro de la disociación se indica como estabilidad tardía (SL). Ambos puntos de datos se representan entre sí. Los anticuerpos seleccionados tienen un valor de Unión Tardía que es igual al valor de Estabilidad Tardía. Estos anticuerpos pueblan el área cerca de la línea de tendencia que indica BL = SL en la representación.

La Figura 25 muestra los datos para anticuerpos anti-ERCC1 seleccionados. Se puede observar que la interacción de SlyD/FKBP12-ERCC1 es altamente específica. No se puede detectar interacción con la muestra de control de SlyD/FKBP12. En general, no se puede observar unión inespecífica.

La Figura 26 muestra el análisis de valencia de los anticuerpos. Se muestra la cantidad de antígeno en unidades de respuesta (Unión Tardía, RU) que saturan el anticuerpo presentado en la superficie (Nivel de Captura, RU). Las líneas de tendencia y las flechas en la Figura 26 indican las valencias (Proporción Molar) de los anticuerpos presentados en la superficie. Todos los clones hermanos (ID del clon 5.00x.35) pueblan el pasillo de valencia MR 0,5 - MR 1,0, mientras que los otros clones pueblan el pasillo por debajo de MR 0,5 indicando menos funcionalidad. No se pudo detectar unión funcional con respecto al control de SlyD/FKBP12.

La Figura 27 muestra la cuantificación de este enfoque de identificación sistemática de cinética. Los seis clones hermanos (5.001.35 a 5.006.35) muestran valores adecuados de Unión Tardía y Estabilidad Tardía. La tasa de disociación  $k_d$  (1/s) muestran estabildades del complejo de antígeno elevadas que satisfacen los requisitos para un anticuerpo adecuado de IHC. Las semividas de estabilidad del complejo de antígeno  $t_{1/2dis}$  calculadas son de 204 min para los seis clones hermanos.

La Figura 28 muestra a modo de ejemplo la firma de identificación sistemática de cinética del clon 5.003.35 con respecto a los analitos SlyD/FKBP12-ERCC1 y control de SlyD/FKBP12. Dado que SlyD/FKBP12-ERCC1 es un analito soluble y monomérico estable, soluble, éste se ajusta perfectamente al modelo de disociación de Langmuir a 1:1 (línea de color negro en los datos de disociación sin procesar en color rojo). No se pudo detectar unión inespecífica. No se detectó interacción con respecto al control de SlyD/FKBP12.

#### Transferencia de Western

La Figura 29 muestra un experimento de transferencia de Western que usa el clon 5.001.35. La transferencia de Western se puede usar como un indicador para la idoneidad de IHC posterior del anticuerpo.

Para transferencia de Western, se cargaron 5 µg de lisado celular de OVCAR-3 y 5 µg de lisado celular de HEK-293 en las calles del gel en geles de NuPAGE SDS al 4-12 % (Invitrogen). Ambas líneas celulares no se trataron previamente por ejemplo mediante radiación o Cisplatino.

La transferencia de Western se realizó de acuerdo con protocolos convencionales con tampones y reactivos de NuPAGE (Invitrogen). El anticuerpo 5.001.35 se usó a una concentración de 50 ng/ml. La incubación del anticuerpo primario se realizó durante 30 min. a temperatura ambiente (TA). La membrana se desarrolló usando el Lumilmager junto con el reactivo LumiLight de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Roche Applied Science, Mannheim, Alemania). En nivel de ERCC1 basal endógeno se detectó de forma específica como una sola banda de 37 kDa en la transferencia de Western.

#### Experimentos de IHC

La Figura 30 muestra la detección de IHC de ERCC1 en tejido de cáncer humano de FFPE. Para detección inmunohistoquímica se prepararon secciones de 2 µm de muestras de cáncer de SCLC. Todos los procedimientos de tinción se realizaron en el aparato de tinción de IHC automatizado Benchmark XT de Ventana usando tampones y reactivos de Ventana de acuerdo con las instrucciones de funcionamiento convencionales del fabricante. El anticuerpo primario (clon <ERCC1>M-5.1.35) se usó a una concentración de 5 µg/ml. El anticuerpo primario se incubó en las secciones durante 32 min a 37 °C. El anticuerpo primario se detectó usando el kit de detección iView™

de Ventana tal como lo recomienda el fabricante. Las flechas de color blanco indican células con nivel elevado de ERCC1, que aparece en color más oscuro.

## Sumario

5 En contraste con el péptido ERCC1 de bajo peso molecular (2 kDa), el armazón tal como se usa en el presente documento es un analito de peso molecular elevado (36 kDa), que amplifica las señales en un enfoque de identificación sistemática de cinética basada en SPR.

10 Un reactivo de identificación sistemática basado en péptido asume el riesgo de seleccionar anticuerpos que reconocen los extremos del péptido, lo que se evita completamente usando el enfoque de armazón tal como se informa en el presente documento, en el que el péptido está embebido en un contexto polipeptídico N-terminal y C-terminal terminal. A pesar de ofrecer una pluralidad de inserciones de péptidos metaestables, el polipéptido quimérico del armazón como un todo es estable, soluble y monomérico. La cinética de Langmuir a 1:1 se puede  
15 medir fácilmente por medio de biosensores.

El uso del polipéptido quimérico en esta realización es muy adecuado para simular la situación de FFPE IHC y por lo tanto es un reactivo de identificación sistemática muy adecuado para el desarrollo de anticuerpos IHC adecuados.

20 Sin quedar ligado por la teoría, el polipéptido quimérico comprende una parte obtenida a partir de SlyD plegada y una parte obtenida a partir de FKBP12 humano desplegado o parcialmente desplegado, que ofrece al menos su resto de Trp de núcleo único para contacto disolvente, como se muestra para SlyD/FKBP12-ERCC1. SlyD se pliega de forma reversible y muestra estabilidad térmica suficiente para aplicaciones técnicas.

25 El armazón de SlyD/FKBP-12 es una plataforma adecuada para imitar una pluralidad de motivos de estructura secundaria peptídica, como los presentes en un tejido fijado con formalina, embebido en parafina en experimentos de inmunohistoquímica (véase Abe, *et al.*, (2003) mencionado anteriormente).

30 El polipéptido quimérico es especialmente adecuado como inmunógeno en comparación con el polipéptido de longitud completa a partir del que se obtiene la secuencia de aminoácidos (inmunogénica) insertada, por ejemplo con respecto a solubilidad, plegamiento reversible (naturalización/desnaturalización) y la ausencia de enlaces disulfuro para su formación correctamente. El polipéptido quimérico tal como se informa en el presente documento proporciona el armazón en el que se inserta la secuencia de aminoácidos inmunogénica. Estabiliza la estructura de la secuencia de aminoácidos inmunogénica insertada (sin quedar limitado por la teoría al reducir la entropía conformacional). Sin quedar limitado por la teoría, se supone que el polipéptido quimérico SlyD N-terminal mantiene el polipéptido quimérico completo en una forma soluble y termodinámicamente estable, pero parcialmente  
35 desplegada.

40 Rebuzzini, G. (trabajo de PhD en la Universidad de Milano-Bicocca (Italia) (2009)) informa sobre un estudio del dominio de helicasa NS3 del virus de la hepatitis C para su aplicación en un inmunoensayo de quimioluminiscencia. En este trabajo Rebuzzini informa que FKBP12 el quimérico usado como un inmunógeno para la presentación del dominio de helicasa NS3 con las secuencias de inserción de acuerdo con Knappe, T.A., *et al.*, (J. Mol. Biol. 368 (2007) 1458-1468) es termodinámicamente inestable. Esto se correlaciona con los hallazgos de los inventores, con respecto a que el resto de FKBP12 quimérico en el polipéptido quimérico de SlyD-FKBP12-antígeno está parcial o  
45 completamente sin plegar. Al contrario que con los hallazgos de Rebuzzini, en el presente documento se ha encontrado que el polipéptido quimérico de SlyD-FKBP12-antígeno es monomérico y estable.

## Ejemplo 12

50 Producción de anticuerpos específicos de IGF-1 (74-90)

Los anticuerpos específicos de antígeno se obtuvieron por inmunización de ratones con polipéptido quimérico de SlyD- antígeno de *Thermus Thermophilus*. Una pluralidad de epítomos se pueden dirigir en la superficie del armazón, a partir del que se pueden identificar los anticuerpos que se unen al antígeno de diana q mediante identificación sistemática diferencial con respecto al SlyD de *Thermus Thermophilus* de tipo silvestre como un control negativo, o  
55 con respecto al antígeno recombinante nativo (IGF-1) como un control positivo. En lo sucesivo, un ejemplo demuestra las propiedades de los derivados de SlyD arcaicos en comparación con el FKBP12 humano potencialmente meta estable. El SlyD de *Thermus Thermophilus* permite la presentación de estructuras entálpicas, rígidas y estables y por lo tanto es adecuado para el desarrollo de anticuerpos monoclonales a con respecto a  
60 estructuras de proteína nativa.

Producción de polipéptidos quiméricos de SlyD de *Thermus thermophilus*

65 El clorhidrato de guanidinio (GdmCl) (calidad A) se adquirió en NIGU (Waldkraiburg, Alemania). Los comprimidos de inhibidores de proteasa sin EDTA Complete®, imidazol y EDTA eran de Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Alemania), todos los otros reactivos químicos eran de calidad analítica de Merck (Darmstadt, Alemania). Las

membranas de ultrafiltración (YM10, YM30) se adquirieron en Amicon (Danvers, MA, USA), las membranas de microdiálisis (VS/0,025 µm) y las unidades de ultrafiltración (dispositivos de filtro Biomax ultrafree) eran de Millipore (Bedford, MA, USA). Las membranas de nitrato de celulosa y de acetato de celulosa (1,2 µm, 0,45 µm y 0,2 µm del tamaño de poro) para la filtración de lisados en bruto eran de Sartorius (Goettingen, Alemania).

5 Clonación de casetes de expresión

La secuencia del polipéptido SlyD de *Thermus thermophilus* se recuperó de la base de datos de SwissProt (n.º de registro Q72H58). La secuencia del polipéptido SlyD de *Thermococcus gammatolerans* se recuperó de la base de datos de Prosite (n.º de registro C5A738). Los genes sintéticos que codificaban SlyD de *Thermus thermophilus*, SlyD-IGF-1 (74-90) de *Thermus thermophilus*, y SlyD-ΔIF de *Thermus thermophilus* se adquirieron en Sloning Biotechnology GmbH (Alemania) y se clonaron en un vector de expresión pQE80L. El uso del codón se optimizó para expresión en células hospedadoras de *E. coli*. Los genes sintéticos que codificaban SlyD de *Thermococcus gammatolerans*, SlyD-IGF-2 (53-65) de *Thermococcus gammatolerans*, SlyD de *Thermus thermophilus*-antígeno y and SlyD-antígeno de *Thermococcus gammatolerans* se adquirieron en Geneart (Alemania) y se clonaron en vectores de expresión pET24 (Novagen, Madison, Wisconsin, USA). El uso del codón se optimizó para expresión en células hospedadoras de *E. coli*.

20 Además, un conector de GS (GGGS, SEQ ID NO: 42) y una etiqueta de His se fusionaron con el extremo carboxi terminal para permitir una purificación por afinidad de los polipéptidos quiméricos mediante una cromatografía de intercambio iónico de metal inmovilizado.

25 Para generar anticuerpos monoclonales que se unen de forma específica al fragmento 74-90 de IGF-1 (secuencia de aminoácidos NKPTGYGSSRRAPQTG, SEQ ID NO: 43) las respectivas secuencias de aminoácidos y péptidos se fusionaron en el SlyD de la chaperona molecular obtenida a partir de *Thermus thermophilus* por delección de los aminoácidos 68 - 120 de la proteína original. Debido a una adaptación en ángulo de la inserción de IGF-1, la Asp en la posición 70 y la Leu en la posición 88 se sustituyeron por una a Gly (D70G y L88G). De este modo, el polipéptido quimérico tiene la secuencia de aminoácidos:

30 MRGSKVGQDKVVTIRYTLQVEGEVLDQGELSYLHGHRNLIPGLEEALEGR  
EEGEAFQAHVPAEKAYGPHGNKPTGYGSSRRAPQTGGAGKDLDFQVEV  
VKVREATPEELLHGHAHGGGSRKHHHHHHHH (SEQ ID NO:44).

Como un control, se usó el SlyD de tipo silvestre nativo de *Thermus thermophilus*:

35 MKVGQDKVVTIRYTLQVEGEVLDQGELSYLHGHRNLIPGLEEALEGREEG  
EAFQAHVPAEKAYGPHDPEGVQVVPLSAFPEDAEEVPGAQFYAQDMEGN  
PMPLTVVAVEGEEVTVDNFHPLAGKDLDFQVEVVKVREATPEELLHGHA  
HGGGSRKHHHHHH (SEQ ID NO:45).

40 Para ensayo de identificación sistemática y de especificidad, se produjo un polipéptido quimérico SlyD-ΔIF de *Thermus thermophilus*. El polipéptido quimérico SlyD-ΔIF de *Thermus thermophilus* carece del dominio de IF, que se sustituyó por el motivo AGSGSS de la secuencia de aminoácidos, y comprende una etiqueta de secuencia de aminoácidos C-terminal:

45 MRGSKVGQDKVVTIRYTLQVEGEVLDQGELSYLHGHRNLIPGLEEALEGR  
EEGEAFQAHVPAEKAYGPHGAGSGSSGAGKDLDFQVEVVKVREATPEELL  
HGHAHGGGSRKHHHHHHHH (SEQ ID NO:46).

Como un control, se usó el SlyD nativo de *Thermococcus gammatolerans* que comprende una etiqueta de secuencia de aminoácidos C-terminal:

MKVERGDFVLFNYVGRYENGEVFDTSYESVAREQGFVEEREYSPIGVTVG  
 AGEIIPGIEEALLGMELGEKKEVVPPEKGYGMPREDLIVVPVIEQFTSAGLE  
 PVEGMYVMTDAGIAKILKVEEKTURLDFNHPLAGKTAIFEIEVVEIKKAGE  
 AGGGSRKHHHHH (SEQ ID NO:47).

Como un control para reactividad cruzada, la secuencia de horquilla estructuralmente homóloga del IGF-2 (53-65) humano se insertó en SlyD de *Thermococcus gammatolerans*, que se fusionó con un conector de GS y una etiqueta de hexahistidina en el extremo C-terminal:

MKVERGDFVLFNYVGRYENGEVFDTSYESVAREQGFVEEREYSPIGVTVG  
 AGEIIPGIEEALLGMELGEKKEVVPPEKGYGMP-G-SRVSRRSRG-G-  
 AGKTAIFEIEVVEIKKAGEAGGGSRKHHHHH (SEQ ID NO:48).

Expresión, purificación y replegamiento de polipéptidos quiméricos

Todos los polipéptidos SlyD se pueden purificar y volver a plegar usando protocolos casi idénticos. Las células BL21 (DE3) de *E. coli* que albergan el plásmido de expresión en particular se cultivaron a 37 °C en medio LB que contenía el respectivo antibiótico para crecimiento selectivo (30 µg/ml de Kanamicina, o Ampicilina (100 µg/ml)) a una DO<sub>600</sub> de 1,5, y la sobreexpresión citosólica se indujo por adición de isopropil-p-D-tiogalactósido 1 mM (IPTG). Tres horas después de la inducción, las células se cosecharon por centrifugación (20 min a 5.000 g), se congelaron y se almacenaron a -20 °C. Para la lisis celular, el sedimento congelado se volvió suspender en tampón de fosfato sódico 50 mM (pH 8, 0) enfriado suplementado con GdmCl 7 M e imidazol 5 mM. A partir de ese momento, la suspensión se agitó durante 2-10 horas en hielo para completar la lisis celular. Después de centrifugación (25.000 g, 1 h) y filtración (membrana de nitrato de celulosa, 8,0 µm, 1,2 µm, 0,2 µm), el lisado se aplicó en una columna de Ni-NTA equilibrada con el tampón de lisis. En la etapa de lavado posterior, la concentración de imidazol se aumentó a 10 mM (en tampón de fosfato sódico 50 mM (pH 8,0) que comprendía GdmCl 7 M, TCEP 5,0 mM) y se añadió TCEP 5 mM para mantener los restos de tiol en una forma reducida y para evitar la formación prematura de puentes disulfuro. Se aplicaron de al menos 15 a 20 volúmenes del tampón de lavado de reducción. A partir de ese momento, la solución de GdmCl se reemplazó con tampón de fosfato sódico 50 mM (pH 8,0) que comprendía NaCl 100 mM, imidazol 10 mM, y TCEP 5 mM para inducir el replegamiento conformacional del polipéptido quimérico de SlyD unido a matriz. Para evitar la reactivación de proteasas de copurificación, se añadió un cóctel inhibidor de proteasa (Complete® sin EDTA, Roche) al tampón de replegamiento. Un total de 15 a 20 volúmenes de columna de tampón de replegamiento se aplicaron e en un procedimiento de una noche. A partir de ese momento, tanto TCEP como el cóctel inhibidor sin EDTA Complete® se retiraron por lavado con 10 volúmenes de columna con tampón de fosfato sódico 50 mM (pH 8,0) que comprendía NaCl 100 mM e imidazol 10 mM. en la última etapa de lavado, la concentración de imidazol se aumentó a 30 mM (10 volúmenes de columna) para retirar los contaminantes tenaces. El polipéptido nativo se eluyó por aplicación de imidazol 250 mM en el mismo tampón. Las fracciones que contenían proteínas se evaluaron para pureza por Tricina-SDS-PAGE (Schaeffer, H. y von Jagow, G., Anal. Biochem. 166 (1987) 368-379) y se combinaron. Posteriormente, la proteína se sometió a cromatografía por exclusión de tamaño (Superdex™ HiLoad, Amersham Pharmacia) usando fosfato potásico como el sistema de tampón (tampón de fosfato potásico 50 mM (pH 7,0), KCl 100 mM, EDTA 0,5 mM). Por último, las fracciones que contenían proteínas se combinaron y se concentraron en una celda Amicon (YM10) hasta una concentración de ~ 5 mg/ml.

Mediciones espectroscópicas de UV

Las mediciones de concentración de proteínas se realizaron con un espectrofotómetro de doble haz UVIKON XL. Los coeficientes de extinción molar ( $\epsilon_{280}$ ) para las variantes de SlyD se calcularon de acuerdo con Pace (Pace, C. N., et al., Protein Sci. 4 (1995) 2411-2423).

Mediciones espectroscópicas de CD

Para examinar si las proteínas de fusión quiméricas de acuerdo con la invención adoptan una conformación plegada, se midieron los espectros de CD en la región del UV cercano. Los espectros de CD se registraron y se evaluaron usando un instrumento J-720 de JASCO y software de JASCO de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Se usó una cubeta de cuarzo con 0,2 cm de longitud de trayectoria. El instrumento se ajustó la una resolución a 1 °C, 1 nm de ancho de banda, 5 mdeg de sensibilidad y modo de acumulación 1. El tampón de nuestra era fosfato potásico 50 mM a pH 7,5, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM. La concentración de proteína para cada análisis era SlyD de *Thermus thermophilus* de tipo silvestre 36 µM, SlyD-ΔIF de *Thermus thermophilus* 23 µM, SlyD de *Thermus thermophilus*-antígeno 16 µM, SlyD de *Thermococcus gammatolerans* de tipo silvestre 19 µM, y SlyD-antígeno de

*Thermococcus gammatolerans* 16  $\mu\text{M}$ . Las señales de CD entre 250 nm y 330 nm con una resolución de 0,5 nm y barrido de 20 nm por minuto se registraron a 20 °C. En una realización experimental posterior, las señales de CD se determinaron en Gradientes de temperatura (20 °C - 100 °C) y (100 °C - 20 °C) para derivados de SlyD de *Thermococcus gammatolerans*, respectivamente (20 °C - 85 °C) y (85 °C- 20 °C) para derivados de SlyD de *Thermus thermophilus* a una longitud de onda constante de 277 nm. El gradiente de temperatura se realizó a 1 °C por minuto.

La Figura 31 muestra una representación de superposición de tres espectros de CD de los polipéptidos quiméricos de SlyD de *Thermus thermophilus* de tipo silvestre, SlyD- $\Delta\text{IF}$  de *Thermus thermophilus* y SlyD-antígeno de *Thermus thermophilus*. Las firmas de CD muestran que a 20 °C, todos los polipéptidos quiméricos se pliegan en su estructura nativa, incluso cuando el dominio de IF falta o se está sustituyendo por un injerto de aminoácido.

La Figura 32 muestra a un espectro de CD del UV cercano dependiente de la temperatura del polipéptido quimérico SlyD-antígeno de *Thermus thermophilus* en el gradiente de temperatura de 20 °C a 85 °C. El SlyD-antígeno de *Thermus thermophilus* se despliega y se vuelve a plegar de forma reversible.

En las condiciones físicas dadas no se pudo conseguir el desplegamiento completo de SlyD-antígeno de *Thermococcus gammatolerans* incluso a 100 °C (véase la Figura 33). La extraordinaria estabilidad de los dominios de FKBP arcaicos permite el injerto de polipéptidos mediante la sustitución de sus dominios IF en los que al mismo tiempo se mantiene la estabilidad global de la proteína de armazón quimérica recién generada.

Inmunización de ratones con SlyD-IGF-1 (74-90) de *Thermus thermophilus* y desarrollo de anticuerpos monoclonales con respecto a un IGF-1

Ratones Balb/c y NMRI de 8-12 semanas de edad se sometieron a inmunizaciones intraperitoneales repetidas con 100  $\mu\text{g}$  de SlyD-IGF-1 (74-90) de *Thermus thermophilus*. Los ratones se inmunizaron tres veces, en los momentos de 6 semanas y 10 semanas después de la inmunización inicial. La primera inmunización se puede realizar usando adyuvante de Freud completo, la segunda y tercera inmunizaciones se realizaron usando el adyuvante de Freud incompleto. Los títulos de suero de ratones con respecto a IGF-1 y SlyD-IGF-1 de *Thermus thermophilus* recombinante nativo (74-90) se sometieron a ensayo después de 12 semanas con métodos de ELISA como se describe a continuación. Después de 12 semanas los títulos de suero se analizaron usando ELISA. El ELISA se realizó con un Tecan Sunrise bajo Firmware: V 3.15 19/03/01; XREAD PLUS Versión: V 4.20. Las placas de múltiples pocillos Nunc Maxisorb F se revistieron con SlyD-IGF-1 (74-90) de *Thermus thermophilus* aplicando una solución que comprendía 0,5  $\mu\text{g}$  de polipéptido por ml. El antígeno aislado IGF-1 se inmovilizó en los pocillos de placas de múltiples pocillos StreptaWell High Bind SA aplicando una solución que comprendía 90 ng/ml de IGF-1 biotinilado. A partir de ese momento, los sitios de unión libres se bloquearon aplicando una solución que comprendía un 1 % de RPLA en PBS durante una hora a temperatura ambiente. Los pocillos se lavaron tres veces con una solución que comprendía cloruro sódico al 0,9 % (p/v) y Tween al 0,05 % (p/v). Como muestras, el suero de ratón se usó diluido a 1:50 con PBS. La dilución adicional opcional se realizó en 1:4 etapas hasta una dilución final de 1:819.200. El tiempo de incubación fue de una hora a temperatura ambiente. Los pocillos se lavaron tres veces con una solución que comprendía cloruro sódico al 0,9 % (p/v) y Tween al 0,05 % (p/v). Como anticuerpo de detección se usó un anticuerpo policlonal frente al dominio constante de los anticuerpos diana conjugados con una peroxidasa (PAK<M-Fcy>S-F(ab')<sub>2</sub>-POD). El anticuerpo de detección se aplicó a una concentración de 80 ng/ml en PBS que comprendía RSA al 1 % (p/v). El tiempo de incubación fue de una hora a temperatura ambiente. Los pocillos se lavaron tres veces con una solución que comprendía cloruro sódico al 0,9 % (p/v) y Tween al 0,05 % (p/v). A continuación los pocillos se incubaron con una solución de ABTS durante 15 minutos a temperatura ambiente. La intensidad del color desarrollado se determinó por vía fotométrica. La Figura 34 muestra los títulos de suero de los ratones obtenidos. Tres días antes de la preparación de células del bazo y fusión con una línea celular de mieloma, la inmunización final de refuerzo se realizó mediante inyección i.v. de 100  $\mu\text{g}$  del polipéptido quimérico SlyD-IGF-1 (74-90) de *Thermus thermophilus*. La producción de cultivos primarios de hibridomas puede se realizar de acuerdo con el procedimiento de Koehler y Milstein (Koehler, G. y Milstein, C., Nature, 256 (1975) 495-497).

#### Identificación sistemática con ELISA

Los sobrenadantes de cultivo primario se sometieron a ensayo con ELISA para reactividad frente al inmunógeno SlyD-IGF-1 (74-90) de *Thermus thermophilus*, IGF-1 biotinilado nativo y SlyD de *Thermus thermophilus* de tipo silvestre con respecto a una placa de blanco. El ELISA se realizó con un Tecan SUNRISE, Firmware: V 3.15 19/03/01; XREAD PLUS Versión: V 4.20. Las placas de ELISA de múltiples pocillos Nunc Maxisorb F se revistieron con 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  polipéptidos quiméricos de SlyD. Las placas de múltiples pocillos StreptaWell High Bind SA se revistieron con 125 ng/ml de antígeno de IGF-1 biotinilado recombinante. A partir de ese momento, los sitios de unión libres se bloquearon con un 1 % de RPLA en PBS durante una hora a temperatura ambiente. Los pocillos se lavaron tres veces con una solución que comprendía cloruro sódico al 0,9 % (p/v) y Tween al 0,05 % (p/v). Los sobrenadantes de hibridoma sin diluir en medio RPMI 1640 se usaron como muestras. El tiempo de incubación fue de una hora a temperatura ambiente. Los pocillos se lavaron tres veces con una solución que comprendía cloruro sódico al 0,9 % (p/v) y Tween al 0,05 % (p/v). Como anticuerpo de detección se usó un anticuerpo policlonal frente al dominio constante de los anticuerpos diana conjugados con una peroxidasa (PAK<M-Fcy>S-F(ab')<sub>2</sub>-POD). El anticuerpo de detección se aplicó a una concentración de 80 ng/ml en PBS que comprendía RSA al 1 % (p/v). El tiempo de

incubación fue de una hora a temperatura ambiente. Los pocillos se lavaron tres veces con una solución que comprendía cloruro sódico al 0,9 % (p/v) y Tween al 0,05 % (p/v). A continuación los pocillos se incubaron con una solución de ABTS durante 15 minutos a temperatura ambiente. La intensidad del color desarrollado se determinó por vía fotométrica a  $t$  405 nm. La longitud de onda de referencia fue 492 nm. Los sobrenadantes de hibridomas primarios, que muestran una formación de color rápida y fuerte en ELISA después de su unión a IGF-1 recombinante, SlyD-IGF-1 (74-90) de *Thermus thermophilus* y menos unión a SlyD de *Thermus thermophilus* se transfirieron en el proceso de identificación sistemática de cinética como se describe a continuación.

#### Identificación sistemática de cinética basada en SPR

SlyD-IGF-1 (74-90) de *Thermus thermophilus*, IGF-1 recombinante nativo, IGF-2 recombinante nativo, SlyD de *Thermus thermophilus* de tipo silvestre, y SlyD-IGF-1 (74-90) de *Thermus thermophilus* se usaron en un análisis de identificación sistemática de cinética basada en SPR. Para análisis de SPR, por lo general se acepta el uso de analitos monoméricos y monovalentes en solución para determinar la cinética de unión del anticuerpo de acuerdo con un modelo de Langmuir. Además, para las mediciones de SPR es bastante ventajoso usar un analito con peso molecular más elevado para aumentar la sensibilidad de las mediciones, ya que SPR es un análisis sensible a la masa.

La identificación sistemática de cinética se realizó en un instrumento BIAcore A100 bajo el control de la versión V1.1 del software. Un chip BIAcore CM5 se montó en el instrumento y se dirigió de forma hidrodinámica acondicionado de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Como tampón de desarrollo, se usó un tampón de HBS-EP (HEPES 10 mM (pH 7,4), NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, P20 al 0,05 % (p/v)). Un anticuerpo de captura de Fc de IgG anti-ratón de conejo policlonal se inmoviliza a 30  $\mu$ g/ml en tampón de acetato sódico 10 mM (pH 4,5) para las aplicaciones puntuales 1, 2, 4 y 5 en las celdas de flujo 1, 2, 3 y 4 a 10.000 RU (Figura 35). El anticuerpo se inmoviliza covalentemente a través de química de NHS/EDC. El sensor se desactivó a partir de ese momento con una solución de etanolamina 1 M. Las aplicaciones puntuales 1 y 5 se usaron para la determinación y las aplicaciones puntuales 2 y 4 se usaron como referencia. Antes de la aplicación al chip sensor, los sobrenadantes de hibridoma se diluyeron a 1:2 en tampón de HBS-EP. La solución diluida se aplicó a un caudal de 30  $\mu$ l/min durante 1 min. Inmediatamente a partir de ese momento, el analito, tal como el SlyD-IGF-1 (74-90) de *Thermus thermophilus*, polipéptido quimérico, se inyecta a un caudal de 30  $\mu$ l/min durante 2 min. A partir de ese momento, la señal se registra durante 5 minutos de tiempo de disociación. El sensor se regenera por inyección de una solución de glicina-HCl 10 mM (pH 1,7) durante 2 min. a un caudal de 30  $\mu$ l/min. Dos puntos de informe, la señal registrada poco antes del final de la inyección de analito, indicada como unión tardía (BL) y la señal registrada poco antes del final del tiempo de disociación, estabilidad tardía (SL), se usaron para caracterizar el rendimiento de identificación sistemática cinética.

Además, la constante de la tasa de disociación  $k_d$  (1/s) se calculó de acuerdo con un modelo de Langmuir y la semivida del complejo de anticuerpo/antígeno se puede calcular en minutos de acuerdo con la fórmula  $\ln(2)/(60 \cdot k_d)$ .

Los anticuerpos se obtuvieron por inmunización con el antígeno de SlyD-IGF-1 (74-90) de *Thermus thermophilus*, y mediante identificación sistemática con SlyD-IGF-1 (74-90) de *Thermus thermophilus*, SlyD de *Thermus thermophilus* de tipo silvestre, IGF-1 nativo e IGF-2 nativo. El enfoque de identificación sistemática basado en armazón permite desarrollar de forma específica anticuerpos que se unen al epítipo de horquilla de IGF-1 definido previamente.

Los sobrenadantes del cultivo primario se desarrollaron adicionalmente mediante dilución limitada en sobrenadantes de cultivo de clon con métodos conocidos. Los sobrenadantes de cultivo de clon se sometieron a ensayo en un ensayo funcional para afinidad y especificidad.

#### Caracterización con BIAcore de sobrenadantes de cultivo de clon que producen anticuerpos

Se usó un instrumento BIAcore T200 (GE Healthcare) con un sensor BIAcore CM5 montado en el sistema. El sensor se acondicionó previamente con una inyección de 1 min. a 100  $\mu$ l/min de SDS al 0,1 %, NaOH 50 mM, HCl 10 mM y H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 100 mM.

El tampón del sistema era PBS-DT (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,1 mM, KCl 2,7 mM, NaCl 137 mM, Tween® 20 al 0,05 %, DMSO al 5 %). El tampón de muestra era el tampón del sistema.

El sistema BIAcore T200 se realizó bajo el software de control V1.1.1. El anticuerpo de IgG de conejo policlonal <IgGFCyM>R (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.) se inmovilizó a 30  $\mu$ g/ml en tampón de acetato sódico 10 mM (pH 4,5) a 6500 RU en las celdas de flujo 1, 2, 3, y 4, respectivamente, a través de química de EDC/NHS de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Por último, la superficie del sensor se bloqueo con una solución de etanolamina 1 M. El experimento completo se realizó a 25 °C.

Los sobrenadantes del cultivo de clon que contenían los respectivos anticuerpos a aproximadamente 40 nM se capturaron durante 2 min. a un caudal de 5  $\mu$ l/min en la superficie de <IgGFCyM>R. Como analitos en solución, se usaron polipéptidos quiméricos IGF-1 nativo recombinante, IGF-2 nativo recombinante, SlyD-IGF-1 (74-90) de

5 *Thermus thermophilus*, SlyD de *Thermus thermophilus* recombinante de tipo silvestre, SlyD-ΔIF de *Thermus thermophilus* recombinante, SlyD de *Thermococcus gammatolerans* recombinante de tipo silvestre, SlyD-IGF-2 (53-65) de *Thermococcus gammatolerans* recombinante. SlyD-ΔIF de *Thermus thermophilus* es únicamente el dominio de FKBP de SlyD de *Thermus thermophilus* que carece de dominio IF. SlyD-IGF-2 (53-65) de *Thermococcus gammatolerans* se usó para contraidentificación sistemática investiga la especificidad para la horquilla de IGF-1  
10 contraste con la inserción de la horquilla de IGF-2. Los respectivos ámbitos se inyectaron en diferentes etapas de concentración de 90 nM, 30 nM, 10 nM, 3,3 nM, 1,1 nM y 0 nM. La fase de asociación se controló durante 3 min. a un caudal de 100 μl/min. La constante de disociación se controló durante 10 min. a un caudal de 100 μl/min. El sistema se regeneró usando un tampón de glicina 10 mM (pH 1,7). Las cinéticas se evaluaron usando el software de evaluación de BIAcore.

15 En el presente documento se usan los siguientes términos: mAb: anticuerpo monoclonal; RU: unidad de respuesta relativa de anticuerpo monoclonal capturado en el sensor; Antígeno: antígeno en solución; kDa: peso molecular de los antígenos inyectados como analitos en solución; ka: constante de la tasa de asociación; kd: constante de la tasa de disociación; t1/2 dis: semivida del complejo de anticuerpo-antígeno calculada de acuerdo con the fórmula  $t_{1/2} \text{ dis} = \ln(2)/60 \cdot kd$ ; KD: constante de disociación; R<sub>MAX</sub>: señal de unión a fin la fase de asociación de la inyección de analito 90 nM; MR: Proporción Molar; Chi<sup>2</sup>: fallo de la medición; n.d.: no detectable.

20 La Figura 36 muestra que los anticuerpos monoclonales derivados de armazón, M-11.11.17 y M-10.7.9, se han desarrollado con afinidad picomolar con respecto a IGF-1. No se detectó reactividad cruzada con respecto a IGF-2, ni con respecto a SlyD de *Thermus thermophilus* de tipo silvestre, ni con respecto a SlyD de *Thermococcus gammatolerans* de tipo silvestre, ni con respecto a polipéptido quimérico SlyD-ΔIF de *Thermus thermophilus*, ni con respecto a polipéptido quimérico SlyD-IGF-2 (53-65) de *Thermococcus gammatolerans*.

25 M-2.28.44 es un anticuerpo monoclonal obtenido por inmunización convencional de ratones con IGF-1 humano recombinante. A pesar del hecho de que el anticuerpo muestra una afinidad de 30 pM con respecto a IGF-1, una actividad cruzada de 500 pM se puede detectar con respecto a IGF-2. Usando SlyD-IGF-1 (74-90) de *Thermus thermophilus* y SlyD-IGF-2 (53-65) de *Thermococcus gammatolerans* como analitos, se puede observar que el epítipo de IGF-2 de reacción cruzada en la región de horquilla de IGF.  
30

#### Observaciones adicionales

35 Para el desarrollo de anticuerpos de unión a IGF-1 nativos se ha encontrado que se tiene que usar un armazón, que presenta la inserción polipeptídica en su conformación nativa. Por lo tanto, es necesario que el polipéptido quimérico de presentación sea un polipéptido plegado de forma estable. Se ha encontrado que esto se puede conseguir usando un dominio de FKBP a partir de un organismo extremófilo (es decir, termófilo), tal como SlyD de *Thermus thermophilus*, o SlyD de *Thermococcus gammatolerans*.

40 Para examinar si los polipéptidos quiméricos, como se informa en el presente documento, adoptan una conformación plegada, se determinaron espectros de CD en la región del UV cercano. El CD del UV cercano determina el entorno asimétrico de restos aromáticos en un polipéptido y por lo tanto es un ensayo sensible para estructura terciaria ordenada. El SlyD nativo tiene una firma de CD habitual en la región del UV cercano. Por lo tanto, las distorsiones estructurales o choques estéricos debido a una inserción en el dominio IF deberían ser visibles en el espectro de CD del UV cercano. En la Figura 37 se muestra una superposición de los espectros de SlyD de *Thermus thermophilus*  
45 de tipo silvestre, el dominio FKBP de SlyD de *Thermus thermophilus* de tipo silvestre que carece del dominio IF (polipéptido quimérico SlyD-ΔIF de *Thermus thermophilus*) y polipéptido quimérico SlyD-antígeno de *Thermus thermophilus*, en la que se insertó una inserción de 22 aminoácidos a partir de un fragmento del receptor extracelular humano. Se ha encontrado que la sustitución del dominio IF de *Thermus thermophilus* como resultado un cambio de la estructura general del dominio IF restante. Se puede observar que la firma de los espectros es similar. Dado que  
50 el desplegamiento podría anular la señal de CD del UV cercano, este resultado proporciona evidencias de que en el polipéptido quimérico se retiene un pliegue de tipo nativo.

55 El polipéptido quimérico SlyD-antígeno de *Thermus thermophilus* es un polipéptido quimérico que comprende una inserción de estructura secundaria de horquilla beta de 22 aminoácidos de un dominio extracelular del receptor del factor de crecimiento humano (ECD). Las firmas de CD demuestran que a 20 °C todos los polipéptidos están bien plegados en su estructura nativa.

60 La Figura 38 muestra los espectros de CD dependientes de la temperatura del polipéptido quimérico SlyD-ΔIF de *Thermus thermophilus*. Después de desplegamiento inducido por la temperatura, el dominio FKBP de SlyD de *Thermus thermophilus* se puede volver a pegar cuando se enfría de nuevo. Debido a esto, los polipéptidos quiméricos se pueden purificar por afinidad mediante un replegamiento en columna y, además, en contraste con los hallazgos con el polipéptido quimérico SlyD-FKBP12-IGF-1, el polipéptido quimérico SlyD-IGF-1 (74-90) de *Thermus thermophilus* posee una estabilidad estructural para presentar el motivo de estructura secundaria de IGF-1 en el dominio FKBP en una conformación estable. Los espectros de CD del UV cercano dependientes de la temperatura  
65 del polipéptido quimérico SlyD-antígeno de *Thermococcus gammatolerans* muestran una estabilidad incluso más elevada cuando se compara con el polipéptido quimérico de antígeno de *Thermus thermophilus* (véase la Figura 39).

5 Ambos armazones portan la misma inserción de estructura secundaria de horquilla beta de 22 aminoácidos de un ECD de receptor del factor de crecimiento humano. El SlyD-antígeno de *Thermococcus gammatolerans* se pliega y se despliega de forma reversible. Se ha encontrado que, en las condiciones físicas dadas, no se podía conseguir un desplegamiento completo del polipéptido quimérico SlyD-antígeno de *Thermococcus gammatolerans* incluso a una temperatura de 100 °C.

10 Se ha encontrado que la estabilidad de los dominios de FKBP arcaicos permite el injerto de polipéptidos inmunogénico por sustitución de sus dominios IF con lo que al mismo tiempo se mantiene la estabilidad global de la proteína de armazón quimérica recién generada.

15 El polipéptido quimérico SlyD-IGF-1 (74-90) de *Thermus thermophilus* se purificó como un polipéptido estable y monomérico (véase la Figura 22).

20 La fracción de monómero del polipéptido quimérico SlyD-antígeno de *Thermococcus gammatolerans* se volvió a cromatografiar después de ciclos repetidos de congelación y descongelación y un ensayo de tensión de temperatura (véase la Figura 40).

25 Los ratones se inmunizaron con el polipéptido de MKVGGQDKVVTIRYTLQVEGEVLDQGELSYLGHRNLIPGLEEALGREGG EAFQAHVPAEKAYGPHGNKPTGYGSSRRAPQTGGAGKDLDFQVEVVKV REATPEELLH-GHAHPSGHHHHHH (SEQ ID NO: 49). Los linfocitos B obtenidos se analizaron usando un ELISA. Como control se usaron el polipéptido quimérico SlyD-IGF-1 (74-90) de *Thermus Thermophilus*, polipéptido SlyD de *Thermus Thermophilus* de tipo silvestre, IGF-1 e IGF-2.

30 El polipéptido SlyD de *Thermus Thermophilus* de tipo silvestre que comprende una etiqueta de secuencia de aminoácidos C-terminal de GSRKHHHHHHHH (SEQ ID NO: 51) (véase la Figura 41 para SDS y transferencia de Western) tienen la siguiente secuencia de aminoácidos:

MRGSKVGQDKVVTIRYTLQVEGEVLDQGELSYLGHRNLIPGLEEALGREGG  
EEGEAFQAHVPAEKAYGPHDPEGVQVVPLSAFPEDAEEVVPGAQFYAQDM  
EGNPMPLTVVAVEGEEVTVDNFHPLAGKDLDFQVEVVKVREATPEELLHG  
HAHGGGSRKHHHHHHHH (SEQ ID NO:50).

35 Todos los sobrenadantes del cultivo de clon (CCS) forman complejos estables con IGF-1 y el polipéptido quimérico SlyD-IGF-1 de *Thermus Thermophilus* a 37 °C. No se detectó reacción cruzada con el polipéptido de *Thermus Thermophilus* de tipo silvestre con ninguno de los CCS. No se detectó reactividad cruzada con IGF-2, excepto para un clon (véase la Figura 42). A partir de la Figura 43 se puede observar que los primeros 8 sobrenadantes del cultivo de clon tienen una  $t_{1/2}$ -dis de 2 minutos, mientras que el analito IGF-1 se asocia más rápido con los últimos 4 sobrenadantes del cultivo de clon y se disocia más lentamente. Permanece en el complejo durante un periodo superior a 40 minutos. En la Figura 44 se muestran sensogramas a modo de ejemplo para un clon. Se puede observar que el anticuerpo se une a IGF-1 y el polipéptido quimérico IGF-1 de *Thermus thermophilus* mientras que la unión a IGF-1 y el polipéptido de tipo silvestre de *Thermus thermophilus* no se pueden detectar.

40 Por lo tanto, los polipéptidos quiméricos de SlyD-antígeno de *Thermus thermophilus* y los polipéptidos quiméricos de SlyD-antígeno de *Thermococcus gammatolerans* se pueden usar como inmunógeno combinado y/o como herramientas de identificación sistemática, por ejemplo para el desarrollo de anticuerpos monoclonales específicos de epítipo que se dirigen al inmunógeno que está contenido en el polipéptido. Una aplicación adicional es la identificación sistemática de biblioteca para detectar una interacción específica tal como unión de un polipéptido quimérico a una molécula diana.

#### Ejemplo 13

50 Enfoque de identificación sistemática de contador basado en armazón para la selección de anticuerpos de unión a antígeno

55 Los ratones RMNI de seis semanas de edad se sometieron 3 veces a inmunización intraperitoneal con 100 µg de polipéptido quimérico recombinante que comprendía el elemento de antígeno-SlyD de *Thermococcus gammatolerans* (TgSlyD-antígeno). Después de 10 semanas, se puso un refuerzo a los ratones con 25 µg de TgSlyD-antígeno. Se produjeron células de hibridoma de acuerdo con métodos conocidos. Los hibridomas primarios se aislaron por dilución limitante y se identificaron sistemáticamente a la unión a antígeno por ELISA.

50 ng/ml de polipéptido quimérico de TgSlyD-antígeno, 50 ng/ml de TgSlyDΔIF y 1 µg/ml de antígeno aislado cada uno se revistió en placas de 30x 384 pocillos (Nunc) durante una noche a 4 °C. El tampón de revestimiento se

preparó en el momento con 1 comprimido de carbonato-bicarbonato (Sigma, C3041-100CAP99) resuelto en 100 ml de H<sub>2</sub>O doblemente destilada (ddH<sub>2</sub>O). 100 µl de tampón de lavado (NaCl 150 mM, 10 ml de Tween 20 (Sigma), 40 ml de Bromidox L (Roche) en 1 l de dH<sub>2</sub>O). Los pocillos se lavaron tres veces con 100 µl de tampón de lavado (NaCl 150 mM, 10 ml de Tween 20 (Sigma), 40 ml de Bromidox L (Roche) en 1 l de dH<sub>2</sub>O) usando una lavadora BioTek. Los pocillos se bloquearon con 30 µl de tampón de bloqueo (10 g de BSA, 10 x PBS (Gibco) en 1 l de dH<sub>2</sub>O) durante una hora a TA, seguido de 3 veces lavado con 100 µl de tampón de lavado. Se transfirieron 30 µl de sobrenadantes de hibridoma diluido a 1:1000 en los pocillos usando un Liquidador y se incubaron durante una hora a TA. Como control positivo se usó un suero antigénico positivo. Los pocillos se lavaron tres veces con 100 µl de tampón de lavado. El fragmento de anticuerpo IgG de cabra anti-ratón de F(ab')<sub>2</sub> conjugado con peroxidasa (Dianova) se diluyó a 1:30000 en tampón de bloqueo y se transfirieron 30 µl en cada pocillo. La incubación durante una hora a TA fue seguida de tres veces de lavado con 100 µl de tampón de lavado. 30 µl de sustrato de ABTS listo para usar se incubaron durante 30 min de TA en cada pocillo. Las señales de absorción se controlaron como señales de referencia a 405 nm/492 nm usando un lector PowerWave XS (BioTek). 15 cultivos de hibridoma, que mostraban señales positivas de ELISA con respecto al polipéptido quimérico que comprendía TgSlyD-antígeno y el antígeno se aislaron y no se seleccionaron señales con respecto al TgSlyDΔIF que comprendía polipéptido quimérico y se cultivaron adicionalmente.

Los sobrenadantes del hibridoma primario se aislaron y se identificaron sistemáticamente para unión a antígeno mediante una segunda contraidentificación sistemática con ELISA, realizada de la misma manera que se ha descrito anteriormente. En la segunda identificación sistemática, se usaron reactivos de identificación sistemática adicionales para precisar la especificidad de los sobrenadantes de cultivo que contenían anticuerpo.

Se revistieron 50 ng/ml de polipéptido quimérico TgSlyD-antígeno, 50 ng/ml de TgSlyDΔIF, 500 ng de polipéptido quimérico ttSlyD-antígeno y 1 µg/ml de antígeno aislado y en placas de 384 pocillos (Nunc) durante una hora a temperatura ambiente. El ELISA se realizó como se ha descrito anteriormente. Debido a su diferente origen de especie, SlyD de *T. th.* y SlyD de *T. g.*, muestran poca homología de secuencia. Solamente un 36 % de los aminoácidos son idénticos y de acuerdo con un cálculo de 62 de plenitud hay solamente una similitud de secuencias de un 48 %. De todos modos, TgSlyDΔIF carece de la inserción. Por lo tanto, los polipéptidos son muy adecuados para su uso en una contraidentificación sistemática con ELISA.

Por lo tanto, mediante inmunización con el polipéptido sustituto del armazón, se podría dirigir previamente un epítipo específico en el dominio de antígeno nativo.

#### Ejemplo 14

##### Formación de mapas de epítipos

Los polipéptidos quiméricos SlyD-FKBP también pueden llevar motivos complejos de inserción de aminoácidos, como por ejemplo estructuras secundarias que contienen enlaces disulfuro. Dado que los polipéptidos quiméricos están libres de cisteínas, el plegamiento en columna en condiciones apropiadas facilita la formación correcta de disulfuros dentro de la inserción, asistida adicionalmente por la funcionalidad de chaperona del propio SlyD. Los polipéptidos quiméricos SlyD-FKBP se expresaron en *E. coli* y se replegaron en columna como se ha descrito anteriormente. El SlyD-FKBP12ctrl se dializó en tampón HEPES 75 mM (pH 7,5) que comprendía NaCl 150 mM, sacarosa al 6,5 % (p/v), cisteína 10 mM a una concentración de 9,5 mg/ml. Una porción de 1 mg/ml del polipéptido quimérico SlyD-FKBP12-CD81 se dializó en tampón de fosfato potásico 50 mM a pH 7,0, que comprendía NaCl 100 mM, EDTA 1 mM con el fin de evitar el barajado de disulfuro en la inserción de CD81, que contiene 4 cisteínas formando dos enlaces disulfuro relevancia funcional de la estructura. Los polipéptidos quiméricos SlyD-FKBP12-CD81 y SlyD-FKBP12ctrl se usaron con el fin de formar mapas de epítipos.

El CD81 humano es un receptor para la glicoproteína E2 de envoltura del virus de la hepatitis C. CD81 es una proteína transmembrana perteneciente a la familia de las tetraespaninas. CD81 es una proteína homodimérica de 90 aminoácidos de longitud, que presenta una estructura similar a la de un hongo (PDB 1IV5). Se pueden formar mapas de los restos conocidos por estar implicados en la unión del virus sobre los 35 aminoácidos de longitud denominados "subdominio director", proporcionando una base para el diseño de fármacos y vacunas antivirales. Dado que la secuencia de subdominio director del sitio de unión del virus tiene solamente 35 aminoácidos de longitud, es difícil formar mapas de los epítipos de anticuerpo en la proteína CD81 de 10 kDa usando experimentos convencionales de bloqueo cruzado. Es difícil distinguir anticuerpos, que de forma específica se unen directamente en el dominio director relevante de tipo hongo, a partir de anticuerpos que se unen cerca o en cualquier parte de la estructura de CD81LEL. Todos los anticuerpos podrían mostrar independientemente de su sitio de unión un efecto de competición de proteína de envoltura de E2 del VHC, pero sin unirse de forma específica a la estructura diana, es decir, el dominio director. Por lo tanto, el injerto de la estructura del dominio director relevante en FKBP y una formación de mapas de epítipos consecutiva es un método útil por diversas razones. En primer lugar, se eluden algunos problemas bioquímicos con la proteína CD81LEL, porque la propia proteína tiende a oligomerizarse. En segundo lugar, es más adecuado identificar los epítipos de anticuerpo de un gran número de anticuerpos que se unen todos a la proteína CD81 de longitud completa.

En la Figura 45 se muestra un SDS PAGE (izquierda) y transferencia de Western (derecha) de Ni-NTA SlyD-FKBP12-CD81 purificado de forma cromatográfica.

- 5 Un Instrumento BIAcore 2000 (GE Healthcare) se usó a 25 °C con un sensor CM5 de BIAcore montado en el sistema. El sensor se acondicionó previamente para una inyección de 1 minuto a 100 µl/min de SDS al 0,1 %, NaOH 50 mM, HCl 10 mM y H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 100 mM. Como tampón de desarrollo se usó un tampón HBS-EP (HEPES 10 mM (pH 7,4), NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, P20 al 0,05 % (p/v). El tampón de muestra fue el tampón del sistema. Cada ligando de proteína se inmovilizó mediante la química de EDC/NHS a 30 µg/ml en tampón de acetato sódico 10 mM (pH 4,0) en las celdas de flujo 2, 3 y 4. La celda de flujo 1 se usó como referencia. El sensor se desactivó con una solución de etanolamina 1 M a pH 8,0. Se inmovilizaron las siguientes masas en unidades de respuesta (RU) en el sensor: celda de flujo 2: 1800 RU de SlyD-FKBP12ctrl (32,8 kDa), celda de flujo 3: SlyD-FKBP12-CD81 (35,8 kDa), celda de flujo 4: 900 RU de CD81LEL (10 kDa). 31 analitos de anticuerpo se inyectaron a 30 µl/min a 50 nM cada uno para una fase de asociación de 3 min. y fase de disociación de 3 min. 30 anticuerpos se obtuvieron a partir de una campaña de inmunización con la proteína CD81LEL de 10 kDa. La superficie del sensor se regeneró usando HCl 100 mM a 20 µl/min para 3 inyecciones consecutivas de 30 seg. Los sensogramas se controlaron como señales de referencia 2-1 (celda de flujo 2 menos celda de flujo 1), 3-1 y 4-1 y se evaluaron usando el software de evaluación BIAcore 4.1. Al final de la inyección del analito, se estableció un punto de informe para cuantificar la señal máxima de unión del analito. La señal de unión al analito más elevada se ajustó a un 100 % para normalizar los datos.
- 10
- 15
- 20 En la tabla que sigue a continuación se muestran las respuestas de unión de anticuerpo normalizado. A partir de los 30 anticuerpos <CD81-LEL>M sometidos a ensayo, solamente 6 (en negrita) muestran un epítipo preciso en el dominio director de CD81. El polipéptido de control negativo, SlyD-FKBP12ctrl, no estaba unido. El polipéptido de control positivo, CD81-LEL, que era el inmunógeno al mismo tiempo, era reconocido por todos los anticuerpos. SlyD-FKBP12-CD81 era el único que estaba unido, cuando el epítipo de anticuerpo se sitúa de forma precisa en el dominio de hongo.
- 25

Tabla

Ligandos	Slyd-FKBP12-ctrl	Slyd-FKBP12-CD81	CD81-LEL
Analitos	Señal de unión de ref. normalizada (%)		
HBS-ET	0	0	0
K01	0	0	63
K02_1	0	0	62
K02_2	0	0	61
K03	0	47	93
K04	0	0	80
K05	0	26	100
K06	0	32	74
K07	0	0	62
K08	0	0	56
K10	0	0	46
K21	0	0	77
K22	0	29	80
K23	0	0	37
K24	0	17	86
K25	0	0	38
K27	0	29	81
K28	0	0	41

Ligandos	Slyd-FKBP12-ctrl	Slyd-FKBP12-CD81	CD81-LEL
Analitos	Señal de unión de ref. normalizada (%)		
K30	0	0	52
K31	0	0	66
K32	0	0	53
K34	0	0	66
K35	0	0	44
K36	0	0	54
K37	0	0	52
K38	0	0	65
K39	0	0	66
K40	0	0	51
K41	0	0	67
K42	0	0	60
K43	0	0	58

Confirmación de los resultados de formación de mapas de epítomos mediante análisis de cristalografía de rayos X

5 Los fragmentos de Fab de los anticuerpos K05 y K04 se cocrystalizaron con la proteína CD81-LEL y se analizaron por análisis de difracción de rayos X (Seth Harris, Palo Alto). La resolución obtenida fue de 2,15 Å. Mientras que el anticuerpo K05 se une en el dominio de hongo, el anticuerpo K04 se une a un epítomo fuera del sitio de la secuencia de hongo.

10 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Roche Diagnostics GmbH, Mannheim (DE) F. Hoffmann-La Roche AG, Basel (CH)

<120> Ácidos nucleicos que codifican polipéptidos quiméricos para la identificación sistemática de bibliotecas

15 <130> 31322 WO

<160> 51

20 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 4

<212> PRT

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de aminoácido invariante adicional en X

<400> 1

30

**Gly Ala Gly Ser**  
1

<210> 2

<211> 4

35 <212> PRT

<213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> secuencia de aminoácido invariante adicional en X  
 5 <400> 2  
  

**Gly Ser Ser Gly**  
**1**

 10 <210> 3  
 <211> 3  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 15 <220>  
 <223> secuencia de aminoácido invariante adicional en X  
  
 <400> 3  
  

**Gly Ser Ser**  
**1**

 20  
 <210> 4  
 <211> 90  
 <212> PRT  
 25 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> realización específica de fórmula I  
 30 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> En línea con la descripción de la fórmula I, Xaa representa un aminoácido que comprende una secuencia variable a mostrar por el polipéptido quimérico  
 35 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (64)..(64)  
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural  
 40 <400> 4

ES 2 603 589 T3

```

Met Lys Val Gly Gln Asp Lys Val Val Thr Ile Arg Tyr Thr Leu Gln
1          5          10          15

Val Glu Gly Glu Val Leu Asp Gln Gly Glu Leu Ser Tyr Leu His Gly
          20          25          30

His Arg Asn Leu Ile Pro Gly Leu Glu Glu Ala Leu Glu Gly Arg Glu
          35          40          45

Glu Gly Glu Ala Phe Gln Ala His Val Pro Ala Glu Lys Ala Tyr Xaa
          50          55          60

Gly Lys Asp Leu Asp Phe Gln Val Glu Val Val Lys Val Arg Glu Ala
65          70          75          80

Thr Pro Glu Glu Leu Leu His Gly His Ala
          85          90

```

- 5 <210> 5
- <211> 152
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
  
- 10 <220>
- <223> En línea con la descripción de la fórmula I, Xaa representa un aminoácido que comprende una secuencia variable a mostrar por el polipéptido quimérico *Thermus thermophilus* SlyD
  
- 15 <220>
- <221> MISC\_FEATURE
- <223> En línea con la descripción de la fórmula I, Xaa representa un aminoácido que comprende una secuencia variable a mostrar por el polipéptido quimérico
  
- 20 <220>
- <221> misc\_feature
- <222> (64)..(64)
- <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
  
- <400> 5

ES 2 603 589 T3

Met Lys Val Gly Gln Asp Lys Val Val Thr Ile Arg Tyr Thr Leu Gln  
 1 5 10 15

Val Glu Gly Glu Val Leu Asp Gln Gly Glu Leu Ser Tyr Leu His Gly  
 20 25 30

His Arg Asn Leu Ile Pro Gly Leu Glu Glu Ala Leu Glu Gly Arg Glu  
 35 40 45

Glu Gly Glu Ala Phe Gln Ala His Val Pro Ala Glu Lys Ala Tyr Xaa  
 50 55 60

Gly Lys Asp Leu Asp Phe Gln Val Glu Val Val Lys Val Arg Glu Ala  
 65 70 75 80

Thr Pro Glu Glu Leu Leu His Gly His Ala Gly Ala Gly Ser Gly Ala  
 85 90 95

Gly Ala Gly Ser Gly Ala Gly Ala Gly Ser Pro Ala Ala Val Pro Ala  
 100 105 110

Ala Val Pro Ala Ala Val Gly Glu Gly Glu Gly Glu Phe Ser Thr Pro  
 115 120 125

Val Trp Ile Ser Gln Ala Gln Gly Ile Arg Ala Gly Pro Gln Arg Leu  
 130 135 140

Ser Asn Pro Gln Pro Met Arg Gly  
 145 150

5 <210> 6  
 <211> 165  
 <212> PRT  
 <213> *Escherichia coli*  
 <400> 6

ES 2 603 589 T3

Met Lys Val Ala Lys Asp Leu Val Val Ser Leu Ala Tyr Gln Val Arg  
 1 5 10 15

Thr Glu Asp Gly Val Leu Val Asp Glu Ser Pro Val Ser Ala Pro Leu  
 20 25 30

Asp Tyr Leu His Gly His Gly Ser Leu Ile Ser Gly Leu Glu Thr Ala  
 35 40 45

Leu Glu Gly His Glu Val Gly Asp Lys Phe Asp Val Ala Val Gly Ala  
 50 55 60

Asn Asp Ala Tyr Gly Gln Tyr Asp Glu Asn Leu Val Gln Arg Val Pro  
 65 70 75 80

Lys Asp Val Phe Met Gly Val Asp Glu Leu Gln Val Gly Met Arg Phe  
 85 90 95

Leu Ala Glu Thr Asp Gln Gly Pro Val Pro Val Glu Ile Thr Ala Val  
 100 105 110

Glu Asp Asp His Val Val Val Asp Gly Asn His Met Leu Ala Gly Gln  
 115 120 125

Asn Leu Lys Phe Asn Val Glu Val Val Ala Ile Arg Glu Ala Thr Glu  
 130 135 140

Glu Glu Leu Ala His Gly His Val His Gly Ala His Asp His His His  
 145 150 155 160

Asp His Asp His Asp  
 165

5

<210> 7  
 <211> 149  
 <212> PRT  
 <213> *Thermus thermophilus*  
 <400> 7

ES 2 603 589 T3

Met Lys Val Gly Gln Asp Lys Val Val Thr Ile Arg Tyr Thr Leu Gln  
 1 5 10 15

Val Glu Gly Glu Val Leu Asp Gln Gly Glu Leu Ser Tyr Leu His Gly  
 20 25 30

His Arg Asn Leu Ile Pro Gly Leu Glu Glu Ala Leu Glu Gly Arg Glu  
 35 40 45

Glu Gly Glu Ala Phe Gln Ala His Val Pro Ala Glu Lys Ala Tyr Gly  
 50 55 60

Pro His Asp Pro Glu Gly Val Gln Val Val Pro Leu Ser Ala Phe Pro  
 65 70 75 80

Glu Asp Ala Glu Val Val Pro Gly Ala Gln Phe Tyr Ala Gln Asp Met  
 85 90 95

Glu Gly Asn Pro Met Pro Leu Thr Val Val Ala Val Glu Gly Glu Glu  
 100 105 110

Val Thr Val Asp Phe Asn His Pro Leu Ala Gly Lys Asp Leu Asp Phe  
 115 120 125

Gln Val Glu Val Val Lys Val Arg Glu Ala Thr Pro Glu Glu Leu Leu  
 130 135 140

His Gly His Ala His  
 145

5 <210> 8  
 <211> 156  
 <212> PRT  
 <213> *Thermococcus gammatolerans*  
 <400> 8

ES 2 603 589 T3

Met Lys Val Glu Arg Gly Asp Phe Val Leu Phe Asn Tyr Val Gly Arg  
 1 5 10 15

Tyr Glu Asn Gly Glu Val Phe Asp Thr Ser Tyr Glu Ser Val Ala Arg  
 20 25 30

Glu Gln Gly Ile Phe Val Glu Glu Arg Glu Tyr Ser Pro Ile Gly Val  
 35 40 45

Thr Val Gly Ala Gly Glu Ile Ile Pro Gly Ile Glu Glu Ala Leu Leu  
 50 55 60

Gly Met Glu Leu Gly Glu Lys Lys Glu Val Val Val Pro Pro Glu Lys  
 65 70 75 80

Gly Tyr Gly Met Pro Arg Glu Asp Leu Ile Val Pro Val Pro Ile Glu  
 85 90 95

Gln Phe Thr Ser Ala Gly Leu Glu Pro Val Glu Gly Met Tyr Val Met  
 100 105 110

Thr Asp Ala Gly Ile Ala Lys Ile Leu Lys Val Glu Glu Lys Thr Val  
 115 120 125

Arg Leu Asp Phe Asn His Pro Leu Ala Gly Lys Thr Ala Ile Phe Glu  
 130 135 140

Ile Glu Val Val Glu Ile Lys Lys Ala Gly Glu Ala  
 145 150 155

5  
 <210> 9  
 <211> 108  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 9

ES 2 603 589 T3

Met Gly Val Gln Val Glu Thr Ile Ser Pro Gly Asp Gly Arg Thr Phe  
 1 5 10 15  
 Pro Lys Arg Gly Gln Thr Cys Val Val His Tyr Thr Gly Met Leu Glu  
 20 25 30  
 Asp Gly Lys Lys Phe Asp Ser Ser Arg Asp Arg Asn Lys Pro Phe Lys  
 35 40 45  
 Phe Met Leu Gly Lys Gln Glu Val Ile Arg Gly Trp Glu Glu Gly Val  
 50 55 60  
 Ala Gln Met Ser Val Gly Gln Arg Ala Lys Leu Thr Ile Ser Pro Asp  
 65 70 75 80  
 Tyr Ala Tyr Gly Ala Thr Gly His Pro Gly Ile Ile Pro Pro His Ala  
 85 90 95  
 Thr Leu Val Phe Asp Val Glu Leu Leu Lys Leu Glu  
 100 105

<210> 10  
 <211> 129  
 <212> PRT  
 <213> *Arabidopsis thaliana*  
 <400> 10

5

Glu Thr Thr Ser Cys Glu Phe Ser Val Ser Pro Ser Gly Leu Ala Phe  
 1 5 10 15  
 Cys Asp Lys Val Val Gly Tyr Gly Pro Glu Ala Val Lys Gly Gln Leu  
 20 25 30  
 Ile Lys Ala His Tyr Val Gly Lys Leu Glu Asn Gly Lys Val Phe Asp  
 35 40 45  
 Ser Ser Tyr Asn Arg Gly Lys Pro Leu Thr Phe Arg Ile Gly Val Gly  
 50 55 60  
 Glu Val Ile Lys Gly Trp Asp Gln Gly Ile Leu Gly Ser Asp Gly Ile  
 65 70 75 80  
 Pro Pro Met Leu Thr Gly Gly Lys Arg Thr Leu Arg Ile Pro Pro Glu  
 85 90 95  
 Leu Ala Tyr Gly Asp Arg Gly Ala Gly Cys Lys Gly Gly Ser Cys Leu

10

100

105

110

Ile Pro Pro Ala Ser Val Leu Leu Phe Asp Ile Glu Tyr Ile Gly Lys  
 115 120 125

**Ala**

5 <210> 11  
 <211> 99  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> realización específica de fórmula I

15 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> En línea con la descripción de la fórmula I, Xaa representa un aminoácido que comprende una secuencia variable a mostrar por el polipéptido químérico

20 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (87)..(87)  
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 11

Met Arg Ser Gly Val Gln Val Glu Thr Ile Ser Pro Gly Asp Gly Arg  
 1 5 10 15

Thr Phe Pro Lys Arg Gly Gln Thr Ala Val Val His Tyr Thr Gly Met  
 20 25 30

Leu Glu Asp Gly Lys Lys Phe Asp Ser Ser Arg Asp Arg Asn Lys Pro  
 35 40 45

Phe Lys Phe Met Leu Gly Lys Gln Glu Val Ile Arg Gly Trp Glu Glu  
 50 55 60

Gly Val Ala Gln Met Ser Val Gly Gln Arg Ala Lys Leu Thr Ile Ser  
 65 70 75 80

Pro Asp Tyr Ala Tyr Gly Xaa Thr Leu Val Phe Asp Val Glu Leu Leu  
 85 90 95

Lys Leu Glu

25 <210> 12  
 <211> 93  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> realización específica de fórmula I

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> En línea con la descripción de la fórmula I, Xaa representa un aminoácido que comprende una secuencia variable a mostrar por el polipéptido quimérico  
 5

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (66)..(66)  
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural  
 10

<400> 12

	<b>Met</b>	<b>Arg</b>	<b>Ser</b>	<b>Lys</b>	<b>Val</b>	<b>Gly</b>	<b>Gln</b>	<b>Asp</b>	<b>Lys</b>	<b>Val</b>	<b>Val</b>	<b>Thr</b>	<b>Ile</b>	<b>Arg</b>	<b>Tyr</b>	<b>Thr</b>
	<b>1</b>				<b>5</b>					<b>10</b>					<b>15</b>	
	<b>Leu</b>	<b>Gln</b>	<b>Val</b>	<b>Glu</b>	<b>Gly</b>	<b>Glu</b>	<b>Val</b>	<b>Leu</b>	<b>Asp</b>	<b>Gln</b>	<b>Gly</b>	<b>Glu</b>	<b>Leu</b>	<b>Ser</b>	<b>Tyr</b>	<b>Leu</b>
				<b>20</b>					<b>25</b>					<b>30</b>		
	<b>His</b>	<b>Gly</b>	<b>His</b>	<b>Arg</b>	<b>Asn</b>	<b>Leu</b>	<b>Ile</b>	<b>Pro</b>	<b>Gly</b>	<b>Leu</b>	<b>Glu</b>	<b>Glu</b>	<b>Ala</b>	<b>Leu</b>	<b>Glu</b>	<b>Gly</b>
			<b>35</b>					<b>40</b>					<b>45</b>			
	<b>Arg</b>	<b>Glu</b>	<b>Glu</b>	<b>Gly</b>	<b>Glu</b>	<b>Ala</b>	<b>Phe</b>	<b>Gln</b>	<b>Ala</b>	<b>His</b>	<b>Val</b>	<b>Pro</b>	<b>Ala</b>	<b>Glu</b>	<b>Lys</b>	<b>Ala</b>
	<b>50</b>						<b>55</b>					<b>60</b>				
	<b>Tyr</b>	<b>Xaa</b>	<b>Gly</b>	<b>Lys</b>	<b>Asp</b>	<b>Leu</b>	<b>Asp</b>	<b>Phe</b>	<b>Gln</b>	<b>Val</b>	<b>Glu</b>	<b>Val</b>	<b>Val</b>	<b>Lys</b>	<b>Val</b>	<b>Arg</b>
	<b>65</b>					<b>70</b>					<b>75</b>					<b>80</b>
	<b>Glu</b>	<b>Ala</b>	<b>Thr</b>	<b>Pro</b>	<b>Glu</b>	<b>Glu</b>	<b>Leu</b>	<b>Leu</b>	<b>His</b>	<b>Gly</b>	<b>His</b>	<b>Ala</b>	<b>His</b>			
					<b>85</b>					<b>90</b>						

<210> 13  
 <211> 106  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 15

<220>  
 <223> realización específica de fórmula I  
 20

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> En línea con la descripción de la fórmula I, Xaa representa un aminoácido que comprende una secuencia variable a mostrar por el polipéptido quimérico  
 25

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (86)..(86)  
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural  
 30

<400> 13  
 35

ES 2 603 589 T3

Met Lys Val Glu Arg Gly Asp Phe Val Leu Phe Asn Tyr Val Gly Arg  
 1 5 10 15

Tyr Glu Asn Gly Glu Val Phe Asp Thr Ser Tyr Glu Ser Val Ala Arg  
 20 25 30

Glu Gln Gly Ile Phe Val Glu Glu Arg Glu Tyr Ser Pro Ile Gly Val  
 35 40 45

Thr Val Gly Ala Gly Glu Ile Ile Pro Gly Ile Glu Glu Ala Leu Leu  
 50 55 60

Gly Met Glu Leu Gly Glu Lys Lys Glu Val Val Val Pro Pro Glu Lys  
 65 70 75 80

Gly Tyr Gly Met Pro Xaa Ala Gly Lys Thr Ala Ile Phe Glu Ile Glu  
 85 90 95

Val Val Glu Ile Lys Lys Ala Gly Glu Ala  
 100 105

- 5 <210> 14
- <211> 45
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- 10 <220>
- <223> realización específica de fórmula I
- 15 <220>
- <221> misc\_feature
- <223> En línea con la descripción de la fórmula I, Xaa representa un aminoácido que comprende una secuencia variable a mostrar por el polipéptido quimérico
- 20 <220>
- <221> misc\_feature
- <222> (10)..(10)
- <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
- <400> 14

Gly Asp Arg Gly Ala Gly Cys Gly Ser Xaa Gly Ser Ser Cys Leu Ile  
 1 5 10 15

Pro Pro Ala Ser Val Leu Asp Phe Gln Val Glu Val Val Lys Val Arg  
 20 25 30

Glu Ala Thr Pro Glu Glu Leu Leu His Gly His Ala His  
 35 40 45

- 25 <210> 15
- <211> 131
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> realización específica de fórmula I

5 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> En línea con la descripción de la fórmula I, Xaa representa un aminoácido que comprende una secuencia variable a mostrar por el polipéptido quimérico

10 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (109)..(109)  
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

15 <400> 15

Glu Thr Thr Ser Cys Glu Phe Ser Val Ser Pro Ser Gly Leu Ala Phe  
 1 5 10 15

Cys Asp Lys Val Val Gly Tyr Gly Pro Glu Ala Val Lys Gly Gln Leu  
 20 25 30

Ile Lys Ala His Tyr Val Gly Lys Leu Glu Asn Gly Lys Val Phe Asp  
 35 40 45

Ser Ser Tyr Asn Arg Gly Lys Pro Leu Thr Phe Arg Ile Gly Val Gly  
 50 55 60

Glu Val Ile Lys Gly Trp Asp Gln Gly Ile Leu Gly Ser Asp Gly Ile  
 65 70 75 80

Pro Pro Met Leu Thr Gly Gly Lys Arg Thr Leu Arg Ile Pro Pro Glu  
 85 90 95

Leu Ala Tyr Gly Asp Arg Gly Ala Gly Cys Gly Ser Xaa Gly Ser Ser  
 100 105 110

Cys Leu Ile Pro Pro Ala Ser Val Leu Leu Phe Asp Ile Glu Tyr Ile  
 115 120 125

Gly Lys Ala  
 130

20 <210> 16  
 <211> 90  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

25 <220>  
 <223> realización específica de fórmula I

30 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> En línea con la descripción de la fórmula I, Xaa representa un aminoácido que comprende una secuencia variable a mostrar por el polipéptido quimérico

5 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (64)..(64)  
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural  
 <400> 16

**Met Lys Val Gly Gln Asp Lys Val Val Thr Ile Arg Tyr Thr Leu Gln**  
**1 5 10 15**

**Val Glu Gly Glu Val Leu Asp Gln Gly Glu Leu Ser Tyr Leu His Gly**  
**20 25 30**

**His Arg Asn Leu Ile Pro Gly Leu Glu Glu Ala Leu Glu Gly Arg Glu**  
**35 40 45**

**Glu Gly Glu Ala Phe Gln Ala His Val Pro Ala Glu Lys Ala Tyr Xaa**  
**50 55 60**

**Gly Lys Asp Leu Asp Phe Gln Val Glu Val Val Lys Val Arg Glu Ala**  
**65 70 75 80**

**Thr Pro Glu Glu Leu Leu His Gly His Ala**  
**85 90**

10 <210> 17  
 <211> 152  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

15 <220>  
 <223> realización específica de fórmula I

20 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> En línea con la descripción de la fórmula I, Xaa representa un aminoácido que comprende una secuencia variable a mostrar por el polipéptido quimérico

25 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (64)..(64)  
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

30 <400> 17

ES 2 603 589 T3

Met Lys Val Gly Gln Asp Lys Val Val Thr Ile Arg Tyr Thr Leu Gln  
 1 5 10 15

Val Glu Gly Glu Val Leu Asp Gln Gly Glu Leu Ser Tyr Leu His Gly  
 20 25 30

His Arg Asn Leu Ile Pro Gly Leu Glu Glu Ala Leu Glu Gly Arg Glu  
 35 40 45

Glu Gly Glu Ala Phe Gln Ala His Val Pro Ala Glu Lys Ala Tyr Xaa  
 50 55 60

Gly Lys Asp Leu Asp Phe Gln Val Glu Val Val Lys Val Arg Glu Ala  
 65 70 75 80

Thr Pro Glu Glu Leu Leu His Gly His Ala Gly Ala Gly Ser Gly Ala  
 85 90 95

Gly Ala Gly Ser Gly Ala Gly Ala Gly Ser Pro Ala Ala Val Pro Ala  
 100 105 110

Ala Val Pro Ala Ala Val Gly Glu Gly Glu Gly Glu Phe Ser Thr Pro  
 115 120 125

Val Trp Ile Ser Gln Ala Gln Gly Ile Arg Ala Gly Pro Gln Arg Leu  
 130 135 140

Ser Asn Pro Gln Pro Met Arg Gly  
 145 150

5 <210> 18  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Cebador

<400> 18  
 cgacagtggtg gcgaggatc c 21

15 <210> 19  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Cebador

<400> 19  
 gggagctcgc aggagacgta g 21

25 <210> 20  
 <211> 719

<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

5 <220>  
<223> Construcción de ADN

<400> 20

```

ggtgatgtcg gcgatatagg cgccagcaac cgcacctgtg ggcgcggtga tgccggccac      60
gatgcgtccg gcgtagagga tcgtgatctc gatcccgga aattaatacg actcactata      120
gggagaccac aacggtttcc ctctagaaat aattttgttt aactttaaga aggagatata      180
catatgaaag tgggccagga taaagttgtc accattcgtt ataccctgca ggttgaaggt      240
gaagtgctgg atcagggcga actcagctat ttacatggtc accgcaacct gattccgggc      300
ctggaggaag cgctggaagg tcgcgaggaa ggcgaagcat ttcaggcgca tgtgccggca      360
gagaaagcgt atggcgccgg atccccgcag cctctggtgt ataacaatt aacctttcag      420
ctggaaccga accctcatac caaagggagc tccggcaaag atttagattt tcaggtggaa      480
gtggttaaag tgcgcgaagc aaccccgag gaactgttac atggccacgc gggcgctggc      540
tctggagctg gtgcaggtc tgggtctggc gcaggttctc cagcagcggg gccggcagca      600
gttcctgctg cgggtggcga aggcgagggg gagttcagta cgccagtttg gatctcgcag      660
gcacagggca tccgtgctgg tcctcagagg ctttccaacc cccagcctat gcggggggtt      719
    
```

10 <210> 21  
<211> 178  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

15 <220>  
<223> Secuencia de aminoácidos codificada por la construcción de ADN

20 <400> 21

```

Met Lys Val Gly Gln Asp Lys Val Val Thr Ile Arg Tyr Thr Leu Gln
 1              5              10              15

Val Glu Gly Glu Val Leu Asp Gln Gly Glu Leu Ser Tyr Leu His Gly
 20              25              30

His Arg Asn Leu Ile Pro Gly Leu Glu Glu Ala Leu Glu Gly Arg Glu
 35              40              45

Glu Gly Glu Ala Phe Gln Ala His Val Pro Ala Glu Lys Ala Tyr Gly
 50              55              60
    
```

ES 2 603 589 T3

Ala Gly Ser Pro Gln Pro Leu Val Tyr Asn Lys Leu Thr Phe Gln Leu  
65 70 75 80

Glu Pro Asn Pro His Thr Lys Gly Ser Ser Gly Lys Asp Leu Asp Phe  
85 90 95

Gln Val Glu Val Val Lys Val Arg Glu Ala Thr Pro Glu Glu Leu Leu  
100 105 110

His Gly His Ala Gly Ala Gly Ser Gly Ala Gly Ala Gly Ser Gly Ala  
115 120 125

Gly Ala Gly Ser Pro Ala Ala Val Pro Ala Ala Val Pro Ala Ala Val  
130 135 140

Gly Glu Gly Glu Gly Glu Phe Ser Thr Pro Val Trp Ile Ser Gln Ala  
145 150 155 160

Gln Gly Ile Arg Ala Gly Pro Gln Arg Leu Ser Asn Pro Gln Pro Met  
165 170 175

Arg Gly

5 <210> 22  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> Secuencia de aminoácido de horquilla beta  
<400> 22

Pro Gln Pro Leu Val Tyr Asn Lys Leu Thr Phe Gln Leu Glu Pro Asn  
1 5 10 15

Pro His Thr Lys  
20

15 <210> 23  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

20 <220>  
<223> Cebador

<400> 23  
aaccgccgca taggctgggg 20

25 <210> 24  
<211> 23  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

ES 2 603 589 T3

<220>  
<223> Cebador

5 <400> 24  
ggtgatgtcg gcgatatagg cgc 23

<210> 25  
<211> 44  
10 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Cebador

15 <400> 25  
cgaaattaat acgactcact atagggagac cacaacggtt tccc 44

<210> 26  
<211> 66  
20 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Cebador

25 <400> 26  
  
gggagaccac aacggttccc ctctagaat aatttgttt aacttaaga aggagatata 60

catatg 66

30 <210> 27  
<211> 47  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

35 <220>  
<223> Cebador

<400> 27  
40 aacccccga taggtgggg gttgaaagc ctctaggac cagcacg 47

<210> 28  
<211> 36  
<212> ADN  
45 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Cebador

50 <400> 28  
ggaaagcctc ttaggaccag cacgcatgcc ctgtgc 36

<210> 29  
<211> 28  
55 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Cebador

60 <400> 29  
cgtcacacga cagtggtggc caggatcc 28

<210> 30  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 5  
 <220>  
 <223> Cebador  
 <400> 30  
 10 cgtcacaagc tacgtctcct gcgagctccc 30  
 <210> 31  
 <211> 82  
 <212> ADN  
 15 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Secuencia de ADN variable  
 20 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (22)..(60)  
 <223> n es a, c, g o t  
 25 <400> 31  
**cgacagtggtg ggcgaggatc cnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 60**  
**gggagctcgc aggagacgta gc 82**  
 <210> 32  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 30  
 <220>  
 <223> Cebador  
 <400> 32  
 ggtgatgtcg gcgatatagg cgc 23  
 40 <210> 33  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 45 <220>  
 <223> Cebador  
 <400> 33  
 50 ccccagccta tgcgggggtt 20  
 <210> 34  
 <211> 698  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 55 <220>  
 <223> Construcción de ADN de SlyD-FKBP de *Thermus thermophilus*  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (385)..(423)  
 <223> n es a, c, g o t  
 60

ES 2 603 589 T3

<400> 34

```

    ggtgatgtcg gcgatatagg cgccagcaac cgcacctgtg ggcgccgtga tgccggccac      60
    gatgcgtccg gcgtagagga tcgtgatctc gatcccgcga aattaatacg actcactata      120
    gggagaccac aacggtttcc ctctagaaat aattttgttt aactttaaga aggagatata      180
    catatgaaag tgggccagga taaagttgtc accattcgct ataccctgca ggttgaaggt      240
    gaagtgctgg atcagggcga actcagctat ttacatggtc accgcaacct gattccgggc      300
    ctggaggaag cgctggaagg tcgcgaggaa ggcgaagcat ttcaggcgca tgtgccggca      360
    gagaaagcgt atggcgccgg atccnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn      420
    nnnngggagct ccggcaaaga tttagatttt caggtggaag tggttaaagt gcgcgaagca      480
    accccggagg aactgttaca tggccacgcg ggcgctggct ctggagctgg tgcaggctct      540
    ggtgctggcg caggttctcc agcagcggtg ccggcagcag ttctgctgc ggtgggcgaa      600
    ggcgagggag agttcagtac gccagtttgg atctcgcagg cacagggcat ccgtgctggt      660
    cctcagaggc tttccaacct ccagcctatg cgggggtt      698
  
```

- 5     <210> 35
- <211> 142
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
  
- 10    <220>
- <223> realización específica de fórmula I
  
- <220>
- <221> MISC\_FEATURE
- 15    <223> En línea con la descripción de la fórmula I, Xaa representa un aminoácido que comprende una secuencia variable a mostrar por el polipéptido químérico
  
- <220>
- <221> misc\_feature
- 20    <222> (70)..(82)
- <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
  
- <400> 35

ES 2 603 589 T3

Met Arg Ser Lys Val Gly Gln Asp Lys Val Val Thr Ile Arg Tyr Thr  
 1 5 10 15

Leu Gln Val Glu Gly Glu Val Leu Asp Gln Gly Glu Leu Ser Tyr Leu  
 20 25 30

His Gly His Arg Asn Leu Ile Pro Gly Leu Glu Glu Ala Leu Glu Gly  
 35 40 45

Arg Glu Glu Gly Glu Ala Phe Gln Ala His Val Pro Ala Glu Lys Ala  
 50 55 60

Tyr Gly Ala Gly Ser Xaa  
 65 70 75 80

Xaa Xaa Gly Ser Ser Gly Lys Asp Leu Asp Phe Gln Val Glu Val Val  
 85 90 95

Lys Val Arg Glu Ala Thr Pro Glu Glu Leu Leu His Gly His Gly Gly  
 100 105 110

Ala Ala Ala Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp  
 115 120 125

His Glu Gly Ser Arg Lys His His His His His His His His His  
 130 135 140

5 <210> 36  
 <211> 144  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Secuencia de aminoácidos

<400> 36

ES 2 603 589 T3

Met Arg Ser Lys Val Gly Gln Asp Lys Val Val Thr Ile Arg Tyr Thr  
 1 5 10 15

Leu Gln Val Glu Gly Glu Val Leu Asp Gln Gly Glu Leu Ser Tyr Leu  
 20 25 30

His Gly His Arg Asn Leu Ile Pro Gly Leu Glu Glu Ala Leu Glu Gly  
 35 40 45

Arg Glu Glu Gly Glu Ala Phe Gln Ala His Val Pro Ala Glu Lys Ala  
 50 55 60

Tyr Gly Ala Gly Ser Trp Lys Pro His Phe Asn Leu His Leu Leu Tyr  
 65 70 75 80

Leu Ile Gly Ser Ser Gly Lys Asp Leu Asp Phe Gln Val Glu Val Val  
 85 90 95

Lys Val Arg Glu Ala Thr Pro Glu Glu Leu Leu His Gly His Ala His  
 100 105 110

Gly Gly Ala Ala Ala Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile  
 115 120 125

Glu Trp His Glu Gly Ser Arg Lys His His His His His His His His  
 130 135 140

5 <210> 37  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Secuencia de aminoácidos  
 <400> 37

Gly Ala Gly Ser Trp Lys Pro His Phe Asn Leu His Leu Leu Tyr Leu  
 1 5 10 15

Ile Gly Ser Ser Gly  
 20

15 <210> 38  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Secuencia de aminoácidos  
 <400> 38

ES 2 603 589 T3

Gly Ala Gly Ser Trp Lys Pro His Phe Asn Leu His Leu Leu Tyr Leu  
 1 5 10 15

Ile Gly Ser Ser Gly  
 20

5 <210> 39  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Secuencia de aminoácidos  
 <400> 39

Gly Ala Gly Ser Thr Tyr Tyr Lys Ile His Val Leu Trp Leu Ile Tyr  
 1 5 10 15

Val Gly Ser Ser Gly  
 20

15 <210> 40  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Secuencia de aminoácidos  
 <400> 40

Gly Ala Gly Ser Trp Lys Pro His Phe Asn Leu His Leu Leu Tyr Leu  
 1 5 10 15

Ile Gly Ser Ser Gly  
 20

25 <210> 41  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Secuencia de aminoácidos  
 35 <400> 41

Gly Ala Gly Ser Tyr Tyr Val Leu Ile Thr Asp Asn Leu Val Tyr Phe  
 1 5 10 15

Gly Gly Ser Ser Gly  
 20

40 <210> 42  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Secuencia de aminoácidos

5 <400> 42

Gly Gly Gly Ser  
1

10 <210> 43  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

15 <220>  
<223> Secuencia de aminoácidos

<400> 43

Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly Ser Ser Ser Arg Arg Ala Pro Gln Thr  
1 5 10 15

Gly

20 <210> 44  
<211> 130  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

25 <220>  
<223> polipéptido quimérico

30 <400> 44

ES 2 603 589 T3

Met Arg Gly Ser Lys Val Gly Gln Asp Lys Val Val Thr Ile Arg Tyr  
 1 5 10 15

Thr Leu Gln Val Glu Gly Glu Val Leu Asp Gln Gly Glu Leu Ser Tyr  
 20 25 30

Leu His Gly His Arg Asn Leu Ile Pro Gly Leu Glu Glu Ala Leu Glu  
 35 40 45

Gly Arg Glu Glu Gly Glu Ala Phe Gln Ala His Val Pro Ala Glu Lys  
 50 55 60

Ala Tyr Gly Pro His Gly Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly Ser Ser Ser  
 65 70 75 80

Arg Arg Ala Pro Gln Thr Gly Gly Ala Gly Lys Asp Leu Asp Phe Gln  
 85 90 95

Val Glu Val Val Lys Val Arg Glu Ala Thr Pro Glu Glu Leu Leu His  
 100 105 110

Gly His Ala His Gly Gly Gly Ser Arg Lys His His His His His His  
 115 120 125

His His  
 130

- <210> 45
- <211> 161
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> polipéptido quimérico
- <400> 45

ES 2 603 589 T3

Met Lys Val Gly Gln Asp Lys Val Val Thr Ile Arg Tyr Thr Leu Gln  
 1 5 10 15

Val Glu Gly Glu Val Leu Asp Gln Gly Glu Leu Ser Tyr Leu His Gly  
 20 25 30

His Arg Asn Leu Ile Pro Gly Leu Glu Glu Ala Leu Glu Gly Arg Glu  
 35 40 45

Glu Gly Glu Ala Phe Gln Ala His Val Pro Ala Glu Lys Ala Tyr Gly  
 50 55 60

Pro His Asp Pro Glu Gly Val Gln Val Val Pro Leu Ser Ala Phe Pro  
 65 70 75 80

Glu Asp Ala Glu Val Val Pro Gly Ala Gln Phe Tyr Ala Gln Asp Met  
 85 90 95

Glu Gly Asn Pro Met Pro Leu Thr Val Val Ala Val Glu Gly Glu Glu  
 100 105 110

Val Thr Val Asp Phe Asn His Pro Leu Ala Gly Lys Asp Leu Asp Phe  
 115 120 125

Gln Val Glu Val Val Lys Val Arg Glu Ala Thr Pro Glu Glu Leu Leu  
 130 135 140

His Gly His Ala His Gly Gly Gly Ser Arg Lys His His His His His  
 145 150 155 160

His

<210> 46  
 <211> 119  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> polipéptido quimérico

10

<400> 46

ES 2 603 589 T3

Met Arg Gly Ser Lys Val Gly Gln Asp Lys Val Val Thr Ile Arg Tyr  
 1 5 10 15

Thr Leu Gln Val Glu Gly Glu Val Leu Asp Gln Gly Glu Leu Ser Tyr  
 20 25 30

Leu His Gly His Arg Asn Leu Ile Pro Gly Leu Glu Glu Ala Leu Glu  
 35 40 45

Gly Arg Glu Glu Gly Glu Ala Phe Gln Ala His Val Pro Ala Glu Lys  
 50 55 60

Ala Tyr Gly Pro His Gly Ala Gly Ser Gly Ser Ser Gly Ala Gly Lys  
 65 70 75 80

Asp Leu Asp Phe Gln Val Glu Val Val Lys Val Arg Glu Ala Thr Pro  
 85 90 95

Glu Glu Leu Leu His Gly His Ala His Gly Gly Gly Ser Arg Lys His  
 100 105 110

His His His His His His His  
 115

<210> 47  
 <211> 168  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> polipéptido quimérico

<400> 47

Met Lys Val Glu Arg Gly Asp Phe Val Leu Phe Asn Tyr Val Gly Arg  
 1 5 10 15

Tyr Glu Asn Gly Glu Val Phe Asp Thr Ser Tyr Glu Ser Val Ala Arg  
 20 25 30

Glu Gln Gly Ile Phe Val Glu Glu Arg Glu Tyr Ser Pro Ile Gly Val  
 35 40 45

Thr Val Gly Ala Gly Glu Ile Ile Pro Gly Ile Glu Glu Ala Leu Leu  
 50 55 60

Gly Met Glu Leu Gly Glu Lys Lys Glu Val Val Val Pro Pro Glu Lys  
 65 70 75 80

ES 2 603 589 T3

Gly Tyr Gly Met Pro Arg Glu Asp Leu Ile Val Pro Val Pro Ile Glu  
85 90 95

Gln Phe Thr Ser Ala Gly Leu Glu Pro Val Glu Gly Met Tyr Val Met  
100 105 110

Thr Asp Ala Gly Ile Ala Lys Ile Leu Lys Val Glu Glu Lys Thr Val  
115 120 125

Arg Leu Asp Phe Asn His Pro Leu Ala Gly Lys Thr Ala Ile Phe Glu  
130 135 140

Ile Glu Val Val Glu Ile Lys Lys Ala Gly Glu Ala Gly Gly Gly Ser  
145 150 155 160

Arg Lys His His His His His His  
165

<210> 48

<211> 128

5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> polipéptido quimérico

10

<400> 48

ES 2 603 589 T3

Met Lys Val Glu Arg Gly Asp Phe Val Leu Phe Asn Tyr Val Gly Arg  
 1 5 10 15

Tyr Glu Asn Gly Glu Val Phe Asp Thr Ser Tyr Glu Ser Val Ala Arg  
 20 25 30

Glu Gln Gly Ile Phe Val Glu Glu Arg Glu Tyr Ser Pro Ile Gly Val  
 35 40 45

Thr Val Gly Ala Gly Glu Ile Ile Pro Gly Ile Glu Glu Ala Leu Leu  
 50 55 60

Gly Met Glu Leu Gly Glu Lys Lys Glu Val Val Val Pro Pro Glu Lys  
 65 70 75 80

Gly Tyr Gly Met Pro Gly Ser Arg Val Ser Arg Arg Ser Arg Gly Gly  
 85 90 95

Ala Gly Lys Thr Ala Ile Phe Glu Ile Glu Val Val Glu Ile Lys Lys  
 100 105 110

Ala Gly Glu Ala Gly Gly Gly Ser Arg Lys His His His His His His

115

120

125

- <210> 49
- <211> 122
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> polipéptido quimérico
- <400> 49

ES 2 603 589 T3

Met Lys Val Gly Gln Asp Lys Val Val Thr Ile Arg Tyr Thr Leu Gln  
 1 5 10 15

Val Glu Gly Glu Val Leu Asp Gln Gly Glu Leu Ser Tyr Leu His Gly  
 20 25 30

His Arg Asn Leu Ile Pro Gly Leu Glu Glu Ala Leu Glu Gly Arg Glu  
 35 40 45

Glu Gly Glu Ala Phe Gln Ala His Val Pro Ala Glu Lys Ala Tyr Gly  
 50 55 60

Pro His Gly Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly Ser Ser Ser Arg Arg Ala  
 65 70 75 80

Pro Gln Thr Gly Gly Ala Gly Lys Asp Leu Asp Phe Gln Val Glu Val  
 85 90 95

Val Lys Val Arg Glu Ala Thr Pro Glu Glu Leu Leu His Gly His Ala  
 100 105 110

His Pro Ser Gly His His His His His His  
 115 120

<210> 50  
 <211> 166  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> polipéptido quimérico

<400> 50

Met Arg Gly Ser Lys Val Gly Gln Asp Lys Val Val Thr Ile Arg Tyr  
 1 5 10 15

Thr Leu Gln Val Glu Gly Glu Val Leu Asp Gln Gly Glu Leu Ser Tyr  
 20 25 30

5

10

ES 2 603 589 T3

Leu His Gly His Arg Asn Leu Ile Pro Gly Leu Glu Glu Ala Leu Glu  
 35 40 45

Gly Arg Glu Glu Gly Glu Ala Phe Gln Ala His Val Pro Ala Glu Lys  
 50 55 60

Ala Tyr Gly Pro His Asp Pro Glu Gly Val Gln Val Val Pro Leu Ser  
 65 70 75 80

Ala Phe Pro Glu Asp Ala Glu Val Val Pro Gly Ala Gln Phe Tyr Ala  
 85 90 95

Gln Asp Met Glu Gly Asn Pro Met Pro Leu Thr Val Val Ala Val Glu  
 100 105 110

Gly Glu Glu Val Thr Val Asp Phe Asn His Pro Leu Ala Gly Lys Asp  
 115 120 125

Leu Asp Phe Gln Val Glu Val Val Lys Val Arg Glu Ala Thr Pro Glu  
 130 135 140

Glu Leu Leu His Gly His Ala His Gly Gly Gly Ser Arg Lys His His  
 145 150 155 160

His His His His His His  
 165

- <210> 51
- <211> 12
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Realización específica de etiqueta de histidina
- <400> 51

Gly Ser Arg Lys His His His His His His His His His  
 1 5 10

## REIVINDICACIONES

1. Una composición de moléculas de ácido nucleico (ARN y/o ADN) que codifican una población de especies de polipéptido quimérico, en la que cada molécula de ácido nucleico codifica una especie de polipéptido quimérico de acuerdo con la fórmula I



en la que

X es una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia variable, S<sub>2</sub> y S<sub>1</sub> son secuencias de aminoácidos no variables y no solapantes obtenidas a partir de (i) un polipéptido con actividad de peptidil-prolil cis/trans-isomerasa (actividad de PPIasa) o a partir de (ii) un polipéptido de la familia del dominio de plegamiento de FKBP,

- entre dos aminoácidos representa un enlace peptídico, y

X está insertado en el lugar del dominio de inserción de Flap (dominio de IF) del polipéptido de (i) o del polipéptido de (ii).

2. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, en la que X comprende una secuencia de aminoácidos de 5 a 500 restos.

3. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, en la que X comprende una secuencia de aminoácidos de 5 a 75 restos, de forma específica de 10 a 70 restos, de forma más específica de 10 a 30 restos, de forma más específica de 10 a 20 restos, de forma más específica 12, 13, 14, 15 o 16 restos.

4. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que X está formado de acuerdo con la fórmula II



en la que

O es una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia variable,

U y Z se seleccionan independientemente entre sí, en la que cualquiera está presente o ausente y, si estuviera presente, cada uno de U y/o Z es una secuencia de aminoácidos no variable que comprende de 1 a 10 restos, y

U, si estuviera presente, se une con un enlace peptídico a S<sub>2</sub>, y Z, si estuviera presente, se une con un enlace peptídico a S<sub>1</sub>.

5. La composición de acuerdo con la reivindicación 4, en la que cada uno de U y/o Z es una secuencia de aminoácidos de 1 a 5 restos, y en particular de 4 restos.

6. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4 y 5, en la que la secuencia de aminoácidos de O está formada por un subconjunto de los restos de aminoácidos de origen natural.

7. La composición de acuerdo con la reivindicación 6, en la que cada resto de la secuencia de aminoácidos de O se selecciona independientemente entre el listado de restos de aminoácidos que consiste en Y, F, L, P, D, V, R, Q, S, I, E, G, W, A, H, T, N, K, y M.

8. La composición de acuerdo con la reivindicación 7, en la que, en la población de especies de polipéptido quimérico, la frecuencia relativa media de aparición de un resto de aminoácido en particular en la secuencia de aminoácidos de O es de un 8,5 % a un 11,5 % para Y, de un 8,5 % a un 11,5 % para F, de un 8,5 % a un 11,5 % para L, de un 5 % a un 8 % para P, de un 4,5 % a un 7,5 % para D, de un 4,5 % a un 7,5 % para V, de un 4,5 % a un 7,5 % para R, de un 4 % a un 7 % para Q, de un 4 % a un 7 % para S, de un 3,5 % a un 6,5 % para I, de un 3 % a un 6 % para E, de un 3 % a un 6 % para G, de un 3 % a un 6 % para W, de un 3 % a un 6 % para A, de un 2,5 % a un 5,5 % para H, de un 2 % a un 5 % para T, de un 1 % a un 4 % para N, de un 0,5 % a un 3,5 % para K, y de un 0,5 % a un 2,5 % para M.

9. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la que el X codificado es cualquiera de SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5.

10. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en la que las secuencias de aminoácidos codificados de S<sub>2</sub> y S<sub>1</sub> son fragmentos de un polipéptido obtenido a partir de *Thermus thermophilus*.

11. Uso, en un sistema de traducción *in vitro*, de una composición de moléculas de ARN que codifican una población de especies de polipéptidos quiméricos, estando la composición especificada de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, para presentar miembros o miembros emergentes de la población codificada de especies de polipéptidos quiméricos en complejos ternarios, en la que cada complejo ternario comprende

una molécula de ARN de la composición de moléculas de ARN como ARNm, y un ribosoma funcional.

5 12. Uso, en un sistema de transcripción/traducción *in vitro*, de una composición de moléculas de ADN y ARN que codifican una población de especies de polipéptidos quiméricos, estando la composición especificada de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, para presentar miembros o miembros emergentes de la población codificada de especies de polipéptidos quiméricos en complejos ternarios, en la que cada complejo ternario comprende

10 una molécula de ARN de la composición de moléculas de ARN como ARNm, y un ribosoma funcional.

13. Una composición que comprende una población de complejos ternarios, comprendiendo cada complejo ternario un ARNm y un ribosoma funcional, comprendiendo los ARNm de la población de complejos ternarios una composición de moléculas de ARN que codifican una población de especies de polipéptidos quiméricos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en la que cada complejo ternario presenta un miembro o miembro emergente de una especie codificada de polipéptidos quiméricos.

14. Un método para identificar una secuencia de aminoácidos de un dominio X que se une a una diana predeterminada, comprendiendo el método las etapas de

20 (1) proporcionar, como los ARNm, una composición de moléculas de ARN que codifican una población de especies de polipéptidos quiméricos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10;

25 (2) poner en contacto los ARNm de la etapa (1) con un sistema de traducción *in vitro* y traducir los ARNm, y formar una composición que comprende una población de complejos ternarios, comprendiendo cada complejo ternario un ARNm y un ribosoma funcional, en la que cada complejo ternario presenta un miembro emergente de una especie codificada de polipéptidos quiméricos;

30 (3) poner en contacto los complejos ternarios obtenidos en la etapa (2) con la diana predeterminada en condiciones de unión acuosas capaces de mantener intactos los complejos ternarios y adecuadas para la unión no covalente específica de miembros emergentes con respecto a la diana, formando de ese modo una mezcla de complejos ternarios no unidos y unidos, en el que los complejos ternarios unidos comprenden miembros emergentes de especies de polipéptidos quiméricos, estando los miembros emergentes unidos a la diana;

(4) separar los complejos ternarios intactos unidos a la diana de los complejos ternarios no unidos lavando los complejos ternarios intactos unidos con una solución de lavado y retirando los complejos ternarios no unidos;

35 (5) disociar los complejos ternarios unidos a diana obtenidos en la etapa (4), y sintetizar los ADNc a partir del ARNm de los complejos ternarios disociados;

(6) determinar, en un ADNc obtenido en la etapa (5), la secuencia de ácidos nucleicos que codifica el dominio X, y deducir a partir de la misma la secuencia de aminoácidos de X, identificando de ese modo la secuencia de aminoácidos de un dominio X que se une a la diana predeterminada.

40 15. Un método para producir un polipéptido restringido, siendo el polipéptido restringido un aglutinante específico de una diana predeterminada, comprendiendo el método las etapas de

45 (1) identificar, de acuerdo con un método de acuerdo con la reivindicación 14, una secuencia de aminoácidos de un dominio X que se une a la diana predeterminada, en la que el dominio X se identifica como un dominio que sustituye al dominio de IF en (i) un polipéptido con actividad de peptidil-prolil cis/trans-isomerasa (actividad de PPlasa) o (ii) un polipéptido de la familia del dominio de plegamiento de FKBP;

(2) proporcionar un polipéptido lineal que comprende la secuencia de aminoácidos del dominio X identificada en la etapa (1);

50 (3) conectar el extremo N-terminal y el extremo C-terminal del polipéptido de la etapa (2), en el que la distancia del extremo N-terminal y el extremo C-terminal conectados del polipéptido imita la distancia del extremo N-terminal y el extremo C-terminal conectados del dominio de IF, de (i) el polipéptido con actividad de peptidil-prolil cis/trans-isomerasa (actividad de PPlasa) o (ii) el polipéptido de la familia del dominio de plegamiento de FKBP; produciendo de ese modo el polipéptido restringido, siendo el polipéptido restringido un aglutinante específico de la diana predeterminada.

55

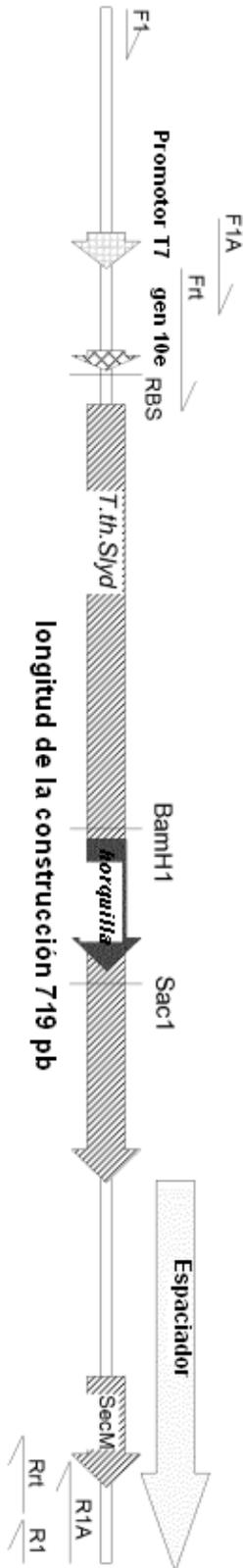
Fig. 1

Llb			Llb1		
Nr.	Aminoácido	%	Nr.	Aminoácido	%
1	F	10	1	Y	11
2	I	10	2	L	11
3	L	9	3	F	10
4	Y	8	4	S	6
5	W	8	5	D	6
6	S	5	6	G	6
7	D	5	7	R	6
8	G	5	8	E	6
9	P	5	9	V	5
10	R	5	10	A	5
11	E	5	11	H	5
12	V	4	12	K	5
13	A	4	13	P	5
14	H	4	14	N	4
15	N	3	15	T	4
16	K	3	16	Q	4
17	T	3	17	M	1
18	Q	3	18	C	0
19	M	1	19	I	0
20	C	0	20	W	0
21	parada	0	21	parada	0

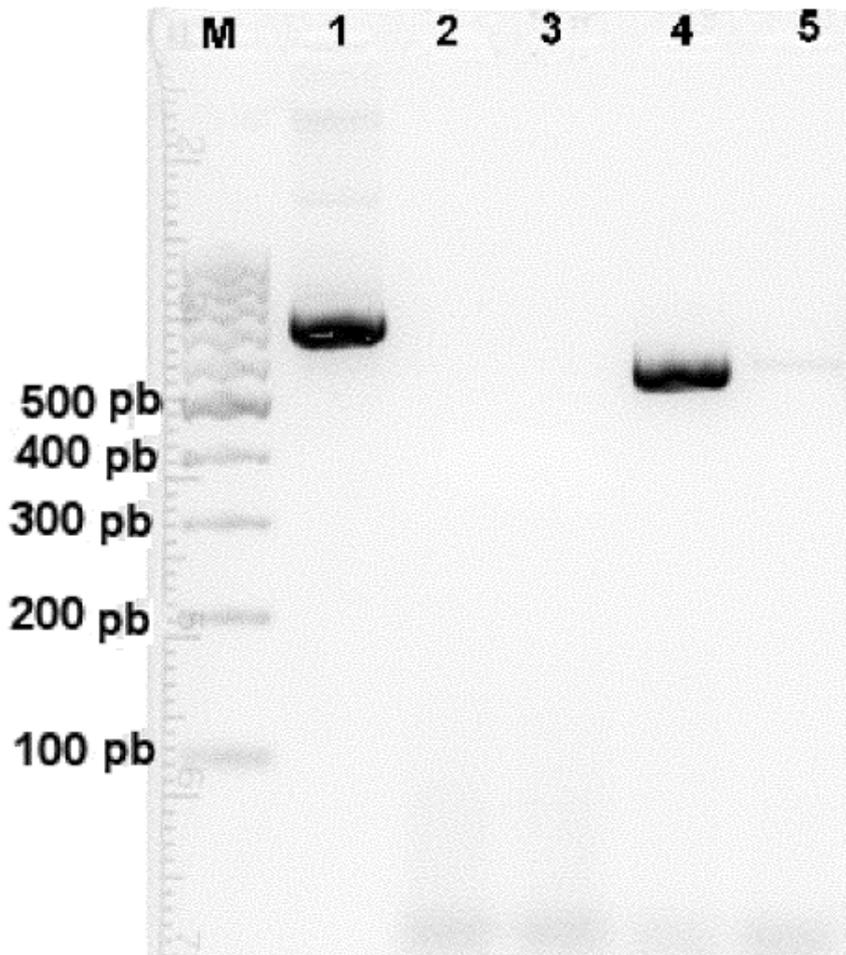
Fig. 2

parte n.º	codón	PM	RF	Lib	AA	proporción	1,5 ml CH <sub>3</sub> CN	Lib 1	AA	proporción	1,4 ml CH <sub>3</sub> CN
13-1032-90	ATG	1780,5	1,3	1	<b>M</b>	1	3,47	1	<b>M</b>	1	3,24
13-1001-90	AAC	1887,5	1	2	<b>N</b>	3	8,49	2	<b>N</b>	4	10,57
13-1233-90	GTT	1667,5	1,9	3	<b>V</b>	4	19,01	3	<b>V</b>	5	22,18
13-1301-90	TAC	1774,5	1,6	4	<b>Y</b>	8	34,07	4	<b>Y</b>	11	43,72
13-1213-90	GCT	1756,5	1,5	5	<b>A</b>	4	15,81	5	<b>A</b>	5	18,44
13-1313-90	TCT	1661,4	1,3	6	<b>S</b>	5	16,20	6	<b>S</b>	6	18,14
13-1201-90	GAC	1869,5	1,6	7	<b>D</b>	5	22,43	7	<b>D</b>	6	25,13
13-1331-90	TTC	1661,4	1,3	8	<b>F</b>	10	32,40	8	<b>F</b>	10	30,24
13-1223-90	GGT	1762,5	1,1	9	<b>G</b>	5	14,54	9	<b>G</b>	6	16,29
13-1103-90	CAT	1774,5	1,3	10	<b>H</b>	4	13,84	10	<b>H</b>	5	16,15
13-1000-90	AAA	1911,5	1,1	11	<b>K</b>	3	9,46	11	<b>K</b>	5	14,72
13-1132-90	CTG	1756,5	1,2	12	<b>L</b>	9	28,46	12	<b>L</b>	11	32,46
13-1031-90	ATC	1774,5	1,5	13	<b>1</b>	10	39,93	13	<b>1</b>	0	0,00
13-1112-90	CCG	1845,5	1,8	14	<b>P</b>	5	24,91	14	<b>P</b>	5	23,25
13-1013-90	ACT	1774,5	1,6	15	<b>T</b>	3	12,78	15	<b>T</b>	4	15,90
13-1123-90	CGT	1756,5	1,4	16	<b>R</b>	5	18,44	16	<b>R</b>	6	20,66
13-1200-90	GAA	1893,5	1,4	17	<b>E</b>	5	19,88	17	<b>E</b>	6	22,27
13-1322-90	TGG	1762,5	1,1	18	<b>W</b>	8	23,27	18	<b>W</b>	0	0,00
13-1102-90	CAG	1869,5	2	19	<b>O</b>	3	16,83	19	<b>O</b>	4	20,94
					%	100			%	100	

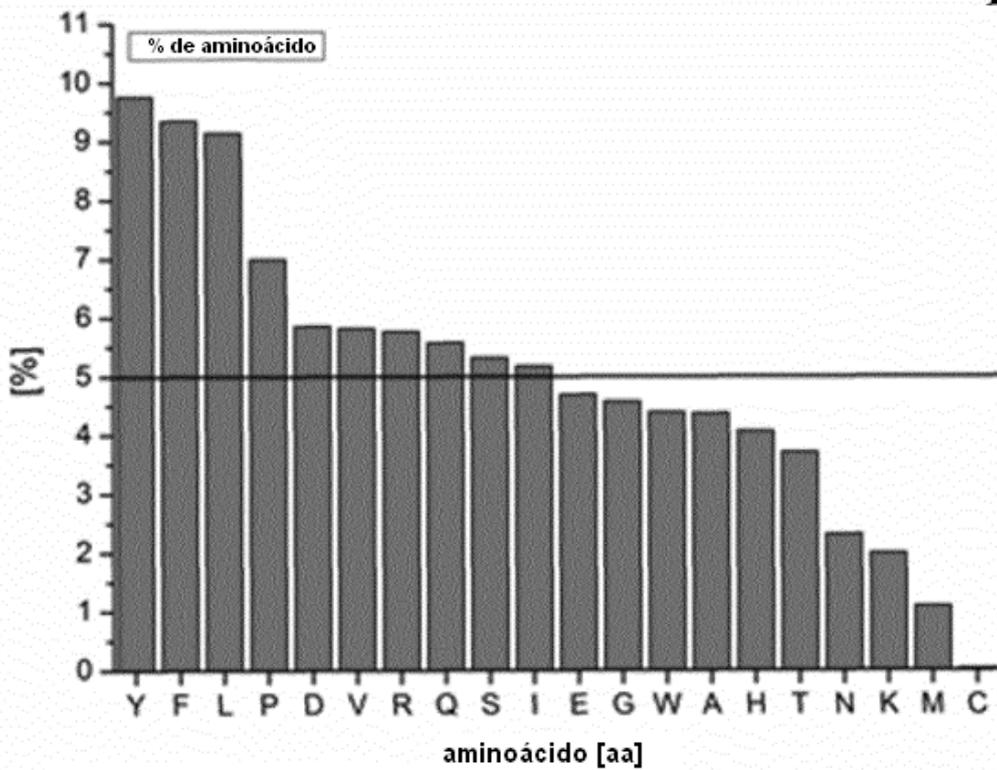
Fig. 3



**Fig. 4**

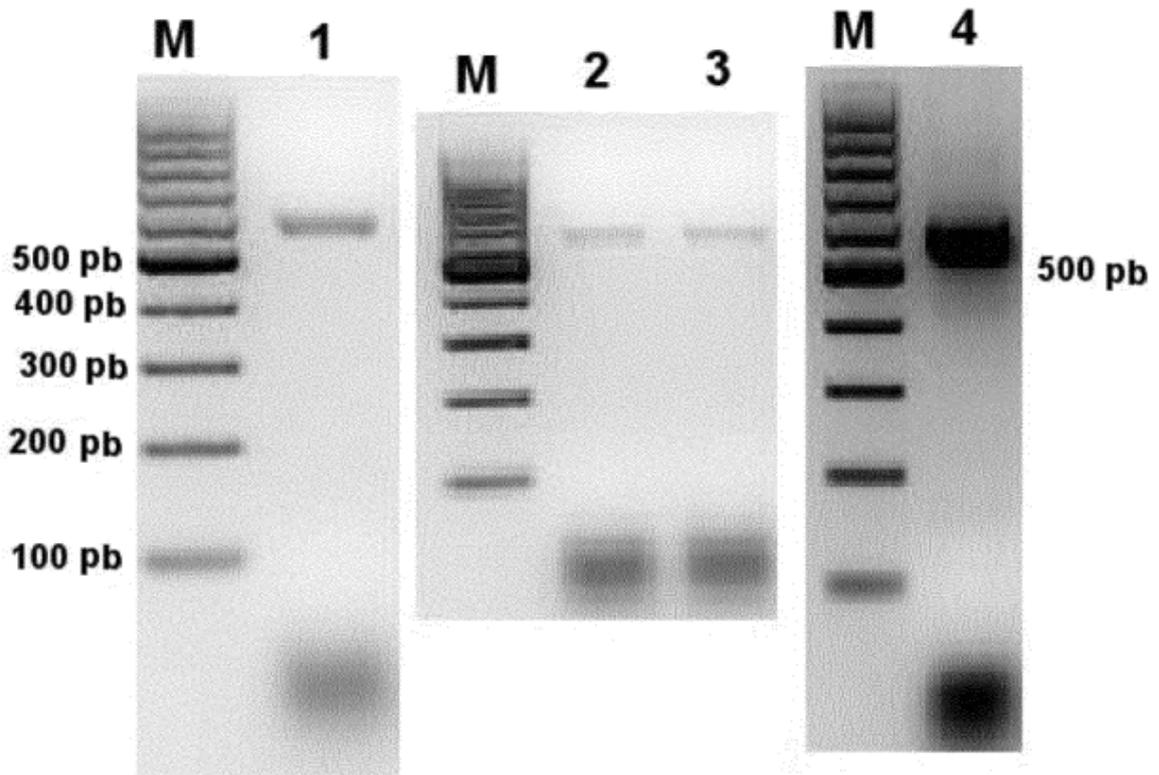


**Fig. 5**

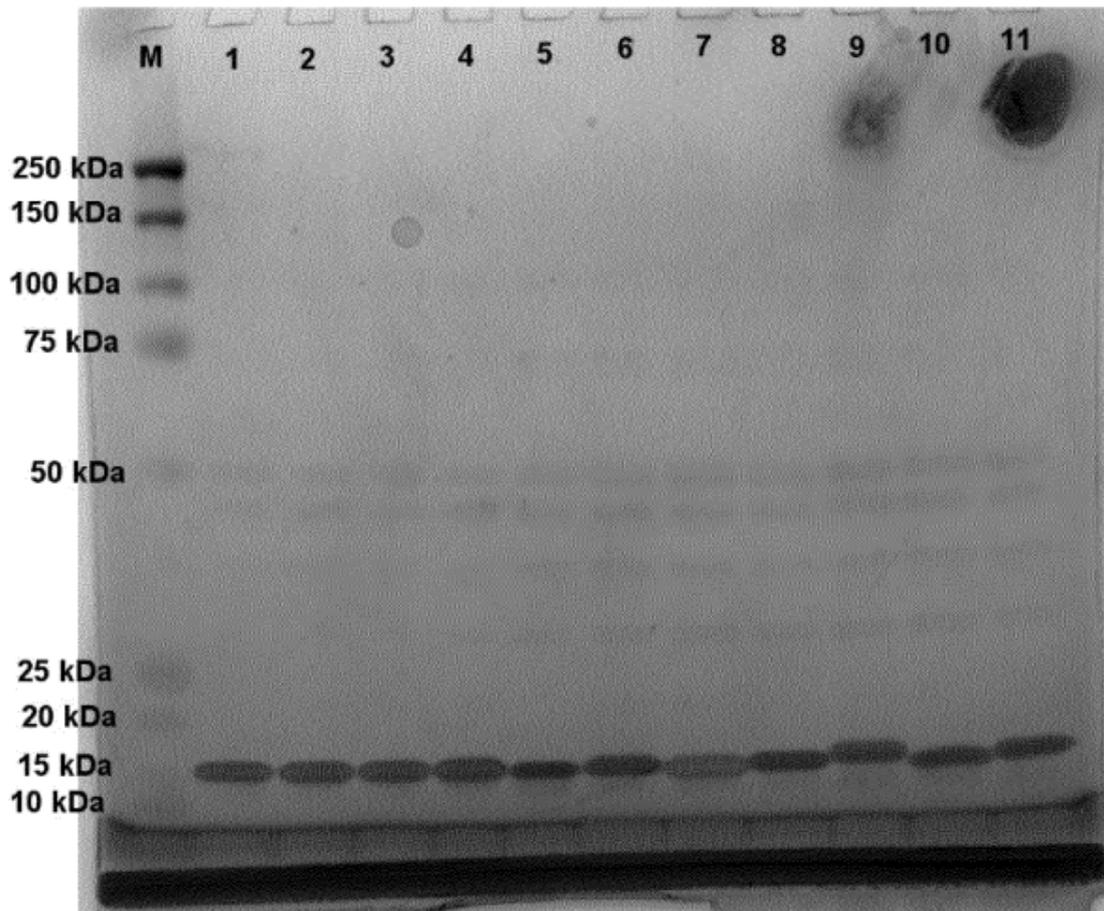


Aminoácido	Frecuencia abs.	Frecuencia [%]:
Y	343640	9,76
F	329036	9,35
L	321791	9,14
P	246503	7
D	206214	5,86
V	204707	5,82
R	202973	5,77
Q	196459	5,58
S	187351	5,32
I	182147	5,18
E	165425	4,7
G	160763	4,57
W	154346	4,39
A	153703	4,37
H	142862	4,06
T	130579	3,71
N	81174	2,31
K	70070	1,99
M	38233	1,09
C	1215	0,03

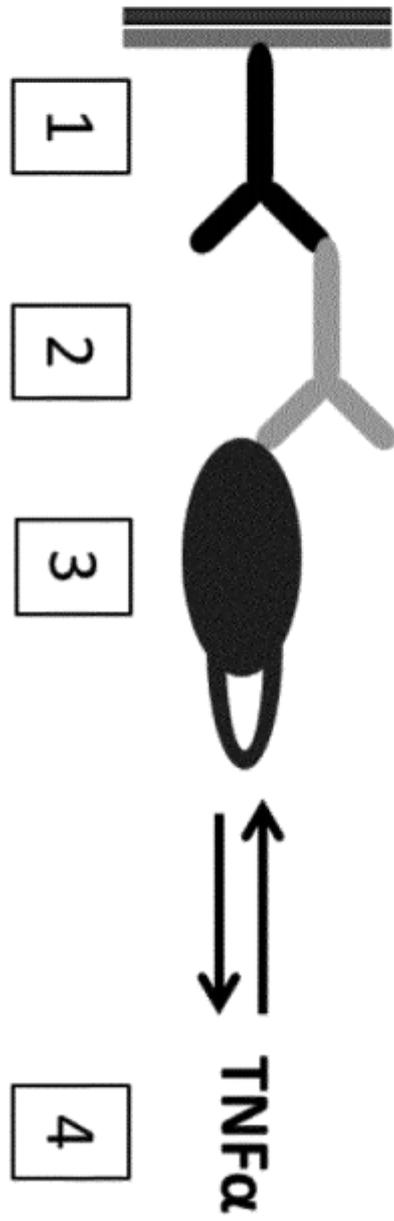
**Fig. 6**



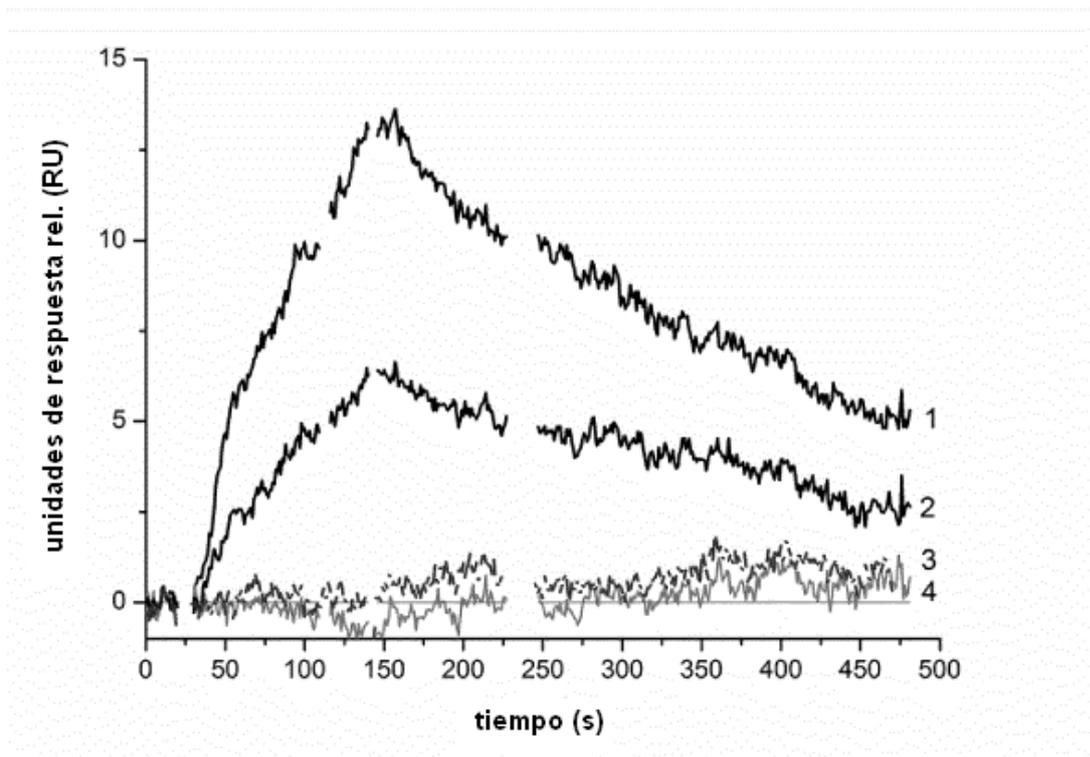
**Fig. 7**



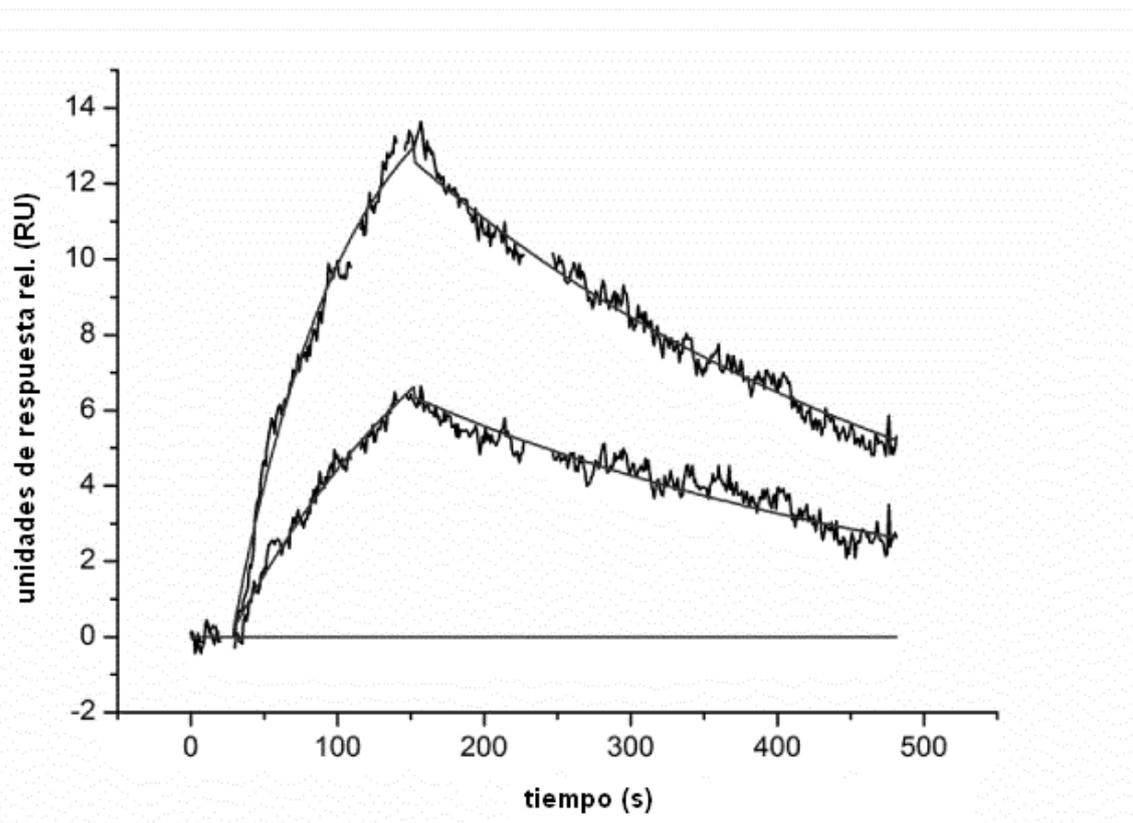
**Fig. 8**



**Fig. 9**



**Fig. 10**



**Fig. 11**

clon	analito TNFa [52 kDa]	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	Chi2
TT10F7	+ Tween 20	1,04E+04	2,68E-03	2,58E-07	0,0755
	- Tween 20	3,96E+03	1,03E-03	2,62E-07	3,07E-01

**Fig. 12**

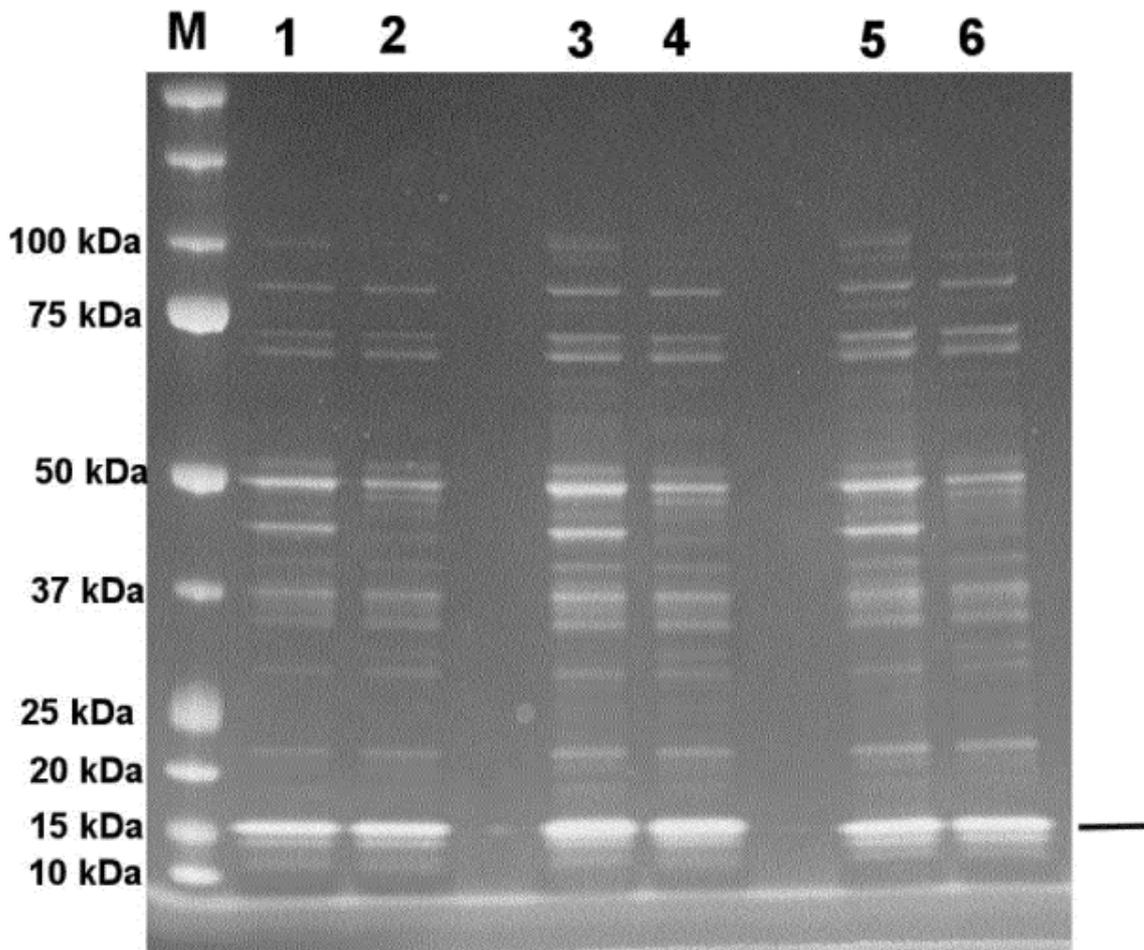


Fig. 13

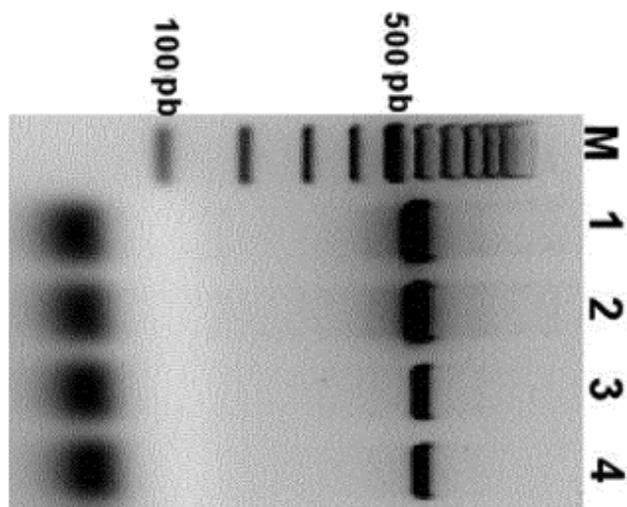
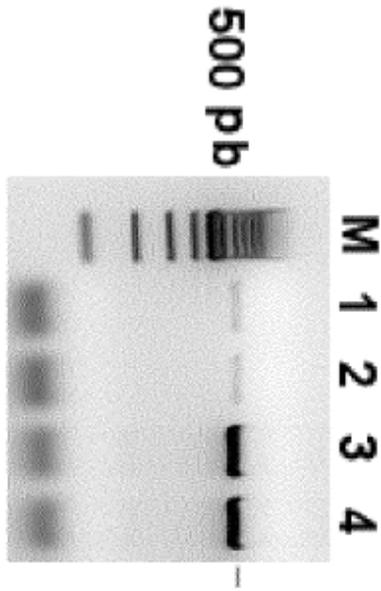
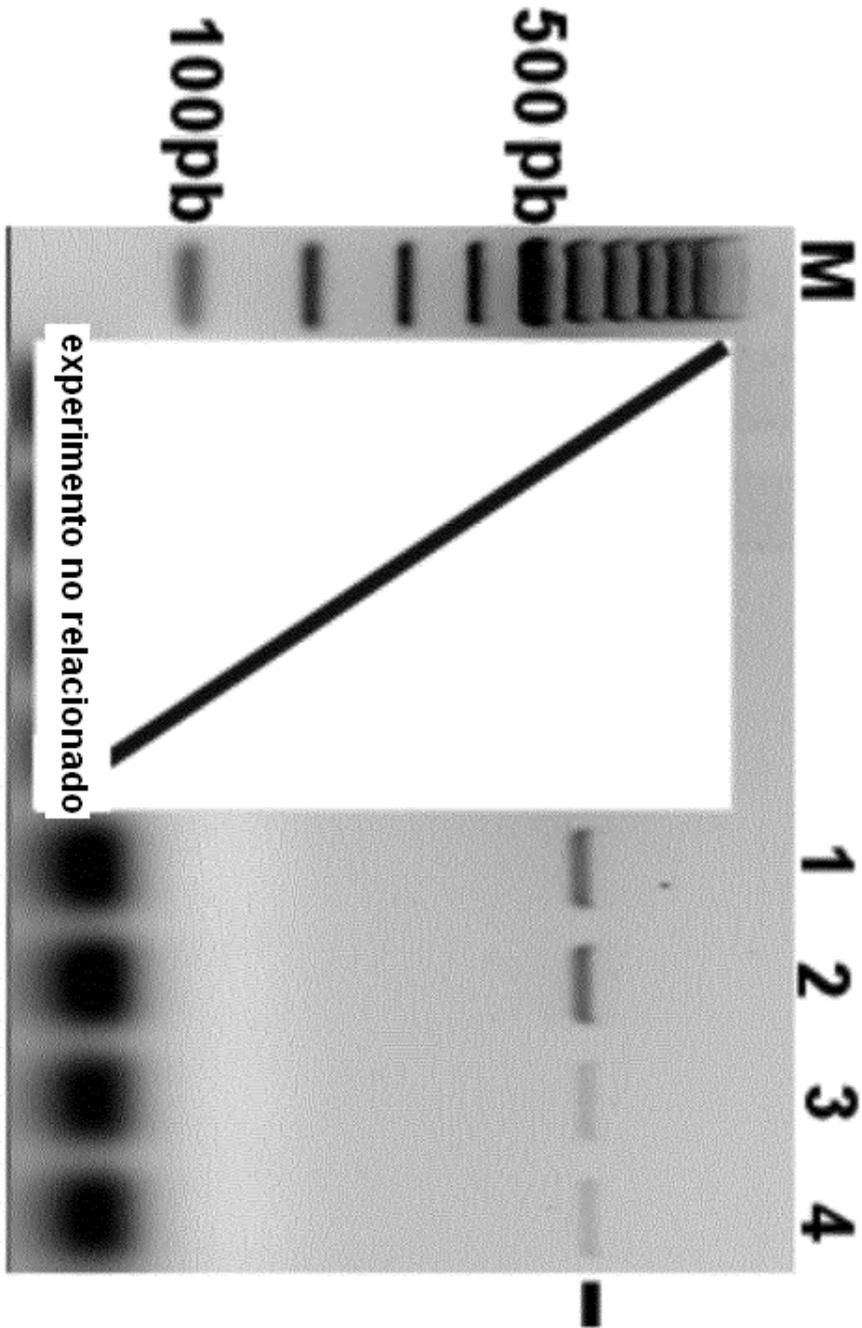


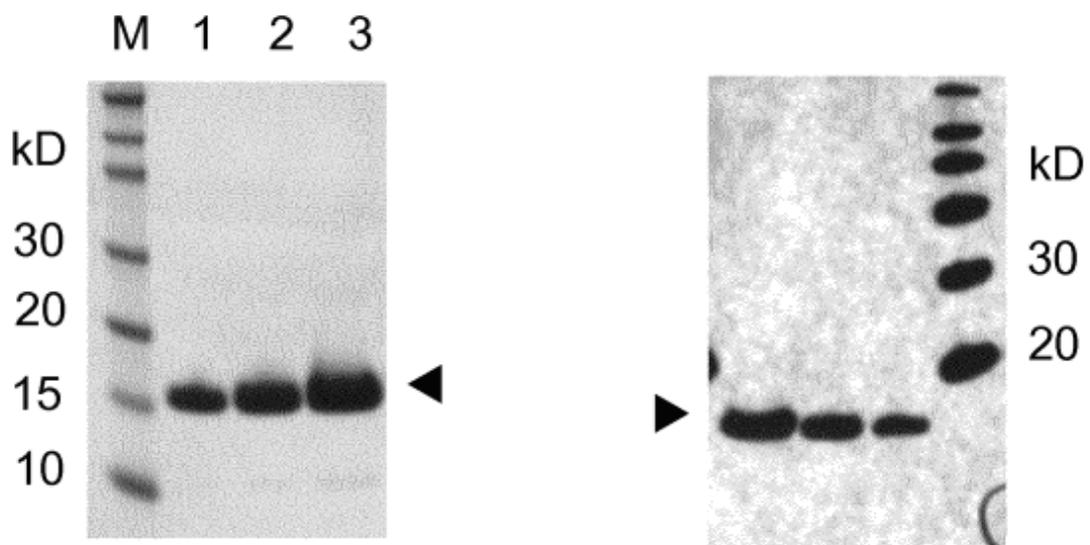
Fig. 14

N.º	casete de biblioteca
D110	GAGS-LRSASPVNDTRQI -GSSG
EIZI	GAGS-GHTNWDQVRLFDY -GSSG
D3U26	GAGS-FQP PYATQKYIAW -GSSG
EFAJG	GAGS-WP GYYLYPPLGFS -GSSG
ELU74	GAGS-GGSLFYDMMYFYF -GSSG
EVSDJ	GAGS-WDGFQSLDSGWYA -GSSG
D9LB9	GAGS-INYQTSQRGAGSR -GSSG
ESSP8	GAGS-EFGLVVRVFLYLD -GSSG
EKACE	GAGS-YA FSWA DQYFVWKK -GSSG
EVI0J	GAGS-WP GYYLYPPLGFS -GSSG
D2S01	GAGS-PYRHADYLSLLQK -GSSG
EA180	GAGS-EVLAFVYLPGVVV -GSSG
EDIJ8	GAGS-AGRQAFVKPGLAI -GSSG
D4TTN	GAGS-GGSLFYDMMYFYF -GSSG
EGBQP	GAGS-FMGNLFHAHP SDD -GSSG
D754U	GAGS-VVPYSRLGPRWEW -GSSG

Fig. 15



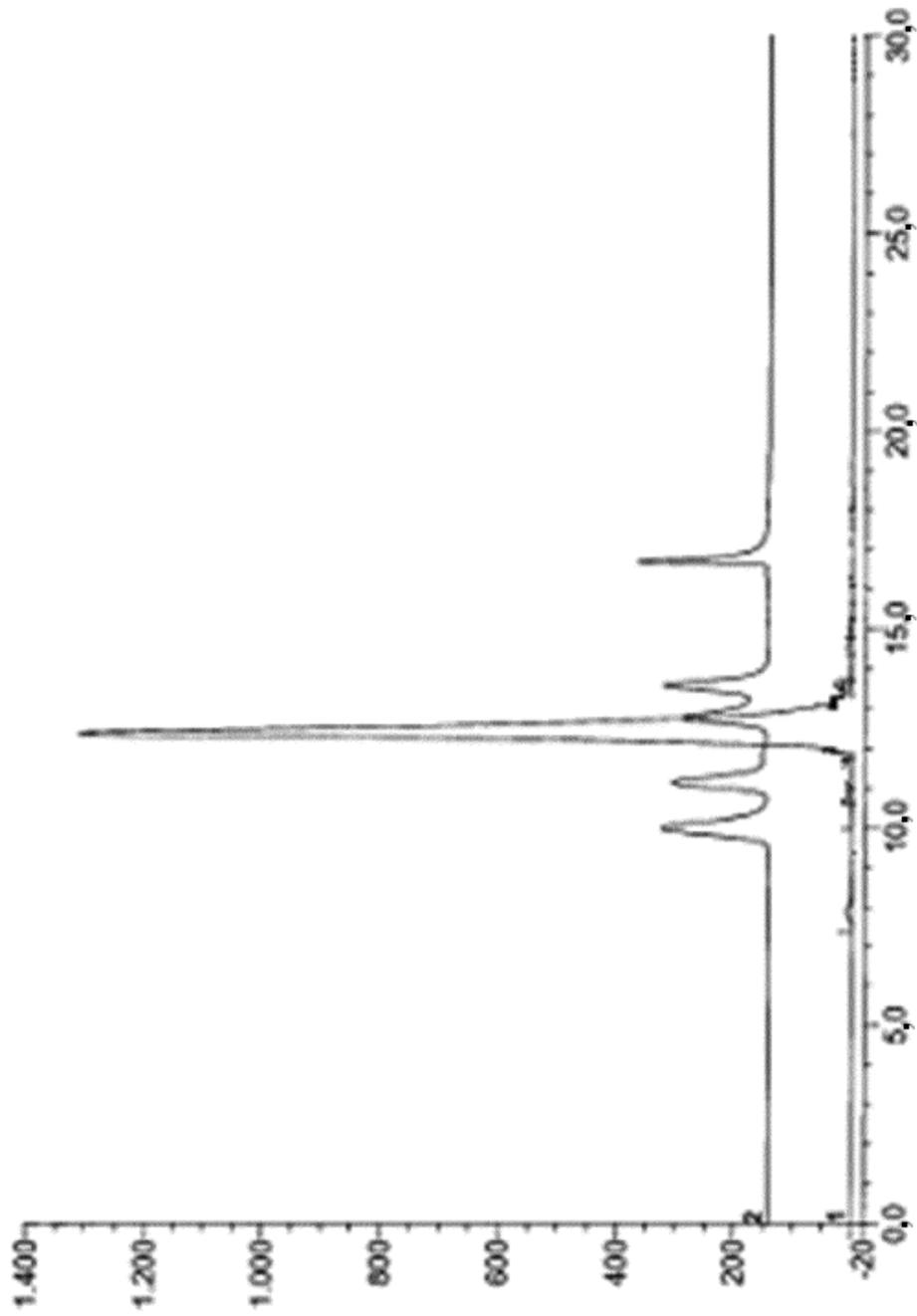
**Fig. 16**



M - Novex Sharp Patrón  
1 - thermoSlyD-IGF1; 2,5µg  
2 - thermoSlyD-IGF1; 5,0µg  
3 - thermoSlyD-IGF1; 10µg  
M\* - MagicMark

**PM: 14kD**

Fig. 17



**Fig. 18**

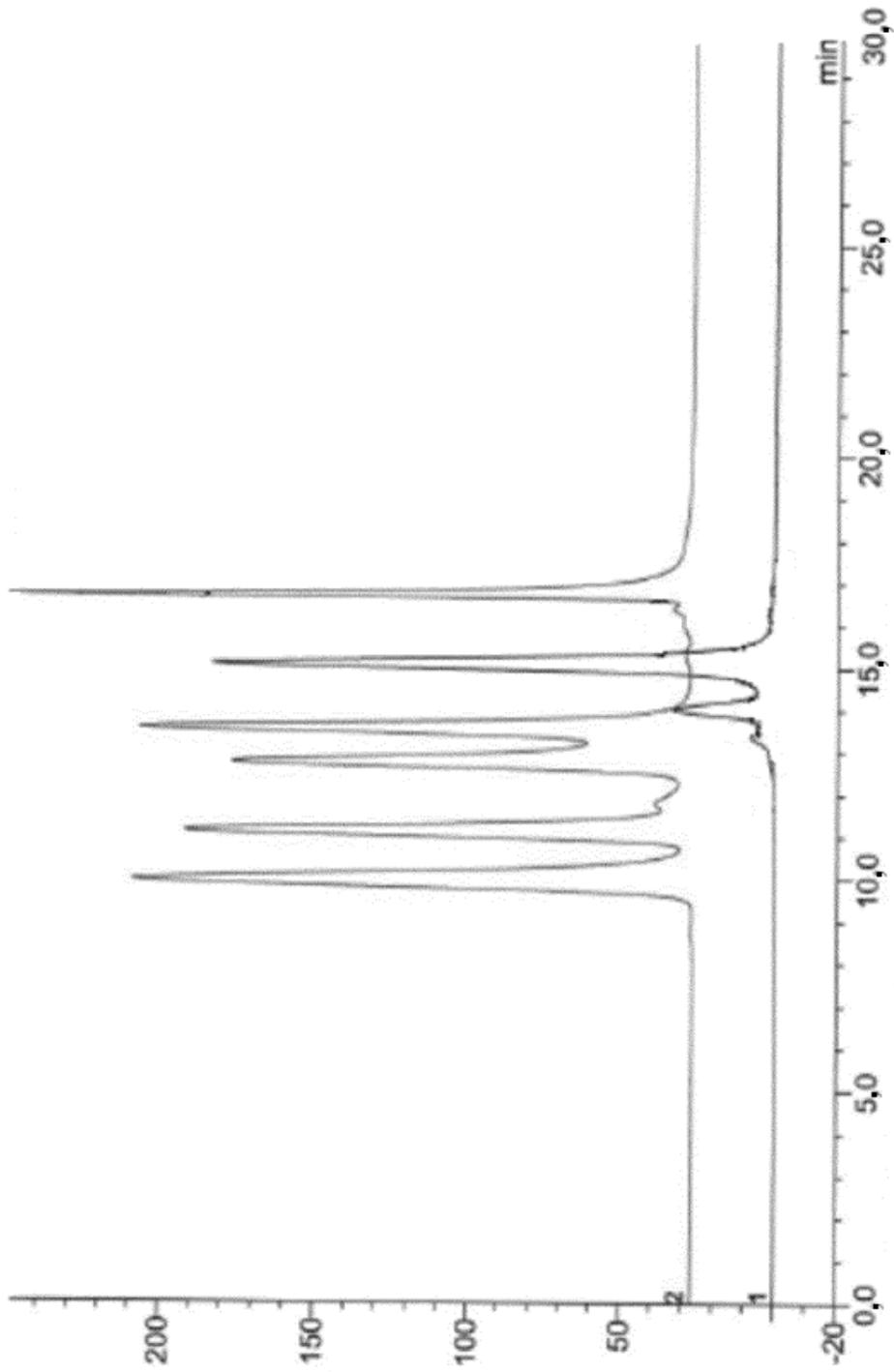
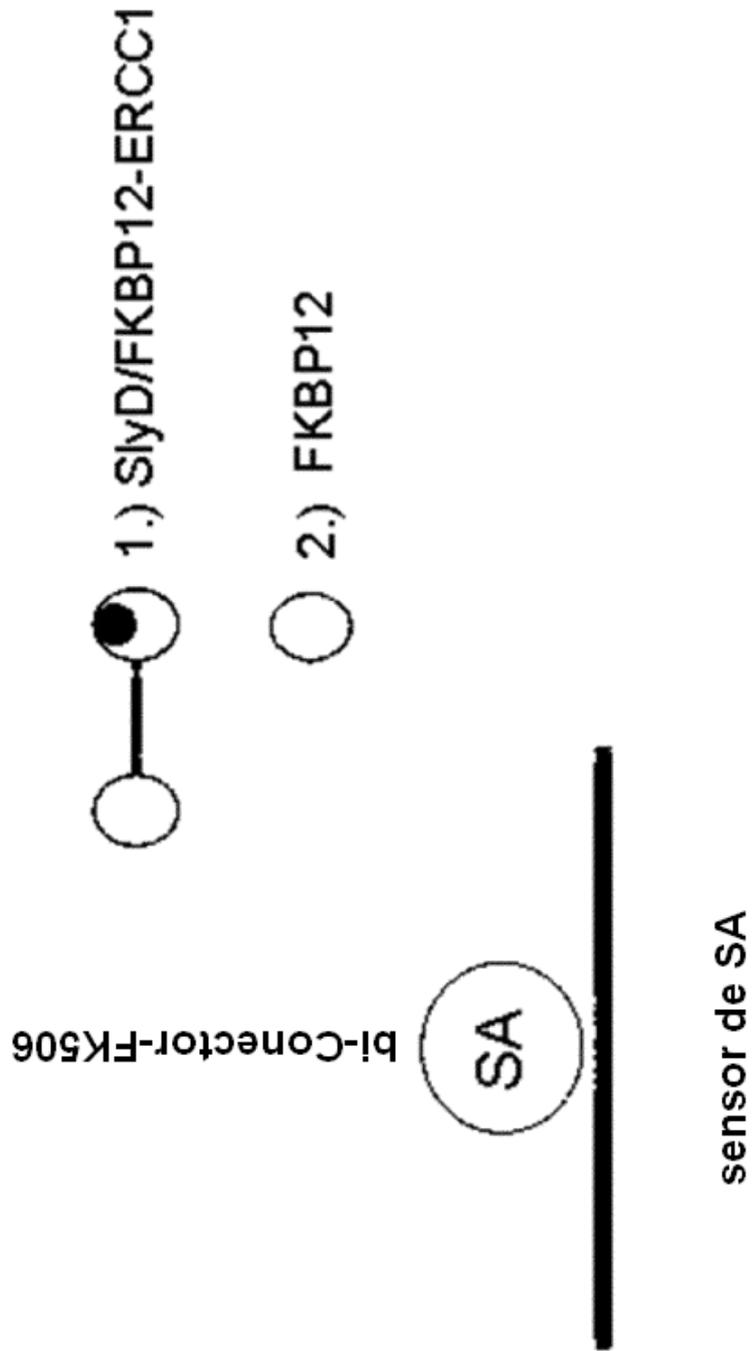


Fig. 19



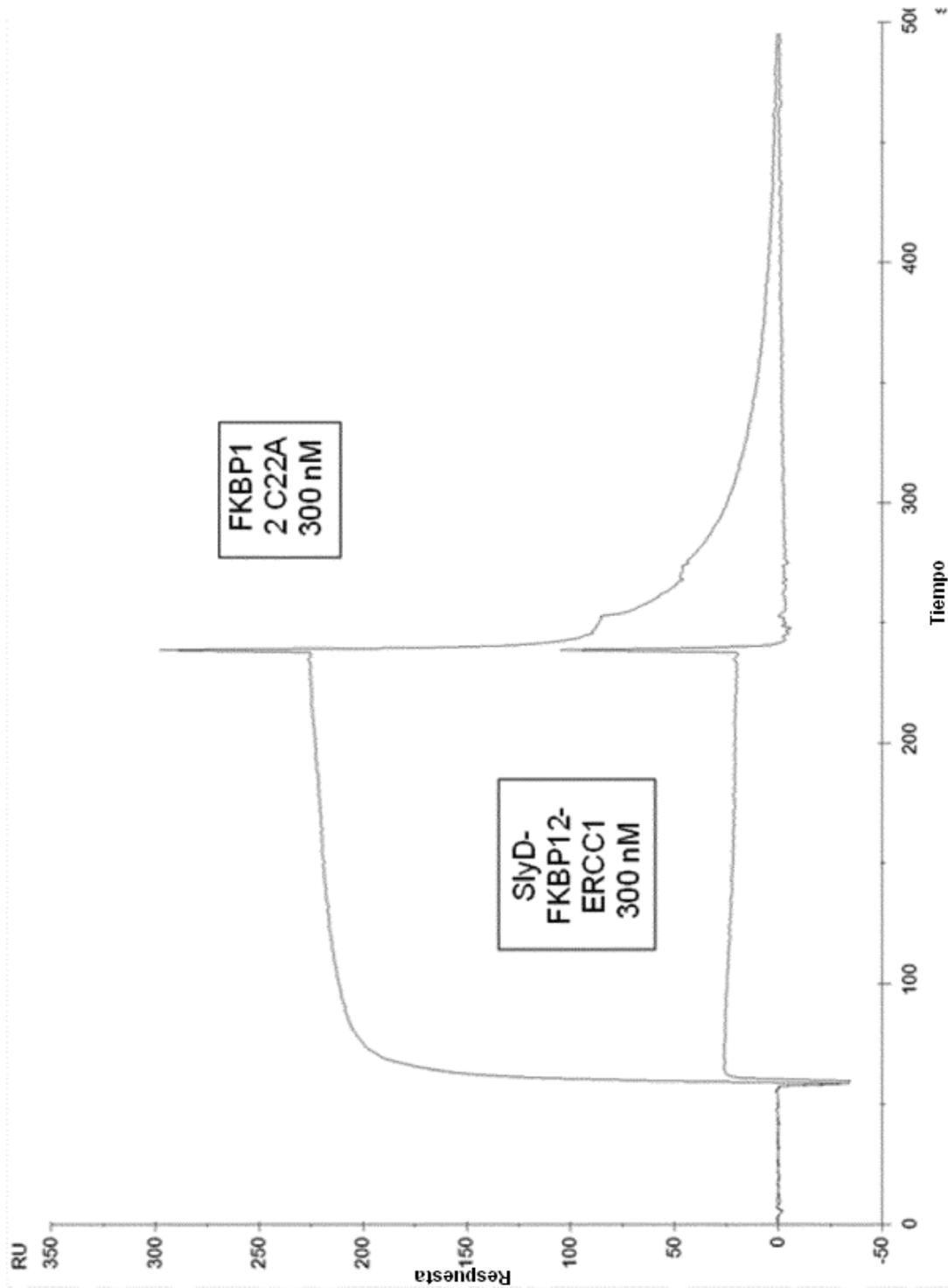
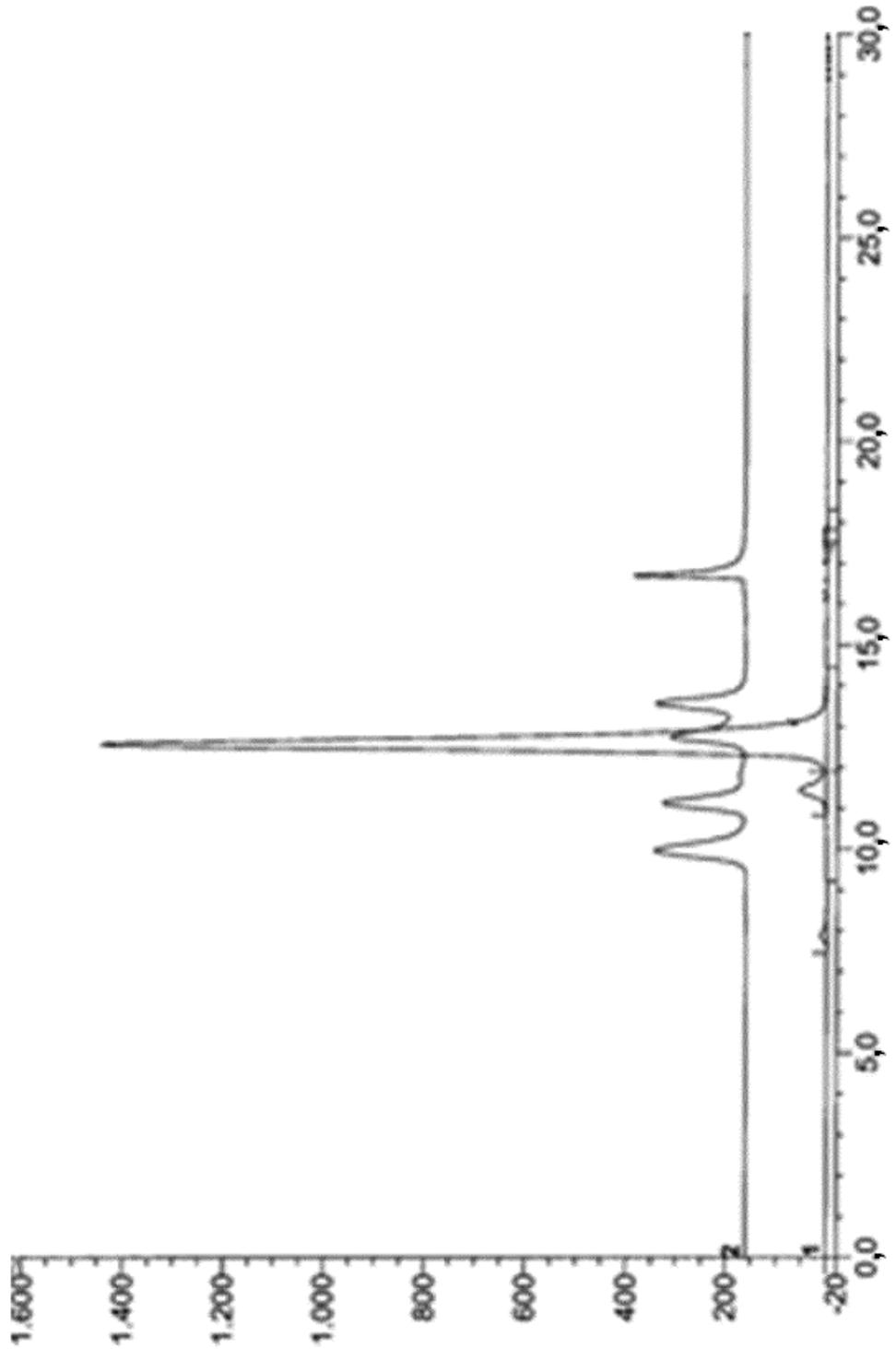


Fig. 20

Fig. 21



**Fig. 22**

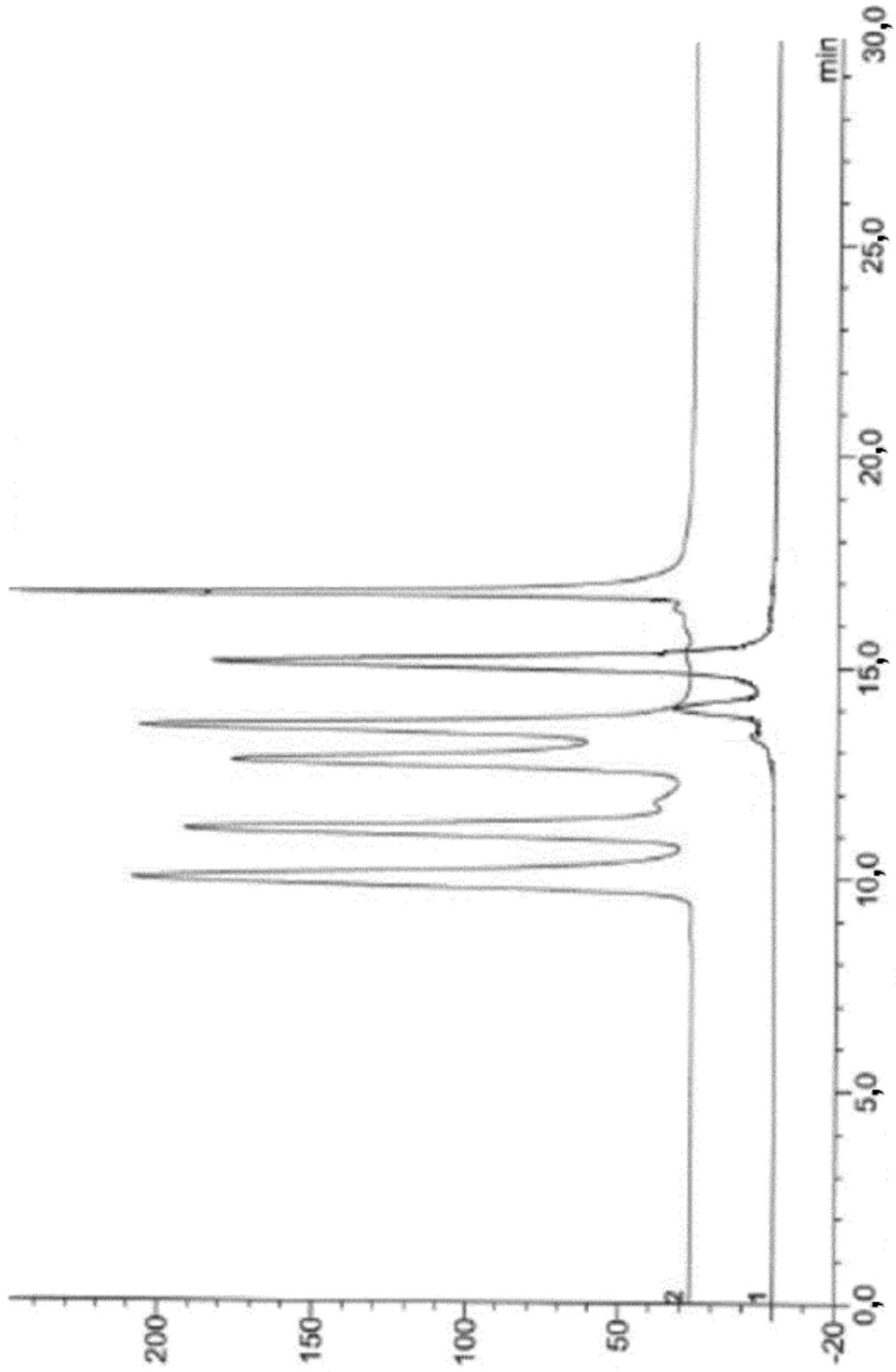
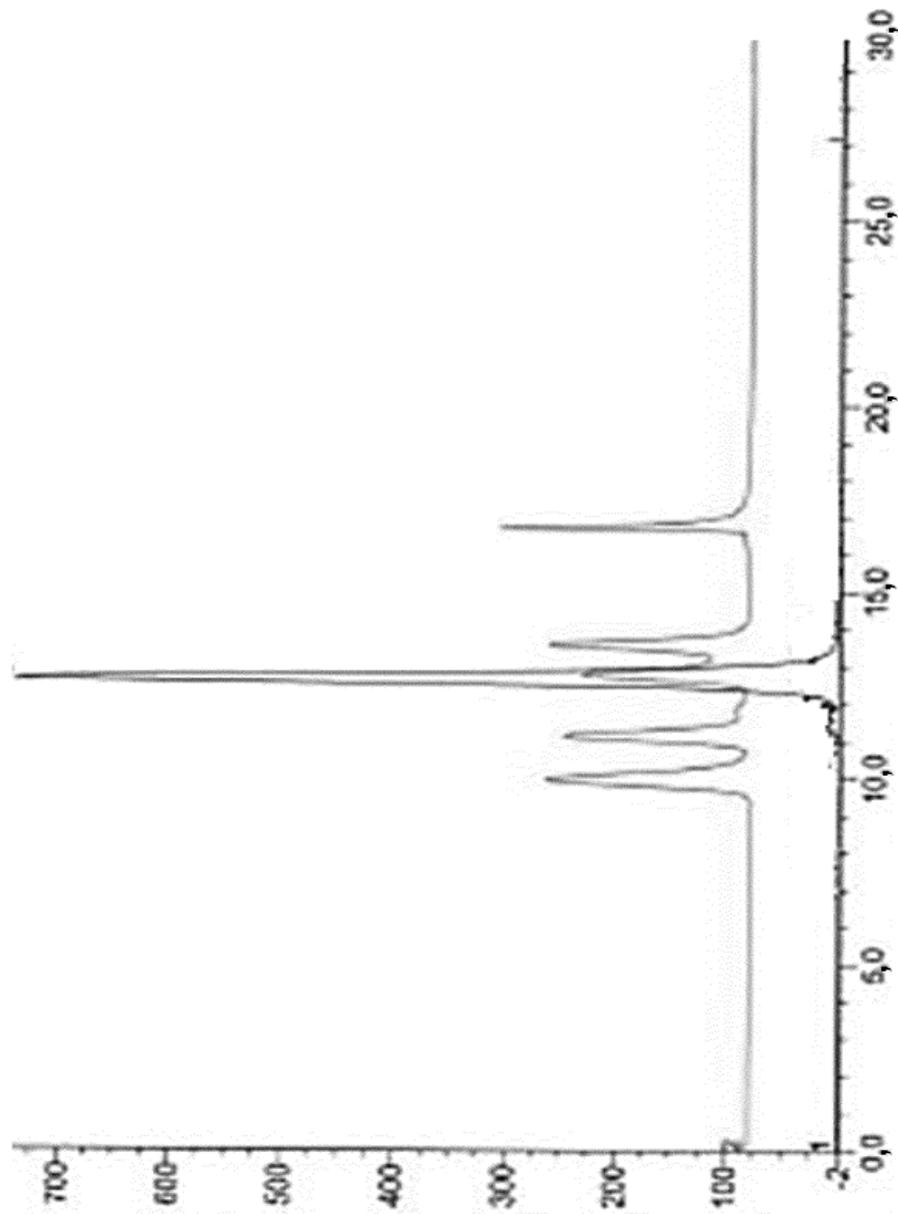


Fig. 23



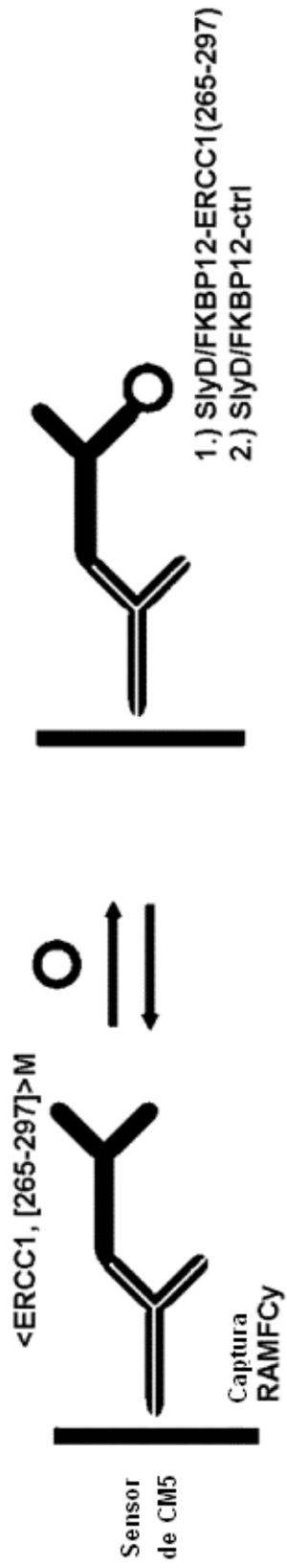
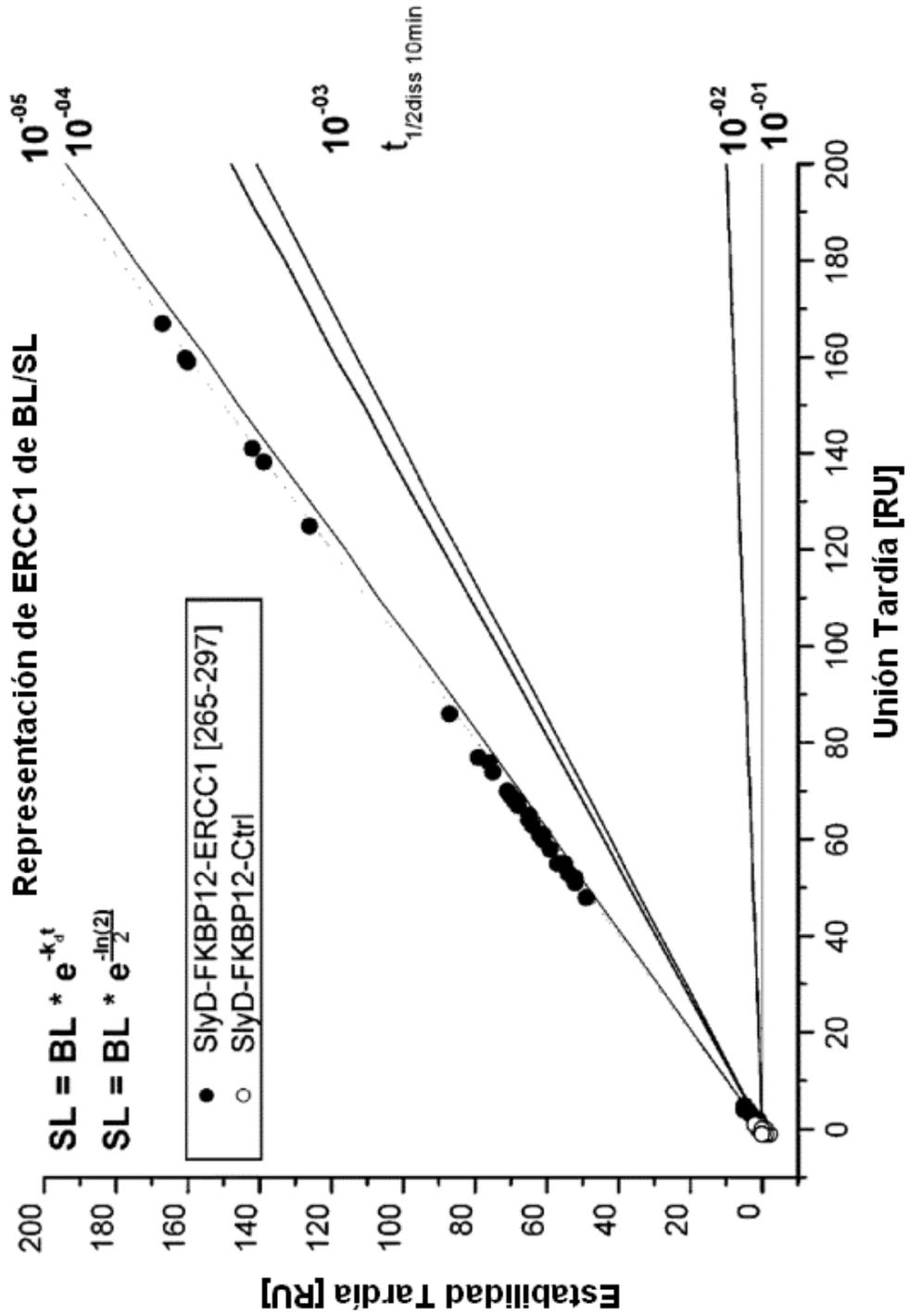


Fig. 24

Fig. 25



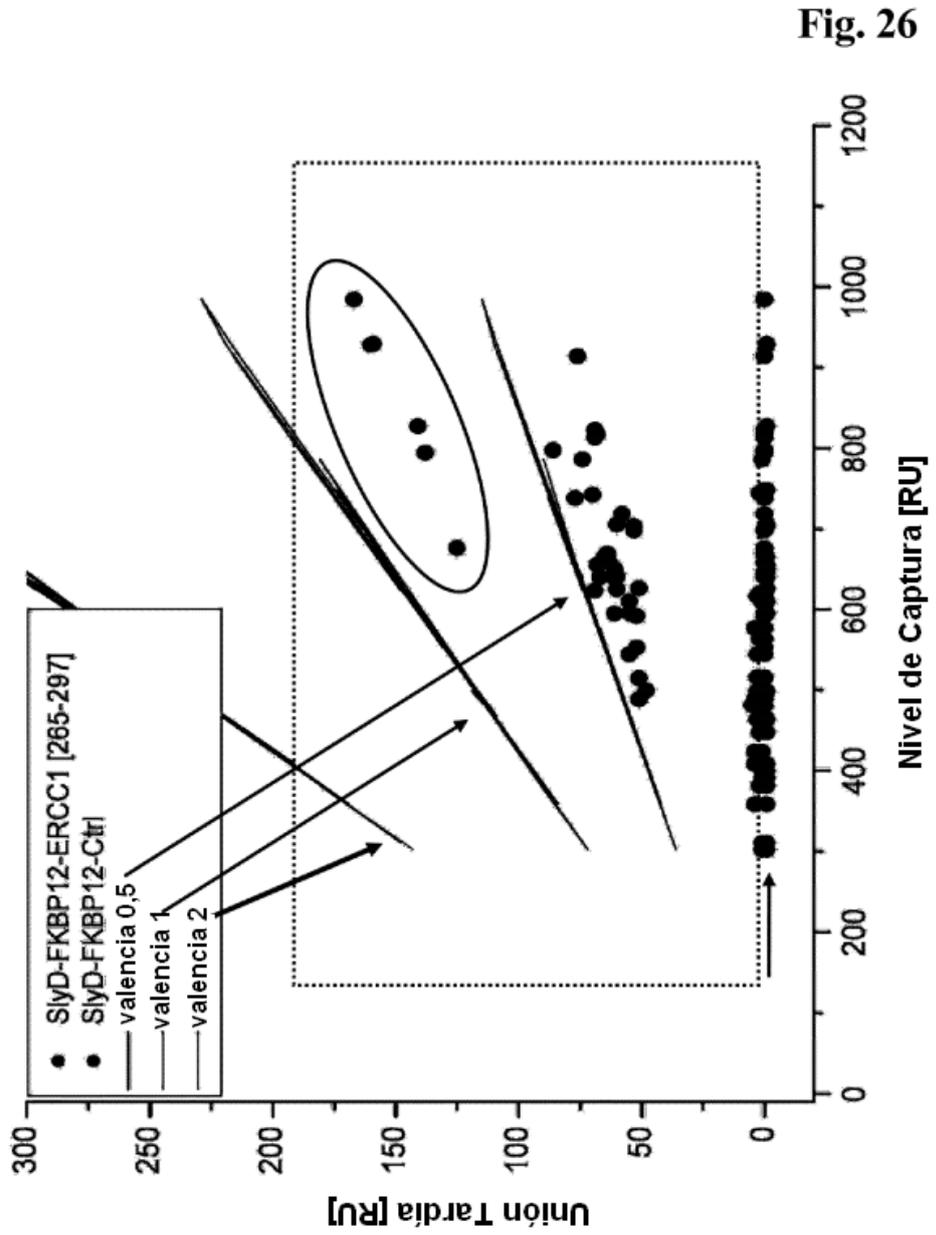


Fig. 26

Fig. 27 A

Anticuerpo	Analito	Unión Tardía (RU)	Estabilidad Tardía (RU)	kd (1/s)	t1/2 (min)
5.001.015	SlyD/FKBP12-ERCC1 SlyD/FKBP12-ctrl	48 0	49 0	< 1E-05 -	> 1155 -
5.001.017	SlyD/FKBP12-ERCC1 SlyD/FKBP12-ctrl	68 0	69 -1	5,86E-05 -	197 -
5.001.019	SlyD/FKBP12-ERCC1 SlyD/FKBP12-ctrl	68 -1	68 -1	1,17E-04 -	99 -
5.001.025	SlyD/FKBP12-ERCC1 SlyD/FKBP12-ctrl	58 0	59 0	9,42E-05 -	123 -
5.001.035	SlyD/FKBP12-ERCC1 SlyD/FKBP12-ctrl	138,2 -0,2	138,8 -0,1	5,66E-05 -	204 -
5.001.041	SlyD/FKBP12-ctrl SlyD/FKBP12-ERCC1	0 0	-1 0	- -	- -
5.001.060	SlyD/FKBP12-ERCC1 SlyD/FKBP12-ctrl	51 0	52 0	8,19E-05 -	141 -
5.001.062	SlyD/FKBP12-ERCC1 SlyD/FKBP12-ctrl	70 0	71 1	6,98E-05 -	165 -
5.002.015	SlyD/FKBP12-ERCC1 SlyD/FKBP12-ctrl	64 0	65 0	3,90E-05 -	296 -
5.002.017	SlyD/FKBP12-ERCC1 SlyD/FKBP12-ctrl	69 0	70 0	6,43E-05 -	180 -
5.002.019	SlyD/FKBP12-ERCC1 SlyD/FKBP12-ctrl	67 0	68 0	7,02E-05 -	165 -
5.002.025	SlyD/FKBP12-ERCC1 SlyD/FKBP12-ctrl	51 -1	52 -1	1,22E-04 -	95 -
5.002.035	SlyD/FKBP12-ERCC1 SlyD/FKBP12-ctrl	159 -1	160 0	5,66E-05 -	204 -
5.002.041	SlyD/FKBP12-ctrl SlyD/FKBP12-ERCC1	0 1	1 1	- -	- -
5.002.060	SlyD/FKBP12-ERCC1 SlyD/FKBP12-ctrl	51 0	52 0	4,98E-05 -	232 -
5.002.062	SlyD/FKBP12-ERCC1 SlyD/FKBP12-ctrl	61 -1	62 -1	9,11E-05 -	127 -
5.005.015	SlyD/FKBP12-ERCC1 SlyD/FKBP12-ctrl	61 -1	61 0	8,52E-05 -	136 -
5.005.017	SlyD/FKBP12-ERCC1 SlyD/FKBP12-ctrl	60 -1	61 0	1,19E-04 -	97 -
5.005.019	SlyD/FKBP12-ERCC1 SlyD/FKBP12-ctrl	86 0	87 0	7,11E-05 -	163 -
5.005.025	SlyD/FKBP12-ERCC1 SlyD/FKBP12-ctrl	53 0	54 0	1,23E-04 -	94 -
5.005.035	SlyD/FKBP12-ERCC1 SlyD/FKBP12-ctrl	141 -1	142 0	5,66E-05 -	204 -
5.005.041	SlyD/FKBP12-ctrl SlyD/FKBP12-ERCC1	0 4	0 4	- -	- -
5.005.062	SlyD/FKBP12-ERCC1 SlyD/FKBP12-ctrl	55 0	55 0	1,20E-04 -	96 -

Fig. 27 B

Anticuerpo	Analito	Unión Tardía (RU)	Estabilidad Tardía(RU)	kd (1/s)	t1/2 (min)
5.003.015	SlyD/FKBP12-ERCC1 SlyD/FKBP12-ctrl	74 1	75 2	6,70E-05 -	172 -
5.003.017	SlyD/FKBP12-ERCC1 SlyD/FKBP12-ctrl	76 0	76 0	1,01 E-04 -	115 -
5.003.019	SlyD/FKBP12-ERCC1 SlyD/FKBP12-ctrl	77 0	79 0	2,93E-05 -	394 -
5.003.025	SlyD/FKBP12-ERCC1 SlyD/FKBP12-ctrl	52 0	52 -1	1,01 E-04 -	114 -
5.003.035	SlyD/FKBP12-ERCC1 SlyD/FKBP12-ctrl	167 0	167 -1	5,66E-05 -	204 -
5.003.041	SlyD/FKBP12-ctrl SlyD/FKBP12-ERCC1	-1 3	-1 3	- -	- -
5.003.060	SlyD/FKBP12-ERCC1 SlyD/FKBP12-ctrl	55 0	56 0	8,52E-05 -	136 -
5.003.062	SlyD/FKBP12-ERCC1 SlyD/FKBP12-ctrl	60 -1	61 -1	1,04E-04 -	111 -
5.004.015	SlyD/FKBP12-ERCC1 SlyD/FKBP12-ctrl	60 0	61 0	6,07E-05 -	190 -
5.004.017	SlyD/FKBP12-ERCC1 SlyD/FKBP12-ctrl	69 0	70 0	7,52E-05 -	154 -
5.004.019	SlyD/FKBP12-ERCC1 SlyD/FKBP12-ctrl	69 0	70 -1	2,23E-05 -	517 -
5.004.025	SlyD/FKBP12-ERCC1 SlyD/FKBP12-ctrl	53 -1	54 -1	1,52E-04 -	76 -
5.004.035	SlyD/FKBP12-ERCC1 SlyD/FKBP12-ctrl	159,7 -0,8	160,6 0	5,66E-05 -	204 -
5.004.041	SlyD/FKBP12-ctrl SlyD/FKBP12-ERCC1	1 5	1 5	- -	- -
5.004.060	SlyD/FKBP12-ERCC1 SlyD/FKBP12-ctrl	52 0	52 0	7,89E-05 -	146 -
5.004.062	SlyD/FKBP12-ERCC1 SlyD/FKBP12-ctrl	61 -1	62 -1	1,03E-04 -	112 -
5.006.015	SlyD/FKBP12-ERCC1 SlyD/FKBP12-ctrl	65 -1	65 0	8,99E-05 -	128 -
5.006.017	SlyD/FKBP12-ERCC1 SlyD/FKBP12-ctrl	55 -1	57 0	8,14E-05 -	142 -
5.006.035	SlyD/FKBP12-ERCC1 SlyD/FKBP12-ctrl	125 0	126 0	5,66E-05 -	204 -
5.006.041	SlyD/FKBP12-ctrl SlyD/FKBP12-ERCC1	1 4	2 5	- -	- -
5.006.060	SlyD/FKBP12-ERCC1 SlyD/FKBP12-ctrl	63 0	64 -1	2,02E-05 -	573 -
5.006.062	SlyD/FKBP12-ERCC1 SlyD/FKBP12-ctrl	64 0	65 0	1,14E-04 -	101 -

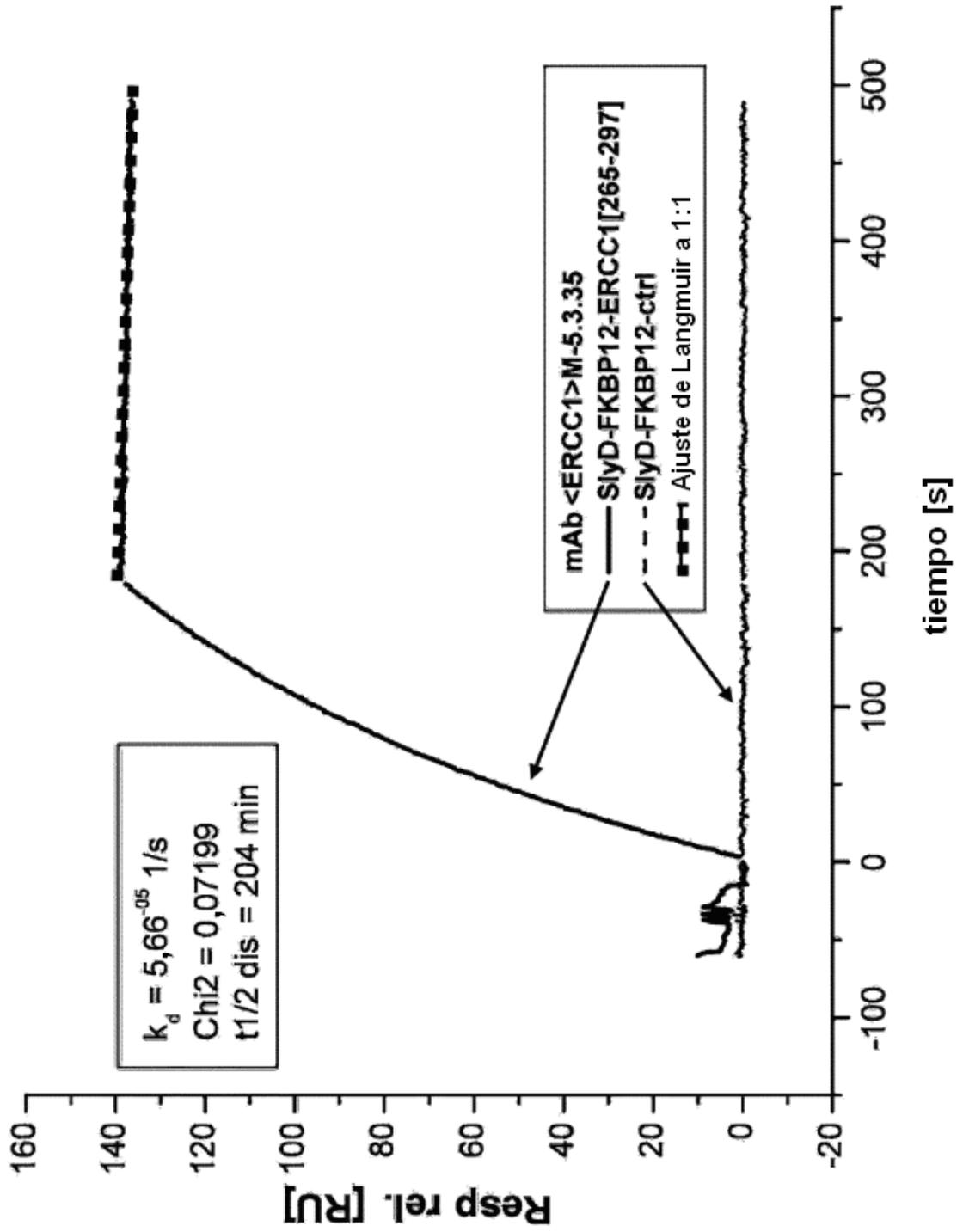
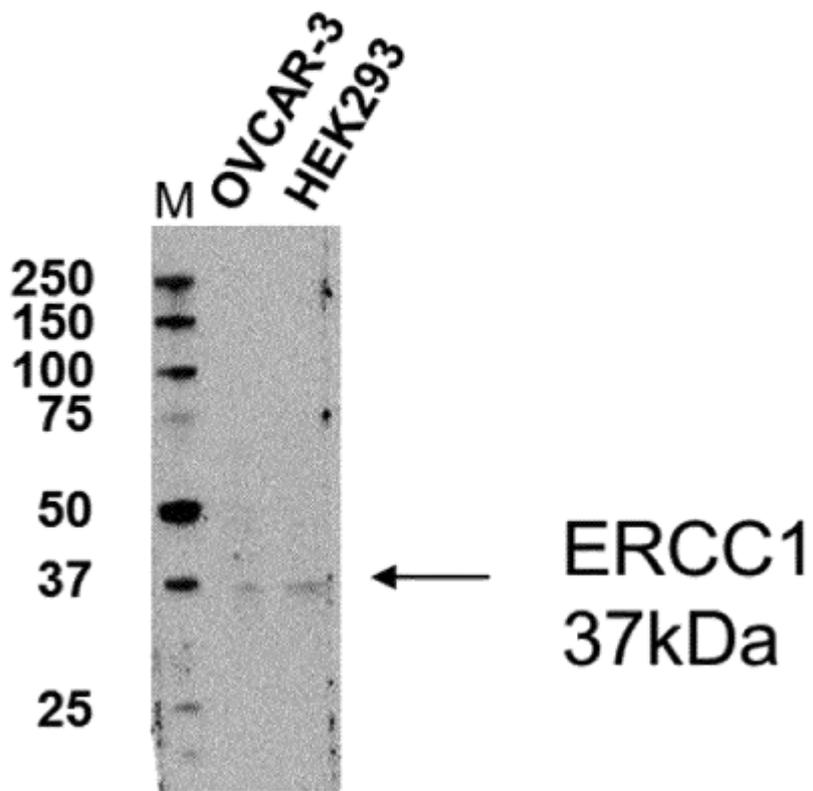


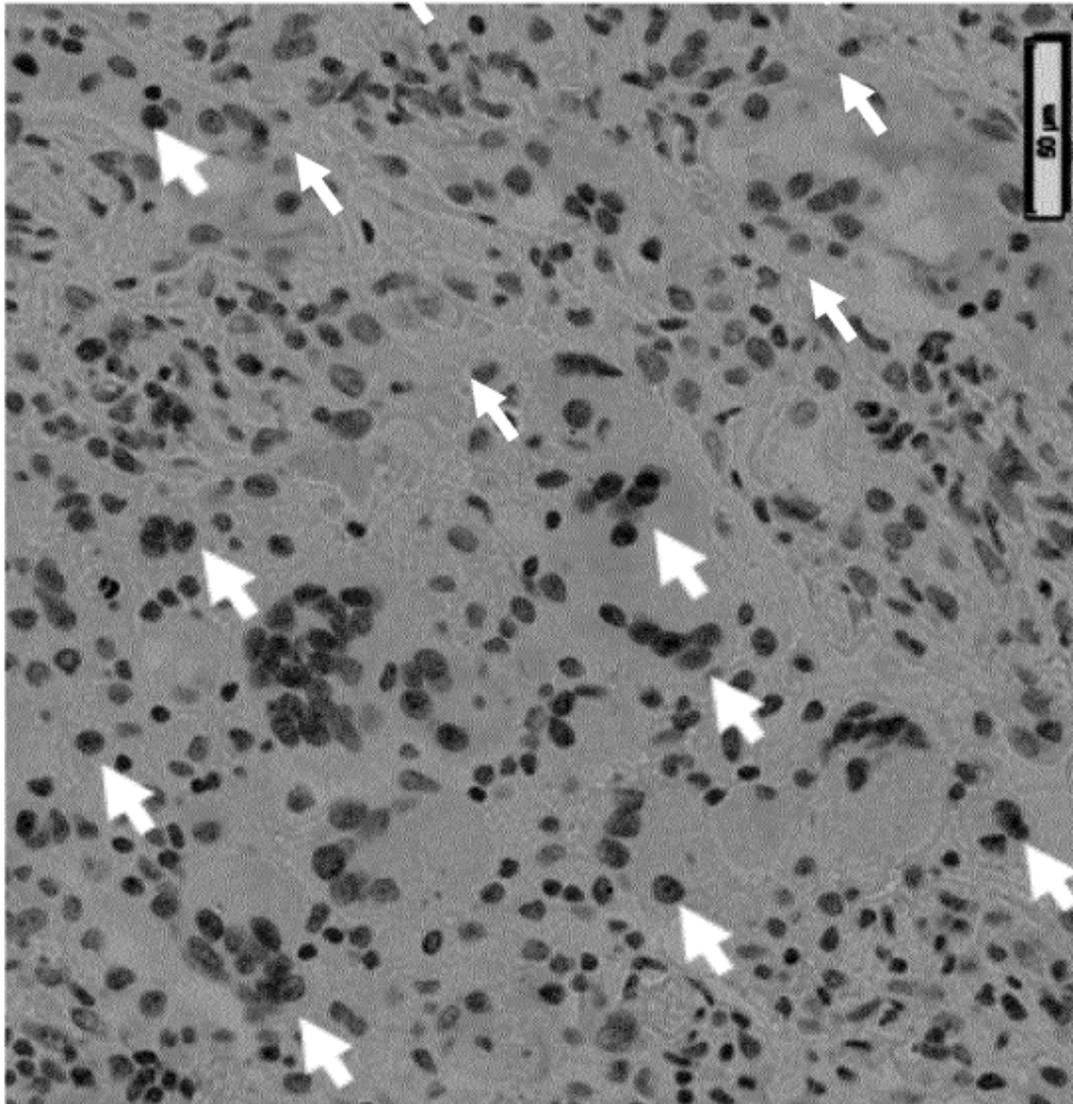
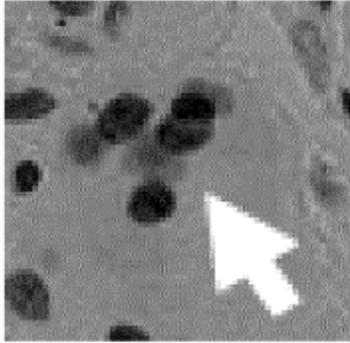
Fig. 28

**Fig. 29**



<ERCC1>-M-5.1.035

**Fig. 30**



**Fig. 31**

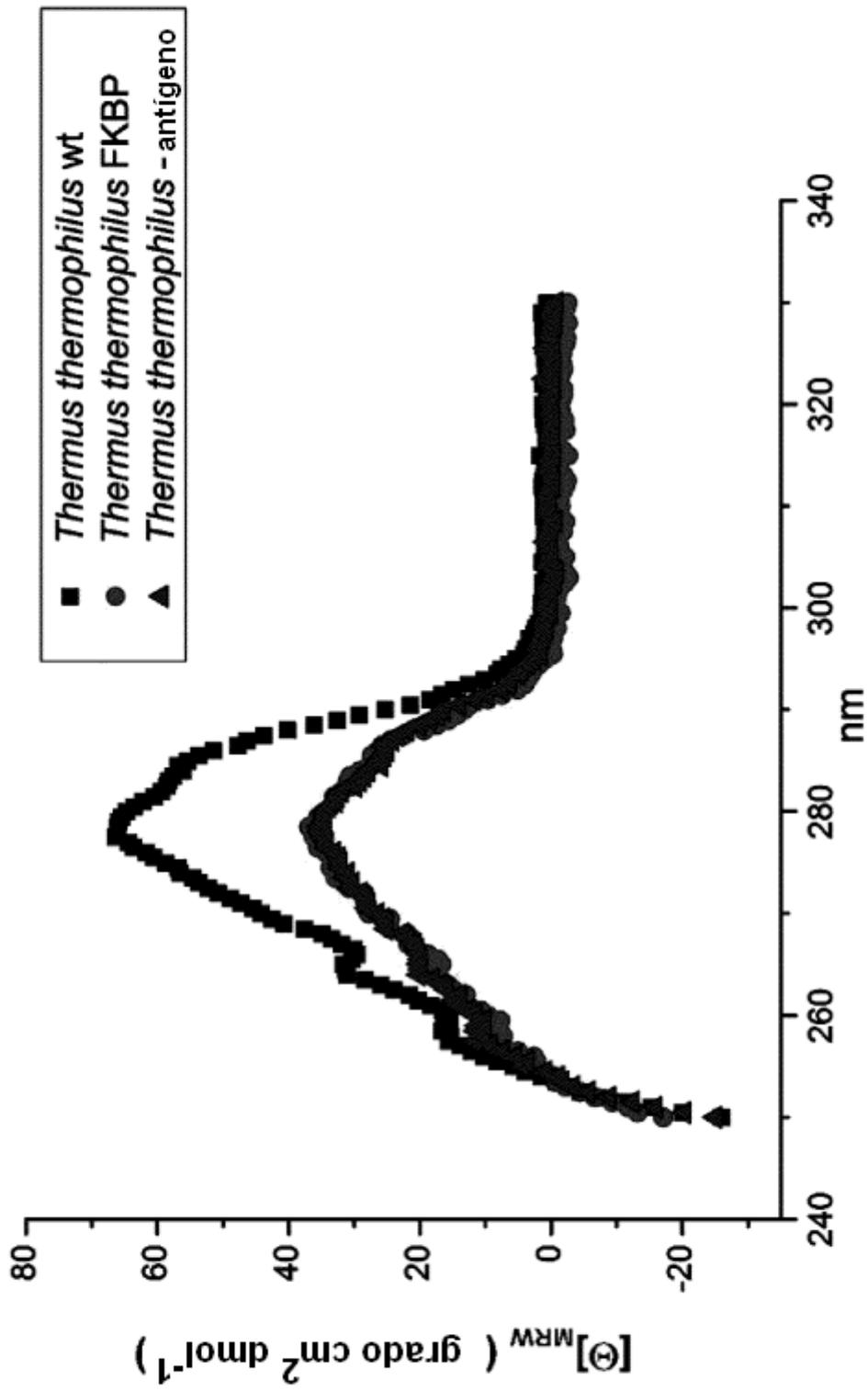


Fig. 32

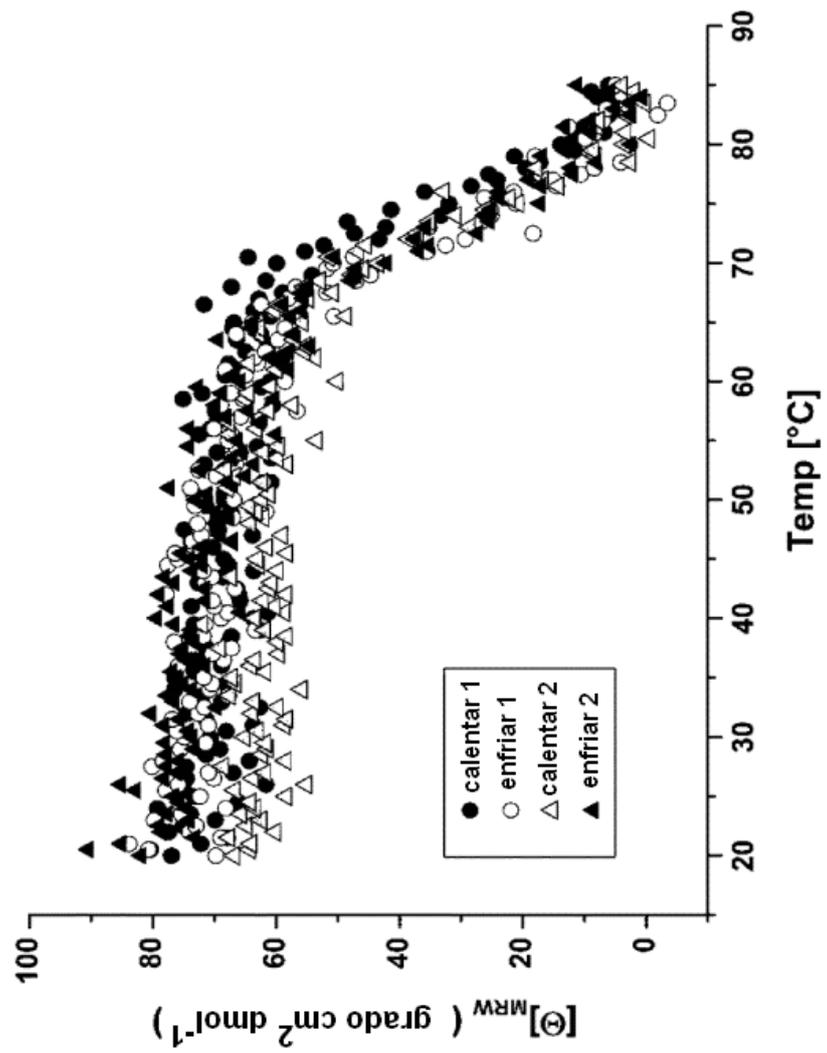
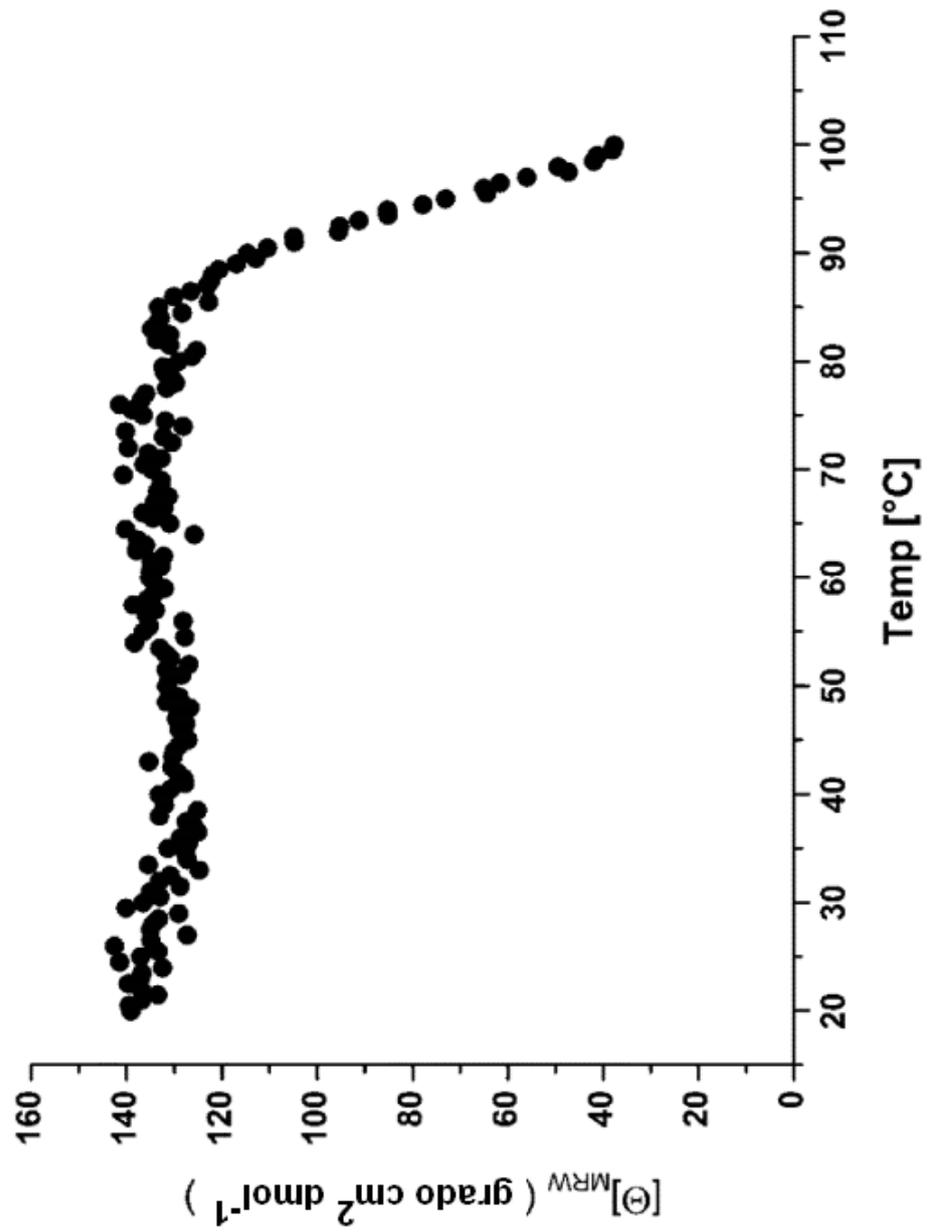


Fig. 33



**Fig. 34**

ratones n.º	CI50 de ratones CI50 de titulación de suero [mE]	
	IGF-1	SlyD-IGF-1(74-90)de <i>T.thermophilus</i>
K1643M1	800	10000
K1643M2	1000	15000
K1643M3	4700	50000
K1643M4	500	7000
K1643M5	2500	26000
K1644M1	2800	32000
K1644M2	280	-
K1644M3	250	300
K1644M4	150	800
K1644M5	150	-

Fig. 35

cultivo de clon	reactividad [mE]		
	IGF-1	SlyD-IGF-1(74-90) de <i>T.thermophilus</i>	SlyD de <i>T.thermophilus</i>
10.1.3	2748	2116	37
10.2.3	2768	2112	40
10.3.7	2712	2091	32
10.4.7	2700	2109	35
10.5.8	2501	1993	35
10.6.8	2410	1955	36
10.7.9	2111	1899	36
10.8.9	2145	1911	38
11.9.15	2578	2389	32
11.10.15	2585	2396	33
11.11.17	2427	2154	32
11.12.17	2372	2142	32

Fig. 36

mAb	RU	Antígeno	kDa	°C	k <sub>a</sub> 1/MS	k <sub>d</sub> 1/s	t <sub>1/2-dis</sub> min	K <sub>D</sub> nM	R <sub>máx</sub> RU	MR	Chi <sup>2</sup> RUF
M-11.11.17	457	<b>IGF-I (nativo)</b>	8		2,0E+06	2,1E-05	560	<b>0,01</b>	46	2,0	0,0
	439	IGF-II (nativo)	8		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	432	<b>TTSlyD-IGF-1 (74-90)</b>	14		7,1E+05	1,0E-05	1113	<b>0,01</b>	83	2,0	0,0
	427	TgSlyD-IGF-2(53-65)	14	25	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	421	TTSlyD-wt	18		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	419	TgSlyD-wt	18		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	418	TgSlyD-dIF-wt	15		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	512	<b>hIGF-I (nativo)</b>	8		9,2E+05	1,5E-03	8	<b>1,6</b>	44	1,7	0,0
M-10.7.9	494	hIGF-II (nativo)	8		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	485	<b>TTSlyD-IGF-1 (74-90)</b>	14		2,9E+05	6,9E-04	17	<b>2,4</b>	84	1,8	0,0
	479	TgSlyD-IGF-2(53-65)	14	25	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	470	TTSlyD-wt	18		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	468	TgSlyD-wt	18		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	465	TgSlyD-dIF-wt	15		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	731	<b>hIGF-I (nativo)</b>	8		3,9E+06	1,3E-04	92	<b>0,03</b>	68	1,8	0,0
	717	<b>hIGF-II (nativo)</b>	8		4,9E+06	2,4E-03	5	<b>0,5</b>	67	1,8	0,3
M-2.28.44	704	TTSlyD-IGF-1 (74-90)	14		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	693	TgSlyD-IGF-2(53-65)	14	25	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	673	TTSlyD-wt	18		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	664	TgSlyD-wt	18		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	655	TgSlyD-dIF-wt	15		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Fig. 37

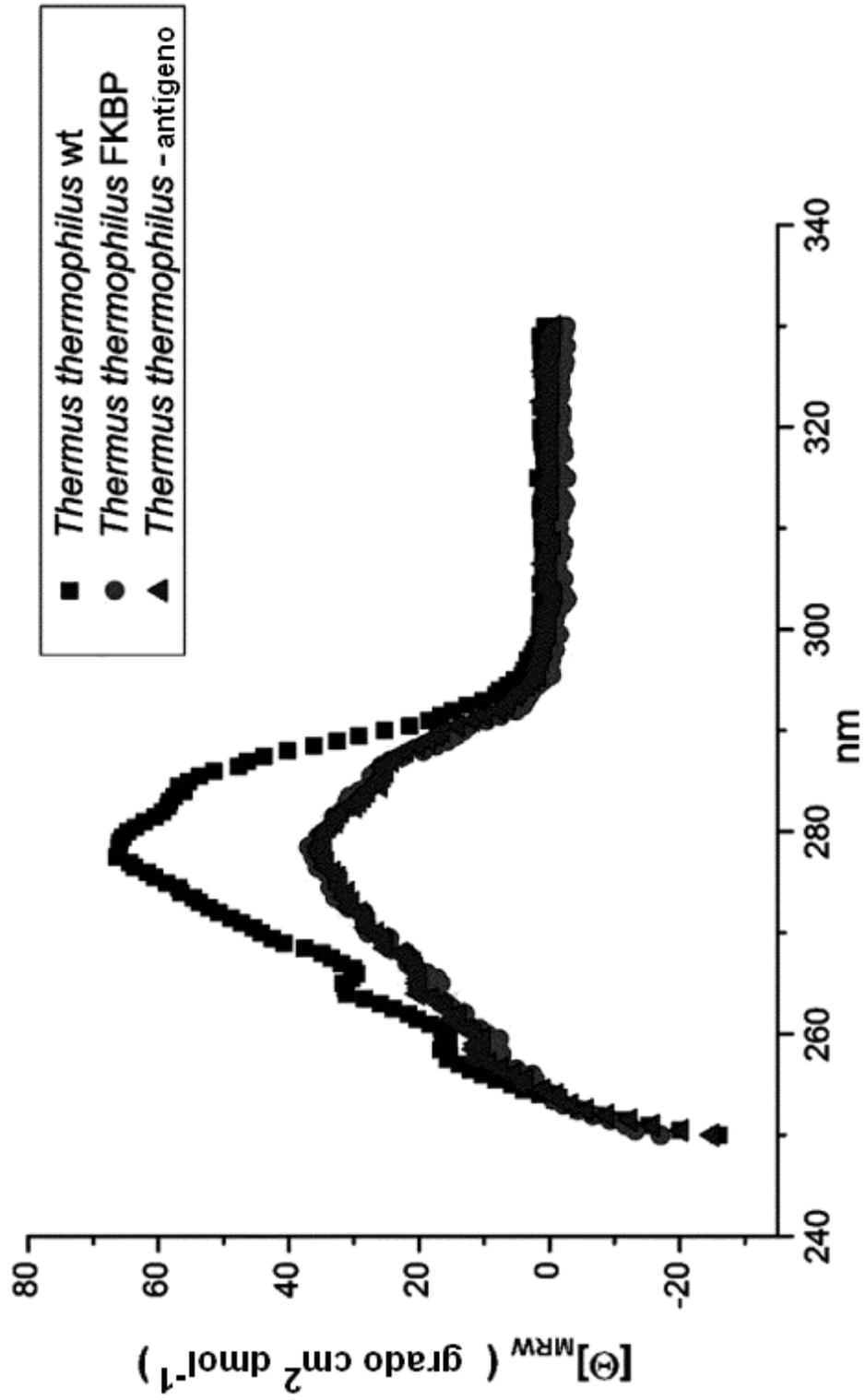


Fig. 38

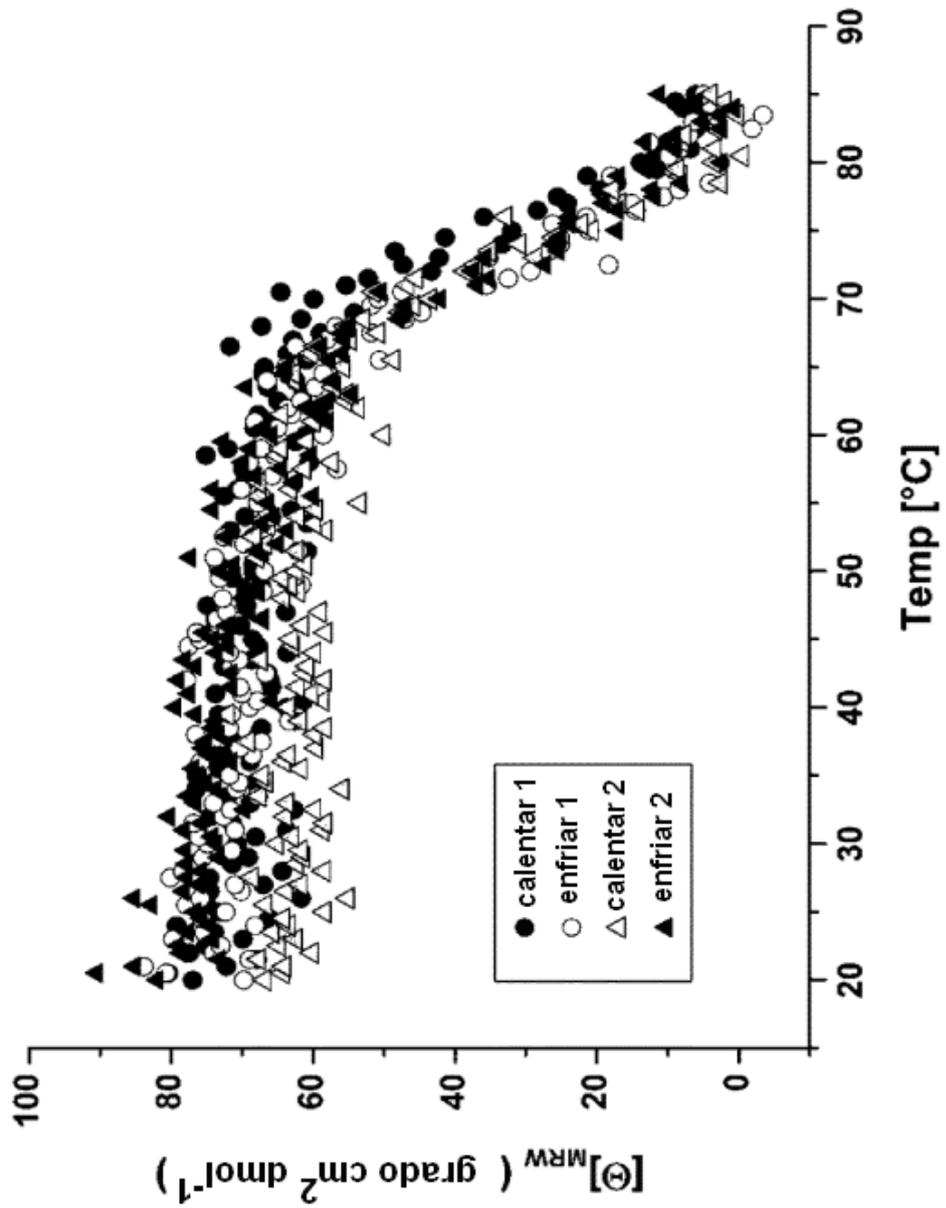


Fig. 39

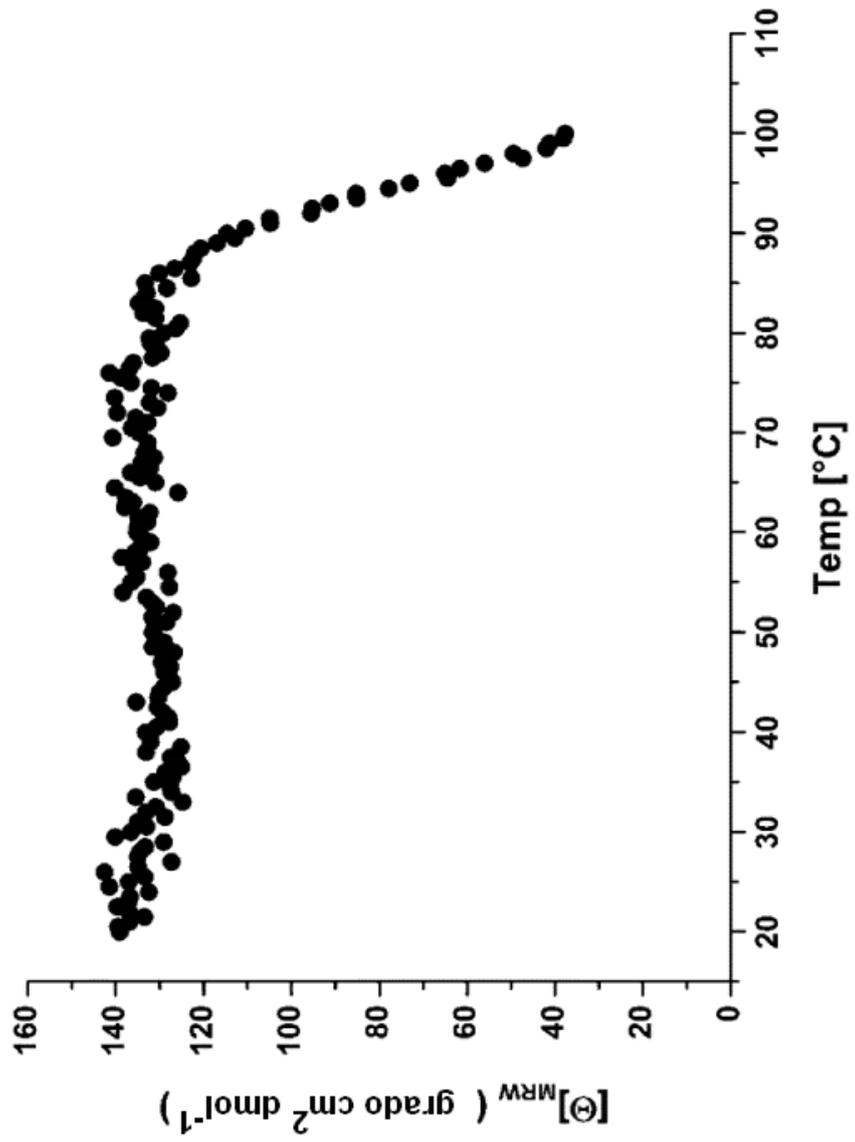
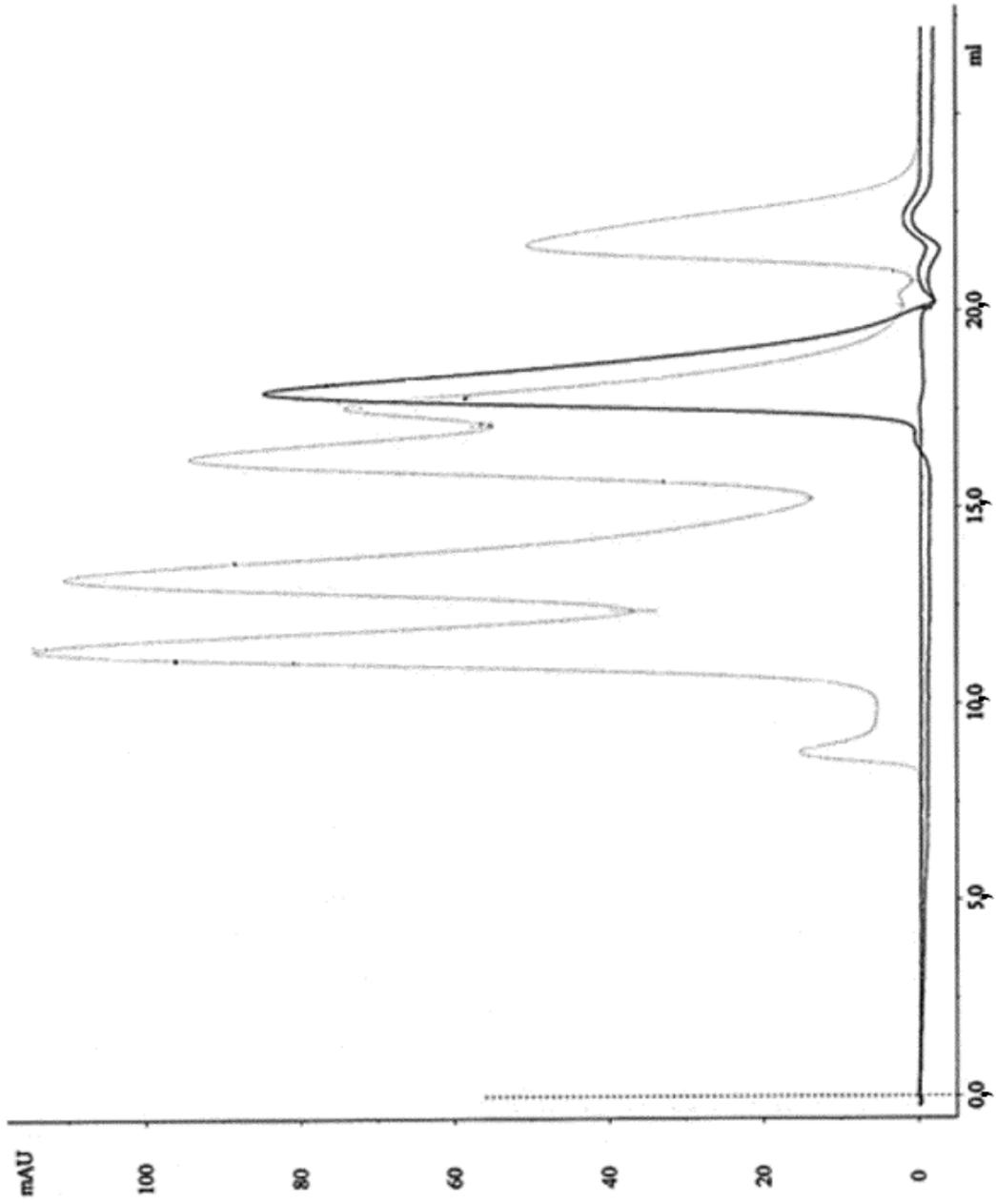
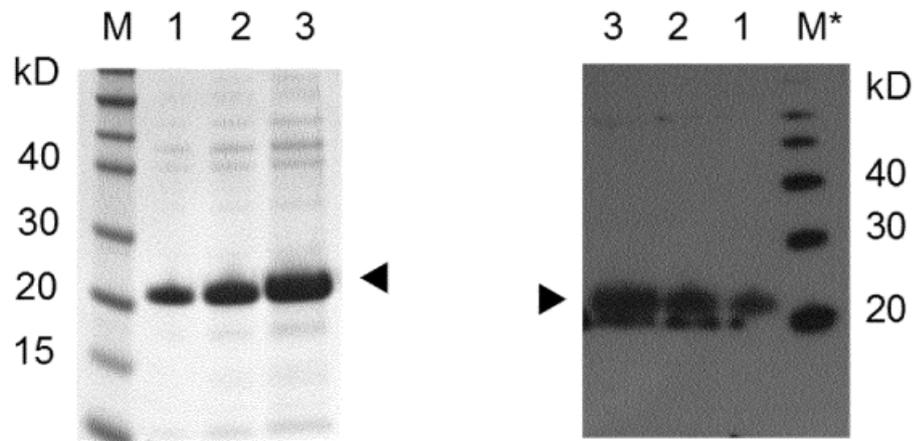


Fig. 40



**Fig. 41**



M - Novex Sharp Patrn  
1 - thermoSlyD-wt; 2,5µg  
2 - thermoSlyD-wt; 5,0µg  
3 - thermoSlyD-wt; 10µg  
M\* - MagicMark

PM: 18kD

**Fig. 42 A**

Ligando	Analito	BL [RU]	SL [RU]	kd [1/s]	t/2 dis [min]
10.0.15	<b>IGF1</b>	22	22	<b>4,08E-05</b>	<b>283</b>
10.0.15	thermoSlyD-IGF-1	43	43	<b>3,66E-05</b>	<b>316</b>
10.0.15	thermoSlyD (tipo silvestre)	1	-1	n.d.	n.d.
10.0.15	<b>IGF2</b>	2	0	n.d.	n.d.
10.0.17	<b>IGF1</b>	9	8	<b>1,33E-04</b>	<b>87</b>
10.0.17	thermoSlyD-IGF-1	18	17	<b>1,25E-04</b>	<b>92</b>
10.0.17	thermoSlyD (tipo silvestre)	2	-1	n.d.	n.d.
10.0.17	<b>IGF2</b>	2	0	n.d.	n.d.
10.0.01	IGF1	4	2	<b>1,43E-03</b>	<b>8</b>
10.0.01	thermoSlyD-IGF-1	18	16	<b>4,21E-04</b>	<b>27</b>
10.0.01	thermoSlyD (tipo silvestre)	13	12	<b>1,39E-04</b>	<b>83</b>
10.0.01	IGF2	1	0	n.d.	n.d.
10.0.03	IGF1	16	12	<b>7,43E04</b>	<b>16</b>
10.0.03	thermoSlyD-IGF-1	35	31	<b>3,86E-04</b>	<b>30</b>
10.0.03	thermoSlyD (tipo silvestre)	3	1	n.d.	n.d.
10.0.03	IGF2	3	1	n.d.	n.d.
10.0.04	IGF1	6	5	<b>2,93E-04</b>	<b>39</b>
10.0.04	thermoSlyD-IGF-1	23	16	<b>6,58E-04</b>	<b>18</b>
10.0.04	thermoSlyD (tipo silvestre)	16	4	<b>2,40E-03</b>	<b>5</b>
10.0.04	IGF2	2	0	n.d.	n.d.
10.0.05	IGF1	7	6	<b>8,04E-04</b>	<b>14</b>
10.0.05	thermoSlyD-IGF-1	38	35	<b>3,02E-04</b>	<b>38</b>
10.0.05	thermoSlyD (tipo silvestre)	31	28	<b>1,96E-04</b>	<b>59</b>
10.0.05	IGF2	2	0	n.d.	n.d.
10.0.07	IGF1	18	13	<b>9,26E-04</b>	<b>12</b>
10.0.07	thermoSlyD-IGF-1	37	31	<b>5,08E-04</b>	<b>23</b>
10.0.07	thermoSlyD (tipo silvestre)	0	-2	n.d.	n.d.
10.0.07	IGF2	1	-1	n.d.	n.d.
10.0.08	IGF1	17	11	<b>1,31E-03</b>	<b>9</b>
10.0.08	thermoSlyD-IGF-1	35	29	<b>6,40E-04</b>	<b>18</b>
10.0.08	thermoSlyD (tipo silvestre)	2	1	n.d.	n.d.
10.0.08	IGF2	2	1	n.d.	n.d.

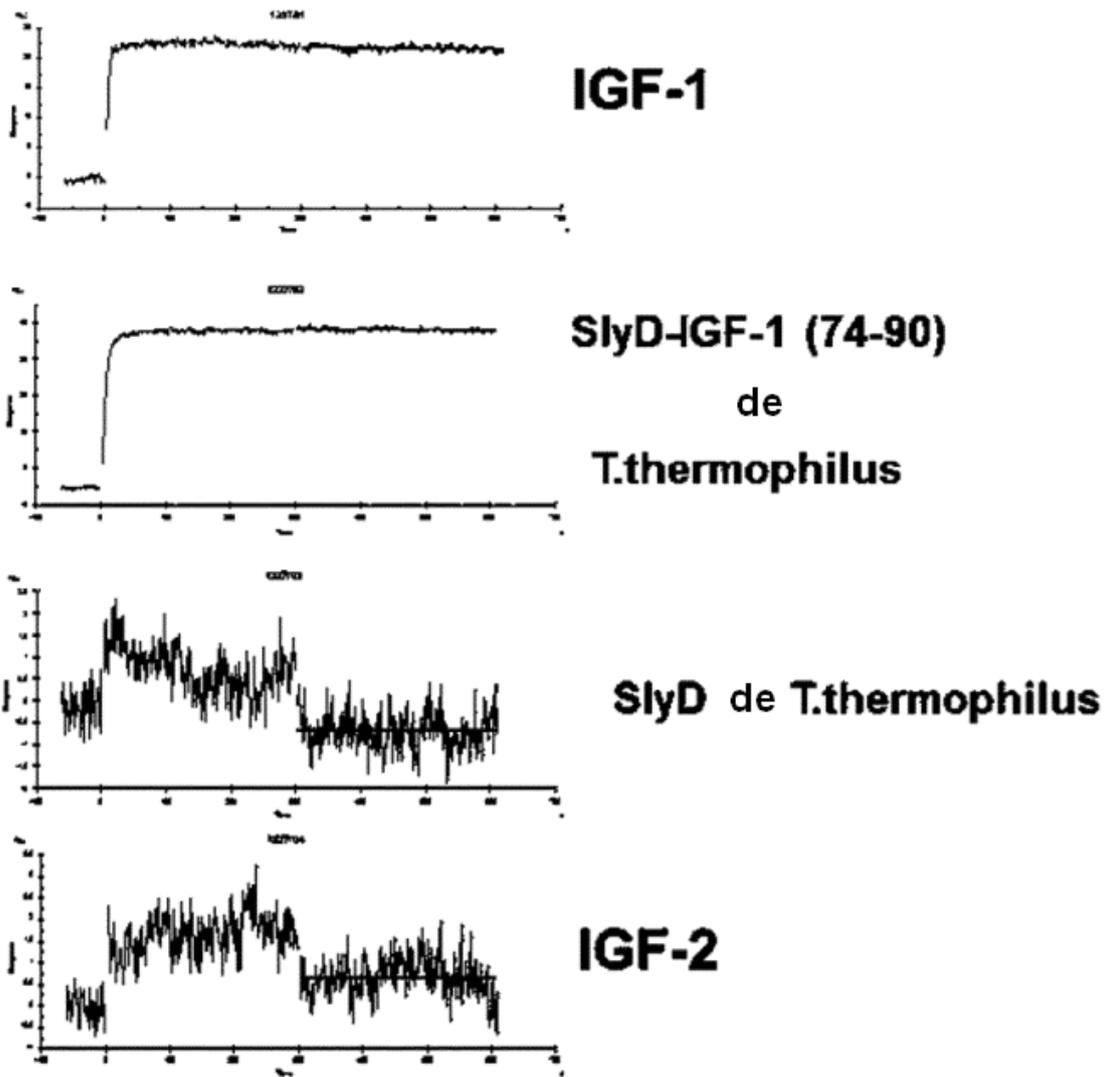
Fig. 42 B

3	2	1	M*	°C	$k_{10}$ 1/s	$t_{1/2}$ min
10.13			GF1	37	3,25E-04	36
10.13			GF2	37		
10.13			TS1/D-GF1	37	1,00E-05	1155
10.13			TS1/dwt	37		
10.23			GF1	37	6,80E-04	13
10.23			GF2	37		
10.23			TS1/D-GF1	37	1,00E-05	1155
10.23			TS1/dwt	37		
10.37			GF1	37	1,18E-03	10
10.37			GF2	37		
10.37			TS1/D-GF1	37	1,00E-05	1155
10.37			TS1/dwt	37		
10.47			GF1	37	1,00E-05	1155
10.47			GF2	37		
10.47			TS1/D-GF1	37	1,00E-05	1155
10.47			TS1/dwt	37		
10.58			GF1	37	1,00E-05	1155
10.58			GF2	37		
10.58			TS1/D-GF1	37	1,00E-05	1155
10.58			TS1/dwt	37		
10.68			GF1	37	1,25E-04	92
10.68			GF2	37		
10.68			TS1/D-GF1	37	1,00E-05	1155
10.68			TS1/dwt	37		
10.79			GF1	37	1,00E-05	1155
10.79			GF2	37		
10.79			TS1/D-GF1	37	1,00E-05	1155
10.79			TS1/dwt	37		
10.89			GF1	37	1,00E-05	1155
10.89			GF2	37		
10.89			TS1/D-GF1	37	1,00E-05	1155
10.89			TS1/dwt	37		
11.9.15			GF1	37	1,00E-05	1155
11.9.15			GF2	37		
11.9.15			TS1/D-GF1	37	1,00E-05	1155
11.9.15			TS1/dwt	37		
11.10.15			GF1	37	1,00E-05	1155
11.10.15			GF2	37		
11.10.15			TS1/D-GF1	37	1,00E-05	1155
11.10.15			TS1/dwt	37		
11.11.17			GF1	37	1,00E-05	1155
11.11.17			GF2	37		
11.11.17			TS1/D-GF1	37	1,00E-05	1155
11.11.17			TS1/dwt	37		
11.12.17			GF1	37	1,00E-05	1155
11.12.17			GF2	37		
11.12.17			TS1/D-GF1	37	1,00E-05	1155
11.12.17			TS1/dwt	37		

Fig. 43

pAb	Ag	°C	$k_a$ 1/MS	$k_d$ 1/s	$t_{1/2}$ -dis min	$K_A$ Vmol	$K_D$ M	$K_D$ nM
10.1.3	IGF1	37	1,8E+06	6,0E-03	2	3,1E+08	3,3E-09	3,3
10.2.3	IGF1	37	1,2E+06	5,9E-03	2	2,0E+08	5,1E-09	5,1
10.3.7	IGF1	37	1,6E+06	6,0E-03	2	2,6E+08	3,8E-09	3,8
10.4.7	IGF1	37	1,5E+06	6,2E-03	2	2,3E+08	4,3E-09	4,3
10.5.8	IGF1	37	1,7E+06	6,7E-03	2	2,6E+08	3,9E-09	3,9
10.6.8	IGF1	37	1,5E+06	6,2E-03	2	2,4E+08	4,2E-09	4,2
10.7.9	IGF1	37	1,3E+06	6,0E-03	2	2,2E+08	4,5E-09	4,5
10.8.9	IGF1	37	1,7E+06	6,8E-03	2	2,4E+08	4,1E-09	4,1
11.9.15	IGF1	37	3,0E+06	2,8E-04	41	1,1E+10	9,4E-11	0,1
11.10.15	IGF1	37	2,2E+06	1,7E-04	68	1,3E+10	7,7E-11	0,1
11.11.17	IGF1	37	3,1E+06	1,4E-04	81	2,2E+10	4,6E-11	0,0
11.12.17	IGF1	37	2,9E+06	1,8E-04	64	1,6E+10	6,2E-11	0,1

Fig. 44



*sensogramas a modo ejemplo para <IGF-1>M-11.0.15*

**Fig. 45**

