

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 743 448**

51 Int. Cl.:

C12N 15/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.04.2016 PCT/EP2016/058989**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.10.2016 WO16170101**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.04.2016 E 16718650 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.06.2019 EP 3286314**

54 Título: **Procedimiento y composición del polipéptido de andamio de anticuerpo de vaca**

30 Prioridad:

23.04.2015 US 201562152004 P

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

19.02.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**ALBERT, THOMAS;
LYAMICHEV, VICTOR y
PATEL, JIGAR**

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 743 448 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

Procedimiento y composición del polipéptido de andamio de anticuerpo de vaca

5 CAMPO TÉCNICO

La presente invención se refiere a un procedimiento para seleccionar un péptido de interés usando un polipéptido de andamio de anticuerpo de vaca presentado en ARNm. La invención también se refiere al polipéptido de andamio de anticuerpo de vaca presentado en ARNm que comprende un péptido de interés y a una micromatriz de péptidos que comprende el polipéptido de andamio de anticuerpo de vaca que comprende un péptido de interés o a una micromatriz de péptidos que comprende un péptido de interés como se describe en el presente documento.

ANTECEDENTES

15 Con la identificación de vías celulares y dianas que desempeñan papeles clave en el metabolismo y la progresión de la enfermedad, la comprensión de los estados de enfermedad continúa expandiéndose exponencialmente. Sin embargo, nuestra capacidad para tratar enfermedades se queda rezagada debido a las limitaciones inherentes a las plataformas de fármacos existentes. En la actualidad, las plataformas de fármacos disponibles se basan principalmente en moléculas pequeñas y proteínas terapéuticas, que abordan solo alrededor de un 10 a un 20 por

20 ciento de las dianas terapéuticas identificadas para el tratamiento de enfermedades. La mayoría de las dianas y enfermedades son actualmente "no quimiomodulables" usando las modalidades terapéuticas existentes.

Los péptidos combinan la alta especificidad de los fármacos biológicos con la biodisponibilidad de las moléculas pequeñas y, por tanto, ofrecen oportunidades interesantes para abordar dianas difíciles para el tratamiento de

25 enfermedades. De hecho, los péptidos han demostrado ser eficaces cuando se usan para dirigirse a receptores extracelulares y se han realizado numerosos esfuerzos para usar péptidos para modular los procesos intracelulares. Sin embargo, todavía quedan grandes desafíos, ya que los péptidos se metabolizan rápidamente por enzimas proteolíticas y, típicamente, no atraviesan fácilmente las membranas celulares.

30 Con su rigidez conformacional, los péptidos cíclicos son sumamente prometedores para superar estas limitaciones. Los péptidos cíclicos son cadenas polipeptídicas que adoptan una estructura en anillo cíclico. La estructura en anillo se puede formar uniendo un extremo del péptido con el otro con un enlace amida, u otros enlaces químicamente estables tal como lactona, éter, tioéter, disulfuro, etc. La rigidez de los péptidos cíclicos disminuye la energía libre y, por lo tanto, permite la unión potenciada a moléculas diana. Además, debido a su falta de extremos libres, los péptidos

35 cíclicos son más resistentes a la digestión. Además, previamente se ha demostrado que los péptidos cíclicos tienen una mejor capacidad de penetración celular que sus homólogos lineales. Estas propiedades excepcionales han hecho que los péptidos cíclicos sean candidatos atractivos para el descubrimiento de fármacos. En el pasado, se han aislado péptidos cíclicos de grandes colecciones combinatorias usando herramientas de cribado de colecciones, tales como la presentación en fagos y la presentación en ARNm. La presentación en ARNm es una posibilidad atractiva para el

40 cribado de péptidos debido a su naturaleza *in vitro*, el gran tamaño de la colección y la capacidad de incluir aminoácidos naturales, no naturales y modificados. *) véase la página 2a

SUMARIO

45 Los solicitantes han creado novedosos procedimientos de presentación y selección para péptidos cíclicos usando un polipéptido de andamio de anticuerpo de vaca para presentar una colección de péptidos de una manera estructuralmente restringida. Los anticuerpos bovinos tienen las regiones CDR H3 más largas que se conocen actualmente, con un subconjunto ultralargo que varía en longitud de 50 a 67 aminoácidos. Estas regiones CDR H3 inusuales a menudo tienen múltiples cisteínas y confieren una novedosa conformación de tallo y botón. Adoptando las

50 secuencias excepcionales que codifican la región de tallo y botón, los solicitantes han creado polipéptidos de andamio de anticuerpos de vaca que pueden presentar péptidos confinados utilizando el compartimento de botón protuberante de los anticuerpos de vaca. El uso de los excepcionales polipéptidos de andamio de anticuerpos de vaca de los solicitantes con una gran versatilidad de péptidos puede no solo permitir la selección y optimización de tratamientos con péptidos cíclicos, sino también permitir la selección de péptidos cíclicos que pueden penetrar en las hendiduras

55 de la cúpula en la molécula diana (por ejemplo, una proteína) y se pueden unir con alta afinidad y especificidad debido a áreas contiguas de complementariedad en la superficie.

En un modo de realización, se proporciona un procedimiento para seleccionar un péptido de interés. El procedimiento comprende las etapas de a) preparar una colección de péptidos usando un polipéptido de andamio de anticuerpo de vaca presentado en ARNm que comprende el péptido de interés que se va a identificar, b) seleccionar el péptido de

60 interés de la colección de péptidos poniendo en contacto una molécula diana con el péptido de interés en el que la molécula diana se inmoviliza sobre un soporte sólido o está en solución y c) identificar la secuencia de aminoácidos del péptido de interés.

65 En otro modo de realización, se proporciona un polipéptido de andamio de anticuerpo de vaca presentado en ARNm que comprende un péptido de interés.

Aún en otro modo de realización, se proporciona una micromatriz de péptidos que comprende un polipéptido de andamio de anticuerpo de vaca que comprende un péptido de interés. En otro modo de realización, se proporciona una micromatriz de péptidos que comprende un péptido de interés como se describe en el presente documento.

5 Varios modos de realización de la invención también se describen mediante las siguientes cláusulas enumeradas:

1. Un procedimiento para seleccionar un péptido de interés, comprendiendo el procedimiento las etapas de

10 a) preparar una colección de péptidos usando un polipéptido de andamio de anticuerpo de vaca presentado en ARNm que comprende el péptido de interés que se va a identificar;

b) seleccionar el péptido de interés de la colección de péptidos poniendo en contacto una molécula diana con el péptido de interés en el que la molécula diana se inmoviliza sobre un soporte sólido o está en solución; e

15 c) identificar la secuencia de aminoácidos del péptido de interés.

2. El procedimiento de la cláusula 1, en el que la etapa de preparación de la colección de péptidos comprende la etapa de transcripción *in vitro* de una colección de ADN para formar una colección de ARNm.

20 3. El procedimiento de la cláusula 2, que comprende además la etapa de digerir la colección de ADN con DNasa.

4. El procedimiento de la cláusula 2 o 3, que comprende además la etapa de conjugar el ARNm de la colección de ARNm con un conector oligonucleotídico de puromicina.

25 5. El procedimiento de una cualquiera de las cláusulas 2 a 4, que comprende además la etapa de traducir *in vitro* el ARNm de la colección de ARNm para formar conjugados de fusión de polipéptido de andamio de anticuerpo de vaca-ARNm que comprenden el polipéptido de andamio de anticuerpo de vaca en el que el polipéptido de andamio de anticuerpo de vaca comprende una marca de purificación.

30 6. El procedimiento de la cláusula 5, que comprende además la etapa de purificar los conjugados de fusión de polipéptido de andamio de anticuerpo de vaca-ARNm usando la marca de purificación.

35 7. El procedimiento de la cláusula 5 o 6, que comprende además la etapa de retrotranscribir el ARNm de la colección de ARNm para formar híbridos de ARNm-ADN de los conjugados de fusión de polipéptido de andamio de anticuerpo de vaca-ARNm.

40 8. El procedimiento de la cláusula 7, en el que la etapa de selección comprende poner en contacto los híbridos de ARNm-ADN de los conjugados de fusión de polipéptido de andamio de anticuerpo de vaca-ARNm con la molécula diana.

9. El procedimiento de la cláusula 8, que comprende además la etapa de regenerar el ADN de los híbridos de ARNm-ADN de los conjugados de fusión de polipéptido de andamio de anticuerpo de vaca-ARNm.

45 10. El procedimiento de una cualquiera de las cláusulas 2 a 9, en el que la colección de ADN es una colección de ADNc.

50 11. El procedimiento de una cualquiera de las cláusulas 2 a 10, en el que la transcripción *in vitro* se realiza usando ARN polimerasa T7.

12. El procedimiento de una cualquiera de las cláusulas 4 a 11, en el que el conector oligonucleotídico de puromicina se une al ARNm en el extremo 3' del ARNm.

55 13. El procedimiento de una cualquiera de las cláusulas 5 a 12, en el que la marca de purificación es una marca FLAG.

14. El procedimiento de una cualquiera de las cláusulas 2 a 13, en el que los miembros de la colección de ADN comprenden una secuencia promotora de ARN polimerasa, una secuencia potenciadora y una secuencia de marca de purificación.

60 15. El procedimiento de una cualquiera de las cláusulas 5 a 13, en el que la marca de purificación es una marca C terminal.

65 18. El polipéptido de andamio de anticuerpo de vaca tiene que comprender la secuencia MGCTSVHQETKKYQS(X*)_cSYTYNYEHVDVWGCGSADYKDDDDKKK (SEQ ID NO: 3) en el que (X*)_c es una secuencia de aminoácidos aleatoria, y en el que X* es una secuencia de aminoácidos y c es el número de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos aleatoria.

19. El procedimiento de una cualquiera de las cláusulas 18 en el que X* comprende un aminoácido natural.

20. El procedimiento de una cualquiera de las cláusulas 18 en el que X* comprende un aminoácido no natural.

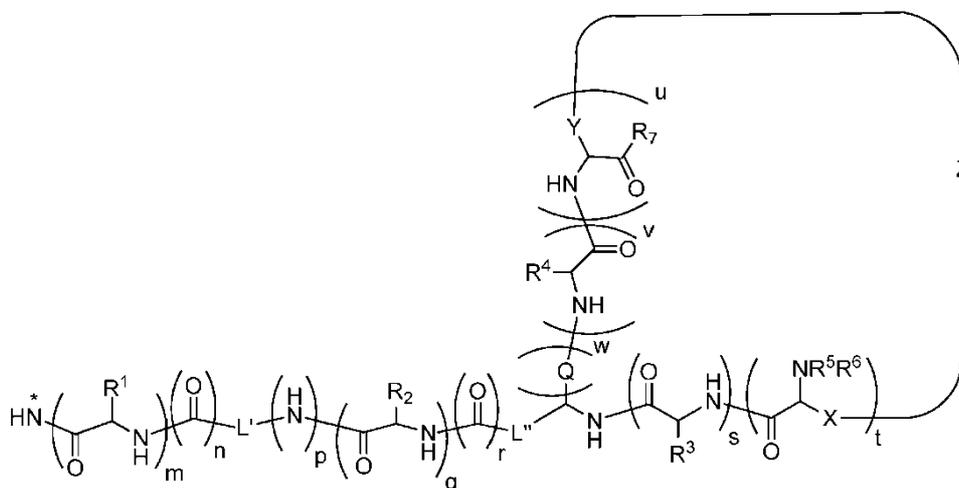
21. El procedimiento de una cualquiera de las cláusulas 18 a 20, en el que c es un número entero de 1 a 40.

22. El procedimiento de una cualquiera de las cláusulas 18 a 20, en el que c es un número entero de 1 a 10.

23. El procedimiento de una cualquiera de las cláusulas anteriores, que comprende además las etapas de:

a) sintetizar el péptido de interés, o derivados del mismo, en una primera micromatriz de péptidos, en el que los derivados del péptido de interés incluyen al menos una alteración en la secuencia del péptido de interés seleccionada de una única sustitución aminoacídica, una doble sustitución aminoacídica, una delección de uno o más aminoácidos, y una inserción de uno o más aminoácidos, con lo que se generan péptidos funcionalizados en la primera micromatriz de péptidos;

b) formar a partir de los péptidos funcionalizados, en los que los péptidos funcionalizados están en forma lineal, péptidos cíclicos de fórmula I

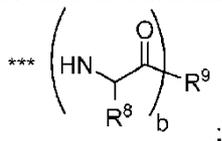


I

en la que cada R¹, R², R³ y R⁴ es independientemente una cadena lateral de aminoácido natural o una cadena lateral de aminoácido no natural;

cada R⁵ y R⁶ se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, un grupo de caperuza N terminal y un grupo protector N terminal;

R⁷ se selecciona del grupo que consiste en -OH, un grupo de caperuza C terminal, un grupo protector C terminal, y



cada R⁸ es independientemente una cadena lateral de aminoácido natural o una cadena lateral de aminoácido no natural;

R⁹ se selecciona del grupo que consiste en -OH, un grupo de caperuza C terminal y un grupo protector C terminal;

Q se selecciona del grupo que consiste en un enlace, un carbonilo, una cadena lateral de aminoácido natural y una cadena lateral de aminoácido no natural;

cada X e Y se selecciona independientemente del grupo que consiste en un enlace, una cadena lateral de aminoácido natural unida covalentemente a Z y una cadena lateral de aminoácido no natural unida covalentemente a Z;

Z es un grupo que comprende un resto seleccionado del grupo que consiste en un enlace amida, un enlace disulfuro, un enlace isopeptídico, un 1,2,3-triazol y una 1,2-quinona opcionalmente sustituida;

cada L' y L'' es independientemente un grupo de unión bivalente opcional o un enlace;

5

b es un número entero de 0 a 50;

m es un número entero de 0 a 6;

10 n es 0 o 1;

p es 0 o 1;

15 q es un número entero de 0 a 6;

r es 0 o 1;

s es un número entero de 0 a 100;

20 t es 0 o 1;

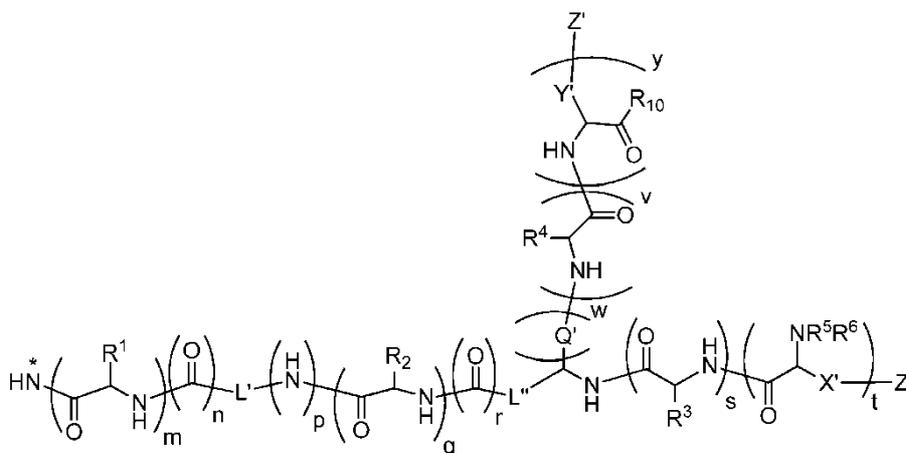
u es 0 o 1;

v es un número entero de 0 a 100;

25

w es 0 o 1; y * es un punto de conexión que conecta el péptido cíclico a un soporte de matriz que tiene una superficie reactiva; y *** es un punto de conexión con el resto del péptido funcionalizado;

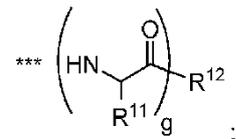
30 comprendiendo el procedimiento la etapa de hacer reaccionar un péptido funcionalizado de fórmula II en condiciones que hacen que se forme Z



II

35 en la que R¹, R², R³, R⁴, R⁵, R⁶, m, n, p, q, r, s, t, v, w, L', L'', * y *** son como se define para la fórmula I;

R¹⁰ se selecciona del grupo que consiste en -OH, un grupo de caperuza C terminal, un grupo protector C terminal, y



40 cada R¹¹ es independientemente una cadena lateral de aminoácido natural o una cadena lateral de aminoácido no natural;

R¹² se selecciona del grupo que consiste en -OH, un grupo de caperuza C terminal y un grupo protector C terminal;

Q' se selecciona del grupo que consiste en un enlace, un carbonilo, una cadena lateral de aminoácido natural unida covalentemente a Z" y una cadena lateral de aminoácido no natural unida covalentemente a Z";

5 X' se selecciona del grupo que consiste en un enlace, una cadena lateral de aminoácido natural unida covalentemente a Z" y una cadena lateral de aminoácido no natural unida covalentemente a Z";

Y' se selecciona del grupo que consiste en un enlace, una cadena lateral de aminoácido natural unida covalentemente a Z' y una cadena lateral de aminoácido no natural unida covalentemente a Z';

10 cada Z' y Z" se selecciona independientemente del grupo que consiste en un enlace, -OH, hidrógeno, un tiol, una amina, un ácido carboxílico, una amida, un alquino, una acida, un aminofenol opcionalmente sustituido, una cadena lateral de aminoácido natural, una cadena lateral de aminoácido no natural, un grupo protector N terminal y un grupo protector C terminal, siempre que Z' y Z" sean grupos complementarios que se combinen para formar Z;

15 g es un número entero de 0 a 50; e

y es 0 o 1;

en el que los péptidos funcionalizados y los péptidos cíclicos se inmovilizan en la superficie reactiva;

20 c) exponer los péptidos cíclicos a la molécula diana, con lo que la molécula diana se une a al menos un péptido cíclico;

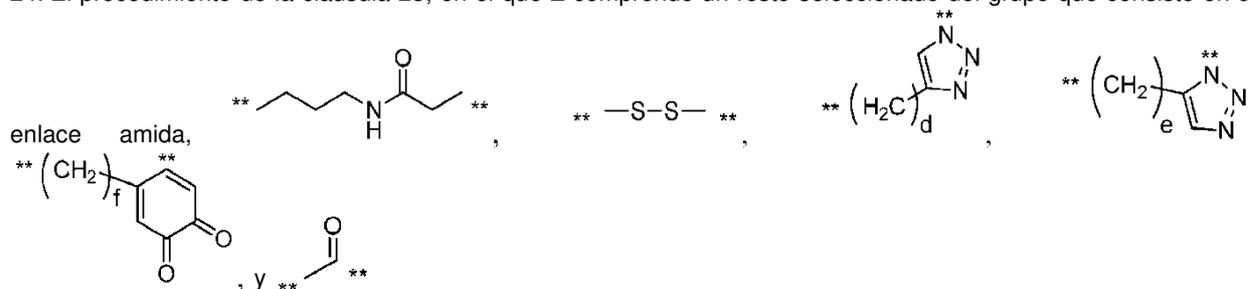
d) identificar uno o más de los péptidos cíclicos que demuestran una fuerte unión a la molécula diana, con lo que se determina una secuencia de unión al núcleo madurada;

25 e) realizar al menos una de la extensión N terminal y C terminal de la secuencia de unión al núcleo madurada determinada en la etapa d para proporcionar una secuencia de unión al núcleo extendida y madurada en una segunda micromatriz de péptidos;

30 f) exponer la molécula diana a la segunda micromatriz de péptidos que comprende una población de péptidos de la secuencia de unión al núcleo extendida y madurada generados en la etapa e en la que la población de péptidos de la secuencia de unión al núcleo extendida y madurada comprende péptidos cíclicos formados como en la etapa b; e

g) identificar un péptido cíclico extendido y madurado con una fuerte unión a la molécula diana.

35 24. El procedimiento de la cláusula 23, en el que Z comprende un resto seleccionado del grupo que consiste en un



40 en el que d es un número entero de 0 a 6, e es un número entero de 0 a 6 y f es un número entero de 0 a 6, y ** es un punto de conexión con el resto del péptido cíclico.

45 25. El procedimiento de la cláusula 23 o 24, en el que Z comprende un enlace peptídico, Z" comprende un grupo protector N terminal, t es 0, u es 0 e y es 0.

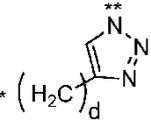
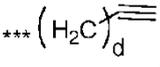
26. El procedimiento de la cláusula 25, que comprende además eliminar Z" del resto del péptido funcionalizado para provocar que se forme el enlace peptídico.

50 27. El procedimiento de la cláusula 23 o 24, en el que Q y X son enlaces a Z, Z comprende ** -S-S- **, X' es un enlace a Z", Q' es un enlace a Z', Z' y Z" comprenden cadenas laterales de cisteína, t es 1, u es 0, v es 0, w es 1 e y es 0.

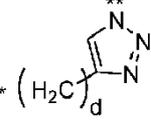
28. El procedimiento de la cláusula 27, que comprende además someter el péptido funcionalizado a condiciones oxidativas para provocar que se forme ** -S-S- **.

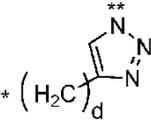
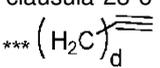
55 29. El procedimiento de la cláusula 23 o 24, en el que X e Y son enlaces a Z, Z comprende ** -S-S- **, X' es un enlace a Z", Y' es un enlace a Z', Z' y Z" comprenden cadenas laterales de cisteína, t es 1, u es 1 e y es 1.

30. El procedimiento de la cláusula 29, que comprende además someter el péptido funcionalizado a condiciones oxidativas para provocar que se forme $^{**} -S-S- ^{**}$.

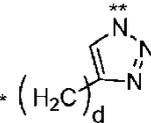
5 31. El procedimiento de la cláusula 23 o 24, en el que Q es un enlace a Z, Z comprende $^{**} (H_2C)_d$ , Q' es un enlace a Z', Z' comprende $^{***} (H_2C)_d$ , Z'' comprende una acida, d es 1, u es 0, v es 0, w es 1 e y es 0.

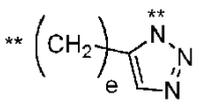
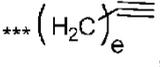
32. El procedimiento de la cláusula 31, que comprende además poner en contacto el péptido funcionalizado con un

catalizador de cobre para provocar que se forme $^{**} (H_2C)_d$ .

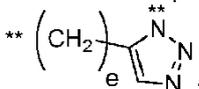
10 33. El procedimiento de la cláusula 23 o 24, en el que Y es un enlace a Z, Z comprende $^{**} (H_2C)_d$ , Y' es un enlace a Z', Z' comprende $^{***} (H_2C)_d$ , Z'' comprende una acida, d es 1, u es 1 e y es 1.

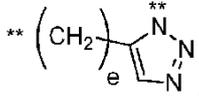
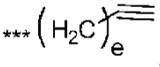
34. El procedimiento de la cláusula 33, que comprende además poner en contacto el péptido funcionalizado con un

15 catalizador de cobre para provocar que se forme $^{**} (H_2C)_d$ .

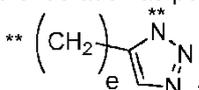
35. El procedimiento de la cláusula 23 o 24, en el que Q es un enlace a Z, Z comprende $^{**} (CH_2)_e$ , Q' es un enlace a Z', Z' comprende $^{***} (H_2C)_e$ , Z'' comprende una acida, e es 1, u es 0, v es 0, w es 1 e y es 0.

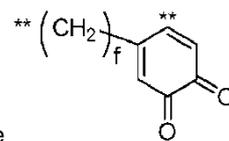
36. El procedimiento de la cláusula 35, que comprende además poner en contacto el péptido funcionalizado con un

20 catalizador de cobre para provocar que se forme $^{**} (CH_2)_e$ .

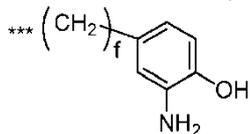
37. El procedimiento de la cláusula 23 o 24, en el que Y es un enlace a Z, Z comprende $^{**} (CH_2)_e$ , Y' es un enlace a Z', Z' comprende $^{***} (H_2C)_e$ , Z'' comprende una acida, e es 1, u es 1 e y es 1.

38. El procedimiento de la cláusula 37, que comprende además poner en contacto el péptido funcionalizado con un

catalizador de cobre para provocar que se forme $^{**} (CH_2)_e$ .



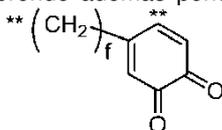
39. El procedimiento de la cláusula 23 o 24, en el que Q es un enlace a Z, Z comprende



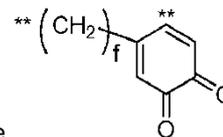
un enlace a Z', Z' comprende 0.

, Z'' comprende una amina, f es 1, u es 0, v es 0, w es 1 e y es

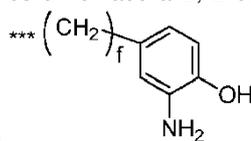
5 40. El procedimiento de la cláusula 39, que comprende además poner en contacto el péptido funcionalizado con



ferricianuro de potasio para provocar que se forme



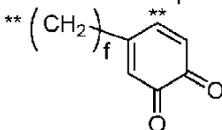
41. El procedimiento de la cláusula 23 o 24, en el que Y es un enlace a Z, Z comprende



comprende una amina, Y' es un enlace a Z', Z' comprende

, f es 1, u es 1 e y es 1.

10 42. El procedimiento de la cláusula 41, que comprende además poner en contacto el péptido funcionalizado con



ferricianuro de potasio para provocar que se forme

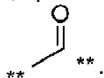
43. El procedimiento de la cláusula 23 o 24, en el que R⁴, R¹⁰ y R¹¹ se definen de modo que el péptido funcionalizado



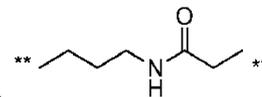
15 comprende una secuencia de reconocimiento de butelasa 1, Y es un enlace a Z, Z comprende **, Y' es un enlace a Z', Z' es una cadena lateral de asparagina o ácido aspártico, u es 1 e y es 1.

44. El procedimiento de la cláusula 43, que comprende además poner en contacto el péptido funcionalizado con

butelasa 1 para provocar que se forme **.



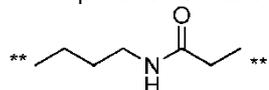
20

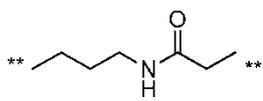


45. El procedimiento de la cláusula 23 o 24, en el que Q y X son enlaces a Z, Z comprende Q' es un enlace a Z', X' es un enlace a Z'', Z' es una cadena lateral de glutamina y Z'' es una cadena lateral de lisina o Z' es una cadena lateral de lisina y Z'' es una cadena lateral de glutamina, t es 1, u es 0, v es 0, w es 1 e y es 0.

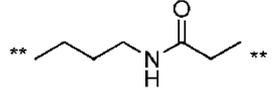
25 46. El procedimiento de la cláusula 45, que comprende además poner en contacto el péptido funcionalizado con una

transglutaminasa microbiana para provocar que se forme



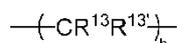
47. El procedimiento de la cláusula 23 o 24, en el que X e Y son enlaces a Z, Z comprende , X' es un enlace a Z'', Y' es un enlace a Z', Z' es una cadena lateral de glutamina y Z'' es una cadena lateral de lisina o Z' es una cadena lateral de lisina y Z'' es una cadena lateral de glutamina, t es 1, u es 1 e y es 1.

5 48. El procedimiento de la cláusula 47, que comprende además poner en contacto el péptido funcionalizado con una

transglutaminasa microbiana para provocar que se forme .

49. El procedimiento de una cualquiera de las cláusulas 23 a 48, en el que cada L' y L'' es independientemente de la fórmula V

10

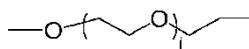


V

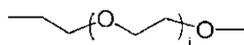
en la que cada R¹³ y R^{13'} se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, D, halógeno, alquilo C₁–C₆, alqueniilo C₂–C₆, alquinilo C₂–C₆, cicloalquilo C₃–C₆, heterocicloalquilo de 3 a 7 miembros, arilo C₆–C₁₀, heteroarilo de 5 a 7 miembros, –OR¹⁴, –OC(O)R¹⁴, –NR¹⁴R^{14'}, –NR¹⁴C(O)R¹⁵, –C(O)R¹⁴, –C(O)OR¹⁴ y –C(O)NR¹⁴R^{14'}, en el que cada átomo de hidrógeno en alquilo C₁–C₆, alqueniilo C₂–C₆, alquinilo C₂–C₆, cicloalquilo C₃–C₆, heterocicloalquilo de 3 a 7 miembros, arilo C₆–C₁₀ y heteroarilo de 5 a 7 miembros está independientemente sustituido opcionalmente con halógeno, alquilo C₁–C₆, alqueniilo C₂–C₆, alquinilo C₂–C₆, –OR¹⁶; cada R¹⁴, R^{14'}, R¹⁵ y R¹⁶ se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, D, hidroxilo, alquilo C₁–C₇, alqueniilo C₂–C₇, alquinilo C₂–C₇, cicloalquilo C₃–C₆, heterocicloalquilo de 3 a 7 miembros, arilo C₆–C₁₀ y heteroarilo de 5 a 7 miembros; y h es un número entero de 1 a 10; o la fórmula VI o VII

15

20



VI



VII

25

en la que j es un número entero de 0 a 30.

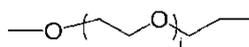
30

50. El procedimiento de la cláusula 49, en el que cada R¹³ y R^{13'} es hidrógeno.

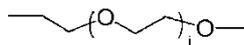
51. El procedimiento de la cláusula 49 o 50, en el que L' está presente, h es 5, m es 0, n es 1 y p es 1.

52. El procedimiento de la cláusula 49, en el que al menos uno de L' y L'' es de la fórmula VI o VII

35



VI



VII

40

en la que j es 7.

53. El procedimiento de una cualquiera de las cláusulas 23 a 52, en el que el grupo protector N terminal es un grupo fotoprotector.

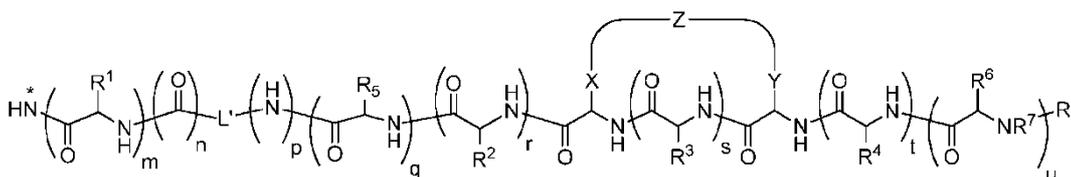
54. El procedimiento de una cualquiera de las cláusulas 23 a 53, en el que el grupo protector N terminal es 2-(2-nitrofenil)propiloxicarbonilo.

55. El procedimiento de una cualquiera de las cláusulas 1 a 22 que comprende además la etapa de sintetizar el polipéptido de andamio de anticuerpo de vaca en una o más micromatrices de péptidos en las que el polipéptido de andamio de anticuerpo de vaca comprende el péptido de interés.

56. El procedimiento de la cláusula 55, que comprende las etapas de:

a) sintetizar el polipéptido de andamio de anticuerpo de vaca que comprende el péptido de interés, o derivados del péptido de interés, en una primera micromatriz de péptidos, en el que los derivados del péptido de interés incluyen al menos una alteración en la secuencia del péptido de interés seleccionada de una única sustitución aminoacídica, una doble sustitución aminoacídica, una deleción de uno o más aminoácidos, y una inserción de uno o más aminoácidos, con lo que se generan péptidos funcionalizados en la primera micromatriz de péptidos;

b) formar a partir de los péptidos funcionalizados, en los que los péptidos funcionalizados están en forma lineal, péptidos cíclicos de fórmula VIII



VIII

en la que cada R¹, R², R³ y R⁴ es independientemente una cadena lateral de aminoácido natural o una cadena lateral de aminoácido no natural;

cada R⁵ y R⁶ es independientemente una cadena lateral de aminoácido natural o una cadena lateral de aminoácido

no natural seleccionada de modo que pueden formar una lámina beta;

cada R⁷ se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, un grupo de caperuza N terminal y un grupo protector N terminal;

R⁸ se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, un grupo de caperuza N terminal y un grupo protector;

cada X e Y se selecciona independientemente del grupo que consiste en un enlace, una cadena lateral de aminoácido natural unida covalentemente a Z y una cadena lateral de aminoácido no natural unida covalentemente a Z;

Z es un grupo que comprende un resto seleccionado del grupo que consiste en un enlace amida, un enlace disulfuro, un enlace isopeptídico, un 1,2,3-triazol y una 1,2-quinona opcionalmente sustituida;

L¹ es un grupo de unión bivalente opcional o un enlace;

m es un número entero de 0 a 6;

n es 0 o 1;

p es 0 o 1;

q es un número entero de 0 a 50;

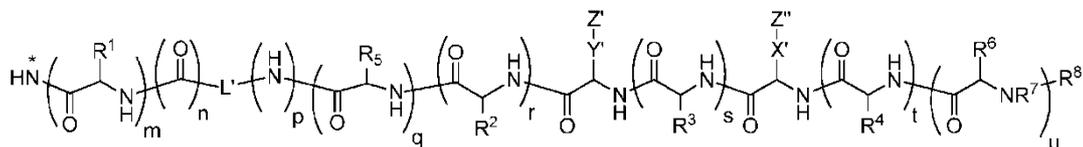
r es un número entero de 0 a 50;

s es un número entero de 0 a 50;

t es un número entero de 0 a 50;

u es un número entero de 0 a 50; y * es un punto de conexión que conecta el péptido cíclico a un soporte de matriz que tiene una superficie reactiva;

5 comprendiendo el procedimiento la etapa de hacer reaccionar un péptido funcionalizado de fórmula IX en condiciones que hacen que se forme Z



IX

10 en la que R¹, R², R³, R⁴, R⁵, R⁶, R⁷ y R⁸, m, n, p, q, r, s, t, u, L' y * son como se define para la fórmula VIII;

X' se selecciona del grupo que consiste en un enlace, una cadena lateral de aminoácido natural unida covalentemente a Z'' y una cadena lateral de aminoácido no natural unida covalentemente a Z'';

15 Y' se selecciona del grupo que consiste en un enlace, una cadena lateral de aminoácido natural unida covalentemente a Z' y una cadena lateral de aminoácido no natural unida covalentemente a Z'; y

20 cada Z' y Z'' se selecciona independientemente del grupo que consiste en un enlace, -OH, hidrógeno, un tiol, una amina, un ácido carboxílico, una amida, un alquino, una acida, un aminofenol opcionalmente sustituido, una cadena lateral de aminoácido natural, una cadena lateral de aminoácido no natural, un grupo protector N terminal y un grupo protector C terminal, siempre que Z' y Z'' sean grupos complementarios que se combinen para formar Z;

en el que los péptidos funcionalizados y los péptidos cíclicos se inmovilizan en la superficie reactiva;

25 c) exponer los péptidos cíclicos a la molécula diana, con lo que la molécula diana se une a al menos un péptido cíclico;

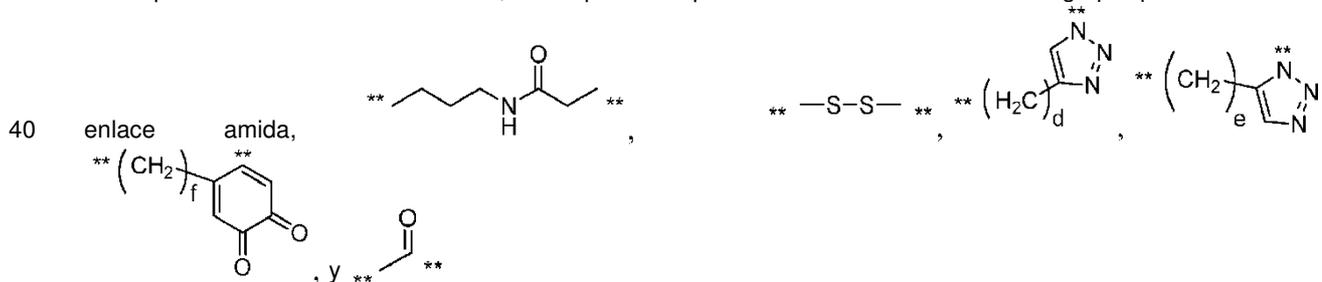
d) identificar uno o más de los péptidos cíclicos que demuestran una fuerte unión a la molécula diana, con lo que se determina una secuencia de unión al núcleo madurada;

30 e) realizar al menos una de la extensión N terminal y C terminal de la secuencia de unión al núcleo madurada determinada en la etapa d para proporcionar una secuencia de unión al núcleo extendida y madurada en una segunda micromatriz de péptidos;

35 f) exponer la molécula diana a la segunda micromatriz de péptidos que comprende una población de péptidos de la secuencia de unión al núcleo extendida y madurada generados en la etapa e en la que la población de péptidos de la secuencia de unión al núcleo extendida y madurada comprende péptidos cíclicos formados como en la etapa b; e

g) identificar un péptido cíclico extendido y madurado con una fuerte unión a la molécula diana.

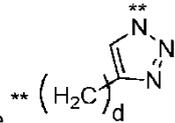
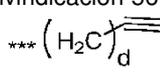
57. El procedimiento de la cláusula 56, en el que Z comprende un resto seleccionado del grupo que consiste en un

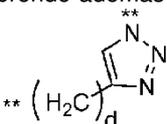


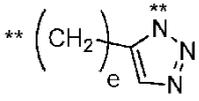
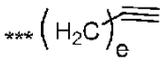
45 en el que d es un número entero de 0 a 6, e es un número entero de 0 a 6 y f es un número entero de 0 a 6, y ** es un punto de conexión con el resto del péptido cíclico.

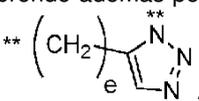
58. El procedimiento de la cláusula 56 o 57, en el que X e Y son enlaces a Z, Z comprende ** -S-S- **, X' es un enlace a Z'', Y' es un enlace a Z', y Z' y Z'' comprenden cadenas laterales de cisteína.

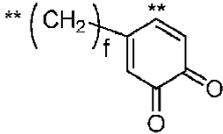
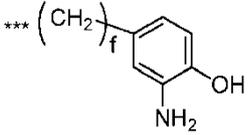
50 59. El procedimiento de la cláusula 58, que comprende además someter el péptido funcionalizado a condiciones oxidativas para provocar que se forme ** -S-S- **.

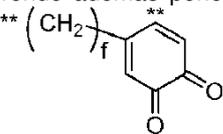
60. El procedimiento de la reivindicación 56 o 57, en el que Y es un enlace a Z, Z comprende , Y' es un enlace a Z', Z' comprende , Z'' comprende una acida y d es 1.

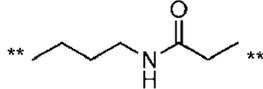
5 61. El procedimiento de la cláusula 60, que comprende además poner en contacto el péptido funcionalizado con un catalizador de cobre para provocar que se forme .

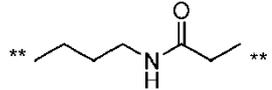
62. El procedimiento de la cláusula 56 o 57, en el que Y es un enlace a Z, Z comprende , Y' es un enlace a Z', Z' comprende , Z'' comprende una acida y e es 1.

10 63. El procedimiento de la cláusula 62, que comprende además poner en contacto el péptido funcionalizado con un catalizador de cobre para provocar que se forme .

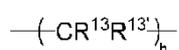
64. El procedimiento de la cláusula 56 o 57, en el que Y es un enlace a Z, Z comprende , Y' es un enlace a Z', Z' comprende , Z'' comprende una amina y f es 1.

15 65. El procedimiento de la cláusula 64, que comprende además poner en contacto el péptido funcionalizado con ferricianuro de potasio para provocar que se forme .

20 66. El procedimiento de la cláusula 56 o 57, en el que X e Y son enlaces a Z, Z comprende , X' es un enlace a Z'', Y' es un enlace a Z', y Z' es una cadena lateral de glutamina y Z'' es una cadena lateral de lisina o Z' es una cadena lateral de lisina y Z'' es una cadena lateral de glutamina.

25 67. El procedimiento de la cláusula 66, que comprende además poner en contacto el péptido funcionalizado con una transglutaminasa microbiana para provocar que se forme .

68. El procedimiento de una cualquiera de las cláusulas 56 a 67, en el que L' es de la fórmula (X)

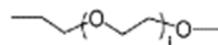


(X)

5 en la que cada R^{13} y $R^{13'}$ se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, D, halógeno, alquilo C_1-C_6 , alqueniilo C_2-C_6 , alquiniilo C_2-C_6 , cicloalquilo C_3-C_6 , heterocicloalquilo de 3 a 7 miembros, arilo C_6-C_{10} , heteroarilo de 5 a 7 miembros, $-OR^{14}$, $-OC(O)R^{14}$, $-NR^{14}R^{14'}$, $-NR^{14}C(O)R^{15}$, $-C(O)R^{14}$, $-C(O)OR^{14}$ y $-C(O)NR^{14}R^{14'}$, en el que cada átomo de hidrógeno en alquilo C_1-C_6 , alqueniilo C_2-C_6 , alquiniilo C_2-C_6 , cicloalquilo C_3-C_6 , heterocicloalquilo de 3 a 7 miembros, arilo C_6-C_{10} y heteroarilo de 5 a 7 miembros está independientemente sustituido opcionalmente con halógeno, alquilo C_1-C_6 , alqueniilo C_2-C_6 , alquiniilo C_2-C_6 , $-OR^{16}$; cada R^{14} , $R^{14'}$, R^{15} y R^{16} se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, D, hidroxilo, alquilo C_1-C_7 , alqueniilo C_2-C_7 , alquiniilo C_2-C_7 , cicloalquilo C_3-C_6 , heterocicloalquilo de 3 a 7 miembros, arilo C_6-C_{10} y heteroarilo de 5 a 7 miembros; y h es un número entero de 1 a 10; o la fórmula XI o XII



XI



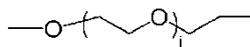
XII

15 en la que j es un número entero de 0 a 30.

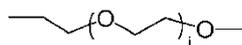
69. El procedimiento de la cláusula 68, en el que cada R^{13} y $R^{13'}$ es hidrógeno.

70. El procedimiento de la cláusula 68 o 69, en el que L' está presente, h es 5, m es 0, n es 1 y p es 1.

20 71. El procedimiento de la cláusula 68, en el que L' es de la fórmula XI o XII



XI



XII

25 en la que j es 7.

72. El procedimiento de una cualquiera de las cláusulas 56 a 71, en el que el grupo protector N terminal es un grupo fotoprotector.

30 73. El procedimiento de una cualquiera de las cláusulas 56 a 72, en el que el grupo protector N terminal es 2-(2-nitrofenil)propiloxycarbonilo.

35 74. El procedimiento de una cualquiera de las cláusulas 23 a 54 y 56 a 73, en el que se realiza al menos uno de un análisis sin marcador y uno de afinidad de los péptidos de secuencia de unión al núcleo extendidos y madurados.

75. El procedimiento de una cualquiera de las cláusulas 23 a 54 y 56 a 74, en el que la primera o segunda micromatriz de péptidos comprende al menos uno de compuesto de vidrio, plástico y carbono.

40 76. El procedimiento de una cualquiera de las cláusulas 23 a 54 y 56 a 75, en el que los péptidos funcionalizados y los péptidos cíclicos en la primera o la segunda micromatriz de péptidos comprenden el mismo número de aminoácidos.

45 77. El procedimiento de una cualquiera de las cláusulas 23 a 54 y 56 a 76, en el que los péptidos funcionalizados y los péptidos cíclicos en la primera o la segunda micromatriz de péptidos no incluyen el aminoácido cisteína o metionina, o los motivos de histidina-prolina-glutamina, o repeticiones de aminoácidos de 2 o más aminoácidos.

78. El procedimiento de una cualquiera de las cláusulas 23 a 54 y 56 a 77, en el que la población de péptidos de secuencia de unión al núcleo extendidos y madurados incluye al menos uno de un oligopéptido de síntesis con titubeo N terminal y un oligopéptido de síntesis con titubeo C terminal.

50

79. El procedimiento de una cualquiera de las cláusulas 23 a 54 y 56 a 78, en el que la primera o segunda micromatriz de péptidos comprende uno o más péptidos lineales y en el que el procedimiento comprende además la etapa de poner en contacto los uno o más péptidos lineales en la primera o segunda micromatriz de péptidos con una proteasa que pueda digerir los uno o más péptidos lineales.
80. El procedimiento de la cláusula 79, en el que la proteasa es una amino proteasa o una mezcla de amino proteasas.
81. El procedimiento de la cláusula 79 en el que la proteasa es dipeptidil peptidasa IV, aminopeptidasa m o una combinación de las mismas.
82. Un polipéptido de andamio de anticuerpo de vaca presentado en ARNm que comprende un péptido de interés.
83. El polipéptido de andamio de anticuerpo de vaca presentado en ARNm de la cláusula 82 que comprende la secuencia **MGCTSVHQETKKYQS(X*)_c.SYTYNYEHVDVWGCG** (SEQ ID NO: 1) en el que (X*)_c es una secuencia de aminoácidos aleatoria, y en el que X* es una secuencia de aminoácidos y c es el número de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos aleatoria.
84. El polipéptido de andamio de anticuerpo de vaca presentado en ARNm de la cláusula 82 que comprende la secuencia **MGCTSVHQETKKYQS(X*)_c.SYTYNYEHVDVWGCGSADYKDDDDK** (SEQ ID NO: 2) en el que (X*)_c es una secuencia de aminoácidos aleatoria, y en el que X* es una secuencia de aminoácidos y c es el número de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos aleatoria.
85. El polipéptido de andamio de anticuerpo de vaca presentado en ARNm de la cláusula 82 que comprende la secuencia **MGCTSVHQETKKYQS(X*)_c.SYTYNYEHVDVWGCGSADYKDDDDK** (SEQ ID NO: 3) en el que (X*)_c es una secuencia de aminoácidos aleatoria, y en el que X* es una secuencia de aminoácidos y c es el número de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos aleatoria.
86. El polipéptido de andamio de anticuerpo de vaca presentado en ARNm de una cualquiera de las cláusulas 83 a 85 en el que X* comprende un aminoácido natural.
87. El polipéptido de andamio de anticuerpo de vaca presentado en ARNm de una cualquiera de las cláusulas 83 a 85 en el que X* comprende un aminoácido no natural.
88. El polipéptido de andamio de anticuerpo de vaca presentado en ARNm de una cualquiera de las cláusulas 83 a 87, en el que c es un número entero de 1 a 40.
89. El polipéptido de andamio de anticuerpo de vaca presentado en ARNm de una cualquiera de las cláusulas 83 a 87, en el que c es un número entero de 1 a 10.
90. El polipéptido de andamio de anticuerpo de vaca presentado en ARNm de una cualquiera de las cláusulas 83 a 89 en el que (X*)_c comprende la secuencia del péptido de interés.
91. El polipéptido de andamio de anticuerpo de vaca presentado en ARNm de la cláusula 90 en el que el péptido de interés es un péptido terapéutico.
92. Una micromatriz de péptidos que comprende un polipéptido de andamio de anticuerpo de vaca que comprende un péptido de interés.
93. La micromatriz de péptidos de la cláusula 92, en la que el polipéptido de andamio de anticuerpo de vaca comprende la secuencia **MGCTSVHQETKKYQS(X*)_c.SYTYNYEHVDVWGCG** (SEQ ID NO: 1) en el que (X*)_c es una secuencia de aminoácidos aleatoria, y en el que X* es una secuencia de aminoácidos y c es el número de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos aleatoria.
94. La micromatriz de péptidos de la cláusula 92, en la que el polipéptido de andamio de anticuerpo de vaca comprende la secuencia **MGCTSVHQETKKYQS(X*)_c.SYTYNYEHVDVWGCGSADYKDDDDK** (SEQ ID NO: 2) en el que (X*)_c es una secuencia de aminoácidos aleatoria, y en el que X* es una secuencia de aminoácidos y c es el número de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos aleatoria.
95. La micromatriz de péptidos de la cláusula 92, en la que el polipéptido de andamio de anticuerpo de vaca comprende la secuencia **MGCTSVHQETKKYQS(X*)_c.SYTYNYEHVDVWGCGSADYKDDDDK** (SEQ ID NO: 3) en el que (X*)_c es una secuencia de aminoácidos aleatoria, y en el que X* es una secuencia de aminoácidos y c es el número de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos aleatoria.
96. La micromatriz de péptidos de una cualquiera de las cláusulas 93 a 95, en la que X* comprende un aminoácido natural.

97. La micromatriz de péptidos de una cualquiera de las cláusulas 93 a 95 en la que X* comprende un aminoácido no natural.
- 5 98. La micromatriz de péptidos de una cualquiera de las cláusulas 93 a 97, en la que c es un número entero de 1 a 40.
99. La micromatriz de péptidos de una cualquiera de las cláusulas 93 a 97, en la que c es un número entero de 1 a 10.
- 10 100. La micromatriz de péptidos de una cualquiera de las cláusulas 93 a 99 en la que (X*)_c comprende la secuencia del péptido de interés.
101. La micromatriz de péptidos de la cláusula 100 en la que el péptido de interés es un péptido terapéutico.
- 15 102. El procedimiento, el polipéptido de andamio de anticuerpo de vaca presentado en ARNm o la micromatriz de péptidos de una cualquiera de las cláusulas 1 a 101, en los que el polipéptido de andamio de anticuerpo de vaca comprende un casete de secuencia de aminoácidos aleatoria y el casete de secuencia de aminoácidos aleatoria comprende la secuencia del péptido de interés.
- 20 103. El procedimiento, el polipéptido de andamio de anticuerpo de vaca presentado en ARNm o la micromatriz de péptidos de la cláusula 102, en los que el casete de secuencia de aminoácidos aleatoria no incluye la secuencia de un anticuerpo, un fragmento de un anticuerpo o un fragmento de péptido derivado de un anticuerpo.
104. El procedimiento de la cláusula 43 o 44 en el que la secuencia de reconocimiento de butelasa 1 es NHV.
- 25 105. El procedimiento de la cláusula 45, 46, 66 o 67, en el que la cadena lateral de glutamina es parte de la secuencia [WY][DE][DE][YW]ALQ[GST]YD (SEQ ID NO: 4) y la cadena lateral de lisina es parte de la secuencia RSKLG (SEQ ID NO: 5).
- 30 106. El procedimiento de una cualquiera de las cláusulas 1 a 22 que comprende además la etapa de sintetizar el polipéptido de andamio de anticuerpo de vaca que comprende el péptido de interés en una micromatriz de péptidos para madurar y/o extender el péptido de interés o la etapa de sintetizar el péptido de interés en una micromatriz de péptidos para madurar y/o extender el péptido de interés.
- 35 107. El procedimiento, el polipéptido de andamio de anticuerpo de vaca presentado en ARNm o la micromatriz de péptidos de una cualquiera de las cláusulas 1 a 101, en los que el polipéptido de andamio de anticuerpo de vaca comprende un casete de secuencia de aminoácidos aleatoria en los que el casete de secuencia de aminoácidos aleatoria comprende la secuencia del péptido de interés y en los que el casete de secuencia de aminoácidos aleatoria se usa para la selección de péptidos de interés.
- 40 108. Un polipéptido de andamio de anticuerpo de vaca que comprende un casete de secuencia de aminoácidos aleatoria.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

- 45 La **figura 1** muestra un dibujo esquemático de un polipéptido de andamio de anticuerpo de vaca. La figura 1 divulga las SEQ ID NO 400 y 401, respectivamente, en orden de aparición.
- La **figura 2** muestra un gel desnaturalizante de un único péptido de unión a trombina injertado en un polipéptido de andamio de anticuerpo de vaca.
- 50 La **figura 3** muestra la electroforesis en gel de agarosa de diversos ciclos de PCR para determinar los niveles de detección de productos de amplificación.
- La **figura 4** muestra un sensograma de Biacore de una medición de la cinética de un solo ciclo de péptidos brutos de una mezcla de traducción y constantes de unión derivadas.
- 55 La **figura 5** muestra sensogramas de Biacore de mediciones de la cinética de múltiples ciclos de las proteínas de unión a trombina seleccionadas. La figura 5 divulga las SEQ ID NO 367-368, respectivamente, en orden de aparición.
- 60 La **figura 6** muestra un dibujo esquemático de un motivo N (base N terminal), un motivo A (hebra beta ascendente), un motivo R (aleatorio), un motivo D (hebra beta descendente) y un motivo C (base C terminal) (SEQ ID NO: 402) en un polipéptido de andamio de anticuerpo de vaca.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE MODOS DE REALIZACIÓN ILUSTRATIVOS

65

Como se usa en el presente documento, "polipéptido de andamio de anticuerpo de vaca" significa un polipéptido que comprende secuencias de la región CDR H3 de un anticuerpo de vaca. Los polipéptidos de andamio de anticuerpos de vaca descritos en el presente documento son útiles para la presentación en ARNm de péptidos de interés y la síntesis *in situ* en una micromatriz de péptidos de los péptidos de interés para generar péptidos lineales o cíclicos.

En un modo de realización, el término "péptido" o "péptidos" en las frases "péptido de interés", "micromatriz de péptidos", "primera micromatriz de péptidos", "segunda micromatriz de péptidos", "péptido cíclico", "péptido lineal", "péptido funcionalizado", "péptido de unión al núcleo", "péptido cíclico maduro de interés", "péptido de secuencia de unión al núcleo maduro y extendido", "péptido cíclico extendido y maduro" y "colección de péptidos" no significa un anticuerpo, un fragmento de un anticuerpo ni un fragmento de péptido derivado de un anticuerpo.

En diversos modos de realización, los péptidos de interés, péptidos cíclicos, péptidos lineales, péptidos funcionalizados, péptidos de unión al núcleo, péptidos de interés cíclicos maduros, péptidos de unión al núcleo extendidos y maduros y péptidos cíclicos extendidos y maduros descritos en el presente documento pueden ser de 4 a 50 aminoácidos, de 4 a 40 aminoácidos, de 4 a 30 aminoácidos, de 4 a 20 aminoácidos, de 4 a 19 aminoácidos, de 4 a 18 aminoácidos, de 4 a 17 aminoácidos, de 4 a 16 aminoácidos, de 4 a 15 aminoácidos, de 4 a 14 aminoácidos, de 4 a 13 aminoácidos, de 4 a 12 aminoácidos, de 4 a 11 aminoácidos, de 4 a 10 aminoácidos, de 4 a 9 aminoácidos, de 4 a 8 aminoácidos, de 4 a 7 aminoácidos, de 4 a 6 aminoácidos, o los péptidos pueden tener 5 aminoácidos de longitud o aproximadamente 5 aminoácidos de longitud. Los aminoácidos descritos en el presente documento pueden ser aminoácidos naturales o no naturales.

En los modos de realización descritos en el presente documento, el término "aminoácido natural" se refiere a uno de los 20 aminoácidos que se encuentran típicamente en proteínas y se usan para la biosíntesis de proteínas, así como a otros aminoácidos que se pueden incorporar en las proteínas durante la traducción (incluyendo pirrolisina y selenocisteína). Los 20 aminoácidos naturales incluyen histidina, alanina, valina, glicina, leucina, isoleucina, ácido aspártico, ácido glutámico, serina, glutamina, asparagina, treonina, arginina, prolina, fenilalanina, tirosina, triptófano, cisteína, metionina y lisina.

En los modos de realización descritos en el presente documento, el término "aminoácido no natural" se refiere a un compuesto orgánico que no está entre los codificados por el código genético estándar o se incorpora en las proteínas durante la traducción. Por lo tanto, los aminoácidos no naturales incluyen, pero no se limitan a, aminoácidos o análogos de aminoácidos, los estereoisómeros D de aminoácidos, los análogos beta-amino de aminoácidos, citrulina, homocitrulina, homoarginina, hidroxiprolina, homoprolina, ornitina, 4-amino-fenilalanina, ciclohexilalanina, ácido α -aminobutírico, *N*-metil-alanina, *N*-metil-glicina, norleucina, ácido *N*-metil glutámico, *terc*-butilglicina, ácido α -aminobutírico, *terc*-butilalanina, ácido 2-aminobutírico, ácido α -aminobutírico, ácido 2-aminoindano-2-carboxílico, selenometionina, deshidroalanina, lantionina, ácido γ -aminobutírico y derivados de los mismos en los que el nitrógeno amínico está mono o dialquilado.

Varios modos de realización de la invención se describen en la sección Sumario de esta solicitud de patente y cada uno de los modos de realización descritos en esta sección de Descripción detallada de la solicitud se aplica a los modos de realización descritos en el Sumario, incluyendo los modos de realización descritos por las cláusulas enumeradas a continuación.

1. Un procedimiento para seleccionar un péptido de interés, comprendiendo el procedimiento las etapas de

a) preparar una colección de péptidos usando un polipéptido de andamio de anticuerpo de vaca presentado en ARNm que comprende el péptido de interés que se va a identificar;

b) seleccionar el péptido de interés de la colección de péptidos poniendo en contacto una molécula diana con el péptido de interés en el que la molécula diana se inmoviliza sobre un soporte sólido o está en solución; e

c) identificar la secuencia de aminoácidos del péptido de interés.

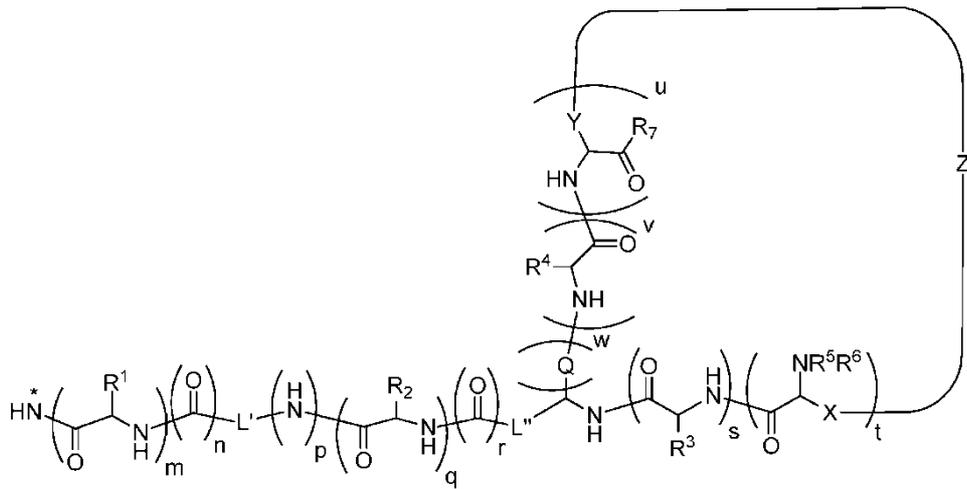
2. El procedimiento de la cláusula 1, en el que la etapa de preparación de la colección de péptidos comprende la etapa de transcripción *in vitro* de una colección de ADN para formar una colección de ARNm.

3. El procedimiento de la cláusula 2, que comprende además la etapa de digerir la colección de ADN con DNasa.

4. El procedimiento de la cláusula 2 o 3, que comprende además la etapa de conjugar el ARNm de la colección de ARNm con un conector oligonucleotídico de puromicina.

5. El procedimiento de una cualquiera de las cláusulas 2 a 4, que comprende además la etapa de traducir *in vitro* el ARNm de la colección de ARNm para formar conjugados de fusión de polipéptido de andamio de anticuerpo de vaca-ARNm que comprenden el polipéptido de andamio de anticuerpo de vaca en el que el polipéptido de andamio de anticuerpo de vaca comprende una marca de purificación.

6. El procedimiento de la cláusula 5, que comprende además la etapa de purificar los conjugados de fusión de polipéptido de andamio de anticuerpo de vaca-ARNm usando la marca de purificación.
- 5 7. El procedimiento de la cláusula 5 o 6, que comprende además la etapa de retrotranscribir el ARNm de la colección de ARNm para formar híbridos de ARNm-ADN de los conjugados de fusión de polipéptido de andamio de anticuerpo de vaca-ARNm.
- 10 8. El procedimiento de la cláusula 7, en el que la etapa de selección comprende poner en contacto los híbridos de ARNm-ADN de los conjugados de fusión de polipéptido de andamio de anticuerpo de vaca-ARNm con la molécula diana.
9. El procedimiento de la cláusula 8, que comprende además la etapa de regenerar el ADN de los híbridos de ARNm-ADN de los conjugados de fusión de polipéptido de andamio de anticuerpo de vaca-ARNm.
- 15 10. El procedimiento de una cualquiera de las cláusulas 2 a 9, en el que la colección de ADN es una colección de ADNc.
- 20 11. El procedimiento de una cualquiera de las cláusulas 2 a 10, en el que la transcripción *in vitro* se realiza usando ARN polimerasa T7.
12. El procedimiento de una cualquiera de las cláusulas 4 a 11, en el que el conector oligonucleotídico de puromicina se une al ARNm en el extremo 3' del ARNm.
- 25 13. El procedimiento de una cualquiera de las cláusulas 5 a 12, en el que la marca de purificación es una marca FLAG.
14. El procedimiento de una cualquiera de las cláusulas 2 a 13, en el que los miembros de la colección de ADN comprenden una secuencia promotora de ARN polimerasa, una secuencia potenciadora y una secuencia de marca de purificación.
- 30 15. El procedimiento de una cualquiera de las cláusulas 5 a 13, en el que la marca de purificación es una marca C terminal.
- 35 16. El procedimiento de una cualquiera de las cláusulas 1 a 15, en el que el polipéptido de andamio de anticuerpo de vaca comprende la secuencia **MGCTSVHQETKKYQS(X*)_cSYTYNYEHVDVWGCG** (SEQ ID NO: 1) en el que (X*)_c es una secuencia de aminoácidos aleatoria, y en el que X* es una secuencia de aminoácidos y c es el número de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos aleatoria.
- 40 17. El procedimiento de la cláusula 16, en el que el polipéptido de andamio de anticuerpo de vaca comprende la secuencia **MGCTSVHQETKKYQS(X*)_cSYTYNYEHVDVWGCGSADYKDDDDK** (SEQ ID NO: 2) en el que (X*)_c es una secuencia de aminoácidos aleatoria, y en el que X* es una secuencia de aminoácidos y c es el número de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos aleatoria.
- 45 18. El procedimiento de la cláusula 17, en el que el polipéptido de andamio de anticuerpo de vaca comprende la secuencia **MGCTSVHQETKKYQS(X*)_cSYTYNYEHVDVWGCGSADYKDDDDKKK** (SEQ ID NO: 3) en el que (X*)_c es una secuencia de aminoácidos aleatoria, y en el que X* es una secuencia de aminoácidos y c es el número de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos aleatoria.
19. El procedimiento de una cualquiera de las cláusulas 16 a 18 en el que X* comprende un aminoácido natural.
- 50 20. El procedimiento de una cualquiera de las cláusulas 16 a 18 en el que X* comprende un aminoácido no natural.
21. El procedimiento de una cualquiera de las cláusulas 16 a 20, en el que c es un número entero de 1 a 40.
22. El procedimiento de una cualquiera de las cláusulas 16 a 20, en el que c es un número entero de 1 a 10.
- 55 23. El procedimiento de una cualquiera de las cláusulas 1 a 22, que comprende además las etapas de:
- 60 a) sintetizar el péptido de interés, o derivados del mismo, en una primera micromatriz de péptidos, en el que los derivados del péptido de interés incluyen al menos una alteración en la secuencia del péptido de interés seleccionada de una única sustitución aminoacídica, una doble sustitución aminoacídica, una delección de uno o más aminoácidos, y una inserción de uno o más aminoácidos, con lo que se generan péptidos funcionalizados en la primera micromatriz de péptidos;
- 65 b) formar a partir de los péptidos funcionalizados, en los que los péptidos funcionalizados están en forma lineal, péptidos cíclicos de fórmula I

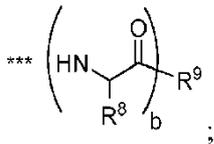


I

5 en la que cada R^1 , R^2 , R^3 y R^4 es independientemente una cadena lateral de aminoácido natural o una cadena lateral de aminoácido no natural;

cada R^5 y R^6 se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, un grupo de caperuza N terminal y un grupo protector N terminal;

10 R^7 se selecciona del grupo que consiste en $-OH$, un grupo de caperuza C terminal, un grupo protector C terminal, y



15 cada R^8 es independientemente una cadena lateral de aminoácido natural o una cadena lateral de aminoácido no natural;

R^9 se selecciona del grupo que consiste en $-OH$, un grupo de caperuza C terminal y un grupo protector C terminal;

20 Q se selecciona del grupo que consiste en un enlace, un carbonilo, una cadena lateral de aminoácido natural y una cadena lateral de aminoácido no natural;

cada X e Y se selecciona independientemente del grupo que consiste en un enlace, una cadena lateral de aminoácido natural unida covalentemente a Z y una cadena lateral de aminoácido no natural unida covalentemente a Z;

25 Z es un grupo que comprende un resto seleccionado del grupo que consiste en un enlace amida, un enlace disulfuro, un enlace isopeptídico, un 1,2,3-triazol y una 1,2-quinona opcionalmente sustituida;

cada L' y L'' es independientemente un grupo de unión bivalente opcional o un enlace;

30 b es un número entero de 0 a 50;

m es un número entero de 0 a 6;

n es 0 o 1;

35 p es 0 o 1;

q es un número entero de 0 a 6;

r es 0 o 1;

40 s es un número entero de 0 a 100;

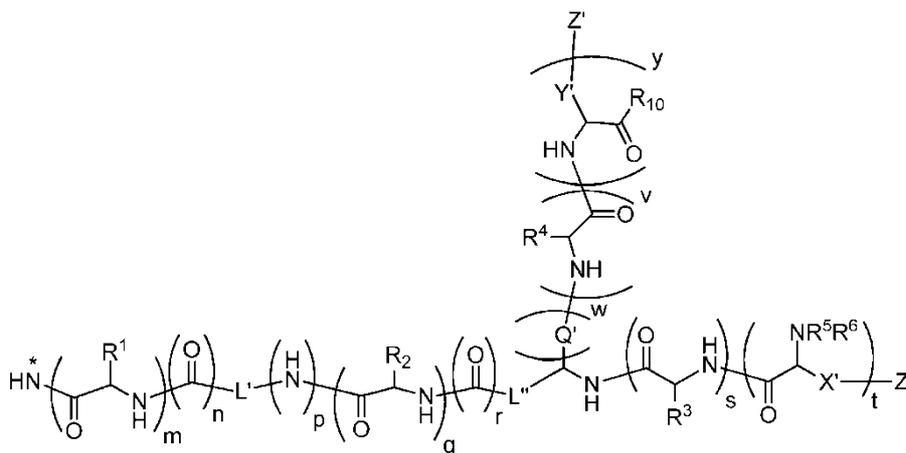
t es 0 o 1;

u es 0 o 1;

5 v es un número entero de 0 a 100;

w es 0 o 1; y * es un punto de conexión que conecta el péptido cíclico a un soporte de matriz que tiene una superficie reactiva; y *** es un punto de conexión con el resto del péptido funcionalizado;

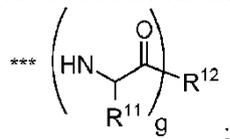
10 comprendiendo el procedimiento la etapa de hacer reaccionar un péptido funcionalizado de fórmula II en condiciones que hacen que se forme Z



II

15 en la que R¹, R², R³, R⁴, R⁵, R⁶, m, n, p, q, r, s, t, v, w, L', L'', * y *** son como se define para la fórmula I;

R¹⁰ se selecciona del grupo que consiste en -OH, un grupo de caperuza C terminal, un grupo protector C terminal, y



20 cada R¹¹ es independientemente una cadena lateral de aminoácido natural o una cadena lateral de aminoácido no natural;

R¹² se selecciona del grupo que consiste en -OH, un grupo de caperuza C terminal y un grupo protector C terminal;

25 Q' se selecciona del grupo que consiste en un enlace, un carbonilo, una cadena lateral de aminoácido natural unida covalentemente a Z'' y una cadena lateral de aminoácido no natural unida covalentemente a Z'';

X' se selecciona del grupo que consiste en un enlace, una cadena lateral de aminoácido natural unida covalentemente a Z'' y una cadena lateral de aminoácido no natural unida covalentemente a Z'';

30 Y' se selecciona del grupo que consiste en un enlace, una cadena lateral de aminoácido natural unida covalentemente a Z' y una cadena lateral de aminoácido no natural unida covalentemente a Z';

35 cada Z' y Z'' se selecciona independientemente del grupo que consiste en un enlace, -OH, hidrógeno, un tiol, una amina, un ácido carboxílico, una amida, un alquino, una acida, un aminofenol opcionalmente sustituido, una cadena lateral de aminoácido natural, una cadena lateral de aminoácido no natural, un grupo protector N terminal y un grupo protector C terminal, siempre que Z' y Z'' sean grupos complementarios que se combinen para formar Z;

g es un número entero de 0 a 50; e

40 y es 0 o 1;

en el que los péptidos funcionalizados y los péptidos cíclicos se inmovilizan en la superficie reactiva;

c) exponer los péptidos cíclicos a la molécula diana, con lo que la molécula diana se une a al menos un péptido cíclico;

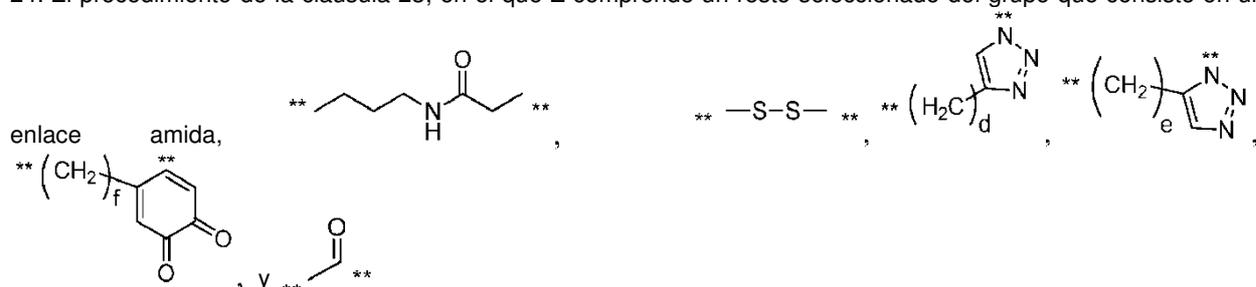
5 d) identificar uno o más de los péptidos cíclicos que demuestran una fuerte unión a la molécula diana, con lo que se determina una secuencia de unión al núcleo madurada;

e) realizar al menos una de la extensión N terminal y C terminal de la secuencia de unión al núcleo madurada determinada en la etapa d para proporcionar una secuencia de unión al núcleo extendida y madurada en una segunda micromatriz de péptidos;

10 f) exponer la molécula diana a la segunda micromatriz de péptidos que comprende una población de péptidos de la secuencia de unión al núcleo extendida y madurada generados en la etapa e en la que la población de péptidos de la secuencia de unión al núcleo extendida y madurada comprende péptidos cíclicos formados como en la etapa b; e

15 g) identificar un péptido cíclico extendido y madurado con una fuerte unión a la molécula diana.

24. El procedimiento de la cláusula 23, en el que Z comprende un resto seleccionado del grupo que consiste en un



en el que d es un número entero de 0 a 6, e es un número entero de 0 a 6 y f es un número entero de 0 a 6, y ** es un punto de conexión con el resto del péptido cíclico.

25. El procedimiento de la cláusula 23 o 24, en el que Z comprende un enlace peptídico, Z' comprende un grupo protector N terminal, t es 0, u es 0 e y es 0.

26. El procedimiento de la cláusula 25, que comprende además eliminar Z' del resto del péptido funcionalizado para provocar que se forme el enlace peptídico.

30 27. El procedimiento de la cláusula 23 o 24, en el que Q y X son enlaces a Z, Z comprende $^{**}-\text{S}-\text{S}-^{**}$, X' es un enlace a Z'', Q' es un enlace a Z', Z' y Z'' comprenden cadenas laterales de cisteína, t es 1, u es 0, v es 0, w es 1 e y es 0.

28. El procedimiento de la cláusula 27, que comprende además someter el péptido funcionalizado a condiciones oxidativas para provocar que se forme $^{**}-\text{S}-\text{S}-^{**}$.

35 29. El procedimiento de la cláusula 23 o 24, en el que X e Y son enlaces a Z, Z comprende $^{**}-\text{S}-\text{S}-^{**}$, X' es un enlace a Z'', Y' es un enlace a Z', Z' y Z'' comprenden cadenas laterales de cisteína, t es 1, u es 1 e y es 1.

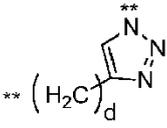
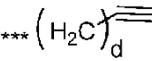
40 30. El procedimiento de la cláusula 29, que comprende además someter el péptido funcionalizado a condiciones oxidativas para provocar que se forme $^{**}-\text{S}-\text{S}-^{**}$.

31. El procedimiento de la cláusula 23 o 24, en el que Q es un enlace a Z, Z comprende $^{**}(\text{H}_2\text{C})_d$, Q' es un

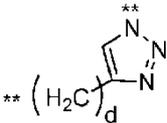
enlace a Z', Z' comprende $^{***}(\text{H}_2\text{C})_d$, Z'' comprende una acida, d es 1, u es 0, v es 0, w es 1 e y es 0.

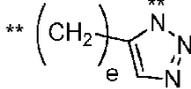
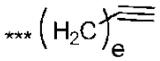
45 32. El procedimiento de la cláusula 31, que comprende además poner en contacto el péptido funcionalizado con un

catalizador de cobre para provocar que se forme $^{**}(\text{H}_2\text{C})_d$.

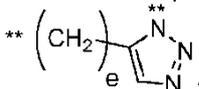
33. El procedimiento de la cláusula 23 o 24, en el que Y es un enlace a Z, Z comprende , Y' es un enlace a Z', Z' comprende , Z'' comprende una acida, d es 1, u es 1 e y es 1.

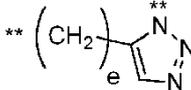
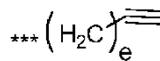
34. El procedimiento de la cláusula 33, que comprende además poner en contacto el péptido funcionalizado con un

5 catalizador de cobre para provocar que se forme .

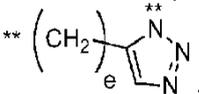
35. El procedimiento de la cláusula 23 o 24, en el que Q es un enlace a Z, Z comprende , Q' es un enlace a Z', Z' comprende , Z'' comprende una acida, e es 1, u es 0, v es 0, w es 1 e y es 0.

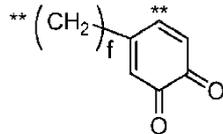
10 36. El procedimiento de la cláusula 35, que comprende además poner en contacto el péptido funcionalizado con un

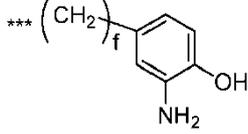
catalizador de cobre para provocar que se forme .

37. El procedimiento de la cláusula 23 o 24, en el que Y es un enlace a Z, Z comprende , Y' es un enlace a Z', Z' comprende , Z'' comprende una acida, e es 1, u es 1 e y es 1.

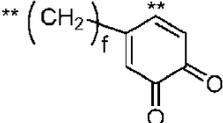
15 38. El procedimiento de la cláusula 37, que comprende además poner en contacto el péptido funcionalizado con un

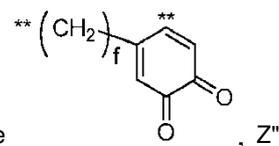
catalizador de cobre para provocar que se forme .

39. El procedimiento de la cláusula 23 o 24, en el que Q es un enlace a Z, Z comprende , Q' es

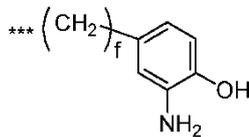
20 un enlace a Z', Z' comprende , Z'' comprende una amina, f es 1, u es 0, v es 0, w es 1 e y es 0.

40. El procedimiento de la cláusula 39, que comprende además poner en contacto el péptido funcionalizado con

25 ferricianuro de potasio para provocar que se forme .



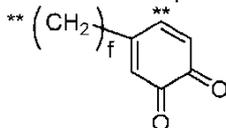
41. El procedimiento de la cláusula 23 o 24, en el que Y es un enlace a Z, Z comprende



comprende una amina, Y' es un enlace a Z', Z' comprende

, f es 1, u es 1 e y es 1.

42. El procedimiento de la cláusula 41, que comprende además poner en contacto el péptido funcionalizado con

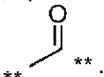


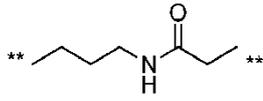
5 ferricianuro de potasio para provocar que se forme

43. El procedimiento de la cláusula 23 o 24, en el que R⁴, R¹⁰ y R¹¹ se definen de modo que el péptido funcionalizado

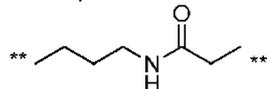
comprende una secuencia de reconocimiento de butelasa 1, Y es un enlace a Z, Z comprende , Y' es un enlace a Z', Z' es una cadena lateral de asparagina o ácido aspártico, u es 1 e y es 1.

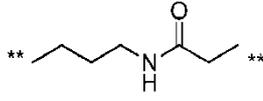
10 44. El procedimiento de la cláusula 43, que comprende además poner en contacto el péptido funcionalizado con

butelasa 1 para provocar que se forme .

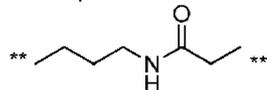
15 45. El procedimiento de la cláusula 23 o 24, en el que Q y X son enlaces a Z, Z comprende , Q' es un enlace a Z', X' es un enlace a Z'', Z' es una cadena lateral de glutamina y Z'' es una cadena lateral de lisina o Z' es una cadena lateral de lisina y Z'' es una cadena lateral de glutamina, t es 1, u es 0, v es 0, w es 1 e y es 0.

46. El procedimiento de la cláusula 45, que comprende además poner en contacto el péptido funcionalizado con una

20 transglutaminasa microbiana para provocar que se forme .

25 47. El procedimiento de la cláusula 23 o 24, en el que X e Y son enlaces a Z, Z comprende , X' es un enlace a Z'', Y' es un enlace a Z', Z' es una cadena lateral de glutamina y Z'' es una cadena lateral de lisina o Z' es una cadena lateral de lisina y Z'' es una cadena lateral de glutamina, t es 1, u es 1 e y es 1.

48. El procedimiento de la cláusula 47, que comprende además poner en contacto el péptido funcionalizado con una

transglutaminasa microbiana para provocar que se forme .

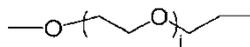
30 49. El procedimiento de una cualquiera de las cláusulas 23 a 48, en el que cada L' y L'' es independientemente de la fórmula V



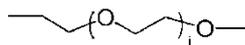
V

35 en la que cada R¹³ y R^{13'} se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, D, halógeno, alquilo C₁-C₆, alqueno C₂-C₆, alquino C₂-C₆, cicloalquilo C₃-C₆, heterocicloalquilo de 3 a 7 miembros, arilo C₆-C₁₀, heteroarilo de 5 a 7 miembros, -OR¹⁴, -OC(O)R¹⁴, -NR¹⁴R^{14'}, -NR¹⁴C(O)R¹⁵, -C(O)R¹⁴, -C(O)OR¹⁴ y -C(O)NR¹⁴R^{14'}, en el que cada

átomo de hidrógeno en alquilo C₁-C₆, alqueno C₂-C₆, alquino C₂-C₆, cicloalquilo C₃-C₆, heterocicloalquilo de 3 a 7 miembros, arilo C₆-C₁₀ y heteroarilo de 5 a 7 miembros está independientemente sustituido opcionalmente con halógeno, alquilo C₁-C₆, alqueno C₂-C₆, alquino C₂-C₆, -OR¹⁶; cada R¹⁴, R^{14'}, R¹⁵ y R¹⁶ se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, D, hidroxilo, alquilo C₁-C₇, alqueno C₂-C₇, alquino C₂-C₇, cicloalquilo C₃-C₆, heterocicloalquilo de 3 a 7 miembros, arilo C₆-C₁₀ y heteroarilo de 5 a 7 miembros; y h es un número entero de 1 a 10; o la fórmula VI o VII



VI



VII

10

en la que j es un número entero de 0 a 30.

15

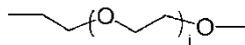
50. El procedimiento de la cláusula 49, en el que cada R¹³ y R^{13'} es hidrógeno.

51. El procedimiento de la cláusula 49 o 50, en el que L' está presente, h es 5, m es 0, n es 1 y p es 1.

52. El procedimiento de la cláusula 49, en el que al menos uno de L' y L'' es de la fórmula VI o VII



VI



VII

20

en la que j es 7.

25

53. El procedimiento de una cualquiera de las cláusulas 23 a 52, en el que el grupo protector N terminal es un grupo fotoprotector.

30

54. El procedimiento de una cualquiera de las cláusulas 23 a 53, en el que el grupo protector N terminal es 2-(2-nitrofenil)propiloxicarbonilo.

35

55. El procedimiento de una cualquiera de las cláusulas 1 a 22 que comprende además la etapa de sintetizar el polipéptido de andamio de anticuerpo de vaca en una o más micromatrices de péptidos en las que el polipéptido de andamio de anticuerpo de vaca comprende el péptido de interés.

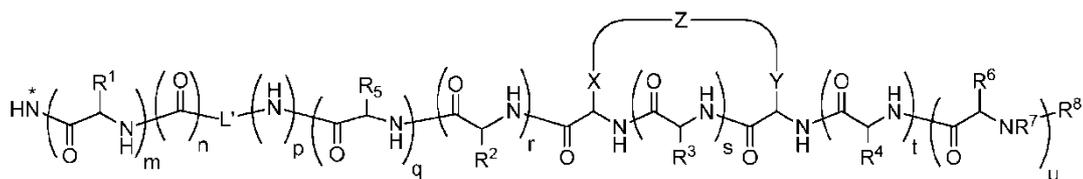
56. El procedimiento de la cláusula 55, que comprende las etapas de:

40

a) sintetizar el polipéptido de andamio de anticuerpo de vaca que comprende el péptido de interés, o derivados del péptido de interés, en una primera micromatriz de péptidos, en el que los derivados del péptido de interés incluyen al menos una alteración en la secuencia del péptido de interés seleccionada de una única sustitución aminoacídica, una doble sustitución aminoacídica, una delección de uno o más aminoácidos, y una inserción de uno o más aminoácidos, con lo que se generan péptidos funcionalizados en la primera micromatriz de péptidos;

45

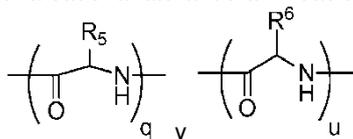
b) formar a partir de los péptidos funcionalizados, en los que los péptidos funcionalizados están en forma lineal, péptidos cíclicos de fórmula VIII



VIII

en la que cada R¹, R², R³ y R⁴ es independientemente una cadena lateral de aminoácido natural o una cadena lateral de aminoácido no natural;

5 cada R⁵ y R⁶ es independientemente una cadena lateral de aminoácido natural o una cadena lateral de aminoácido



no natural seleccionada de modo que pueden formar una lámina beta;

10 cada R⁷ se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, un grupo de caperuza N terminal y un grupo protector N terminal;

R⁸ se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, un grupo de caperuza N terminal y un grupo protector;

15 cada X e Y se selecciona independientemente del grupo que consiste en un enlace, una cadena lateral de aminoácido natural unida covalentemente a Z y una cadena lateral de aminoácido no natural unida covalentemente a Z;

Z es un grupo que comprende un resto seleccionado del grupo que consiste en un enlace amida, un enlace disulfuro, un enlace isopeptídico, un 1,2,3-triazol y una 1,2-quinona opcionalmente sustituida;

20 L' es un grupo de unión bivalente opcional o un enlace;

m es un número entero de 0 a 6;

n es 0 o 1;

25 p es 0 o 1;

q es un número entero de 0 a 50;

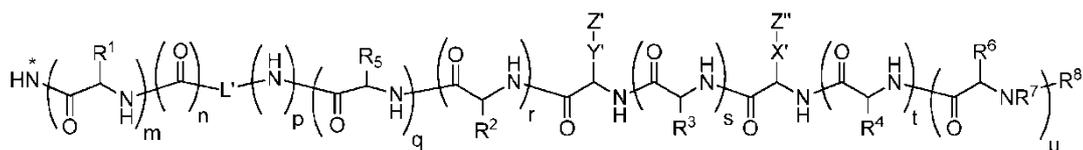
30 r es un número entero de 0 a 50;

s es un número entero de 0 a 50;

35 t es un número entero de 0 a 50;

u es un número entero de 0 a 50; y * es un punto de conexión que conecta el péptido cíclico a un soporte de matriz que tiene una superficie reactiva;

40 comprendiendo el procedimiento la etapa de hacer reaccionar un péptido funcionalizado de fórmula IX en condiciones que hacen que se forme Z



IX

en la que R¹, R², R³, R⁴, R⁵, R⁶, R⁷ y R⁸, m, n, p, q, r, s, t, u, L' y * son como se define para la fórmula VIII;

45

X' se selecciona del grupo que consiste en un enlace, una cadena lateral de aminoácido natural unida covalentemente a Z" y una cadena lateral de aminoácido no natural unida covalentemente a Z";

5 Y' se selecciona del grupo que consiste en un enlace, una cadena lateral de aminoácido natural unida covalentemente a Z' y una cadena lateral de aminoácido no natural unida covalentemente a Z"; y

10 cada Z' y Z" se selecciona independientemente del grupo que consiste en un enlace, -OH, hidrógeno, un tiol, una amina, un ácido carboxílico, una amida, un alquino, una acida, un aminofenol opcionalmente sustituido, una cadena lateral de aminoácido natural, una cadena lateral de aminoácido no natural, un grupo protector N terminal y un grupo protector C terminal, siempre que Z' y Z" sean grupos complementarios que se combinen para formar Z;

en el que los péptidos funcionalizados y los péptidos cíclicos se inmovilizan en la superficie reactiva;

15 c) exponer los péptidos cíclicos a la molécula diana, con lo que la molécula diana se une a al menos un péptido cíclico;

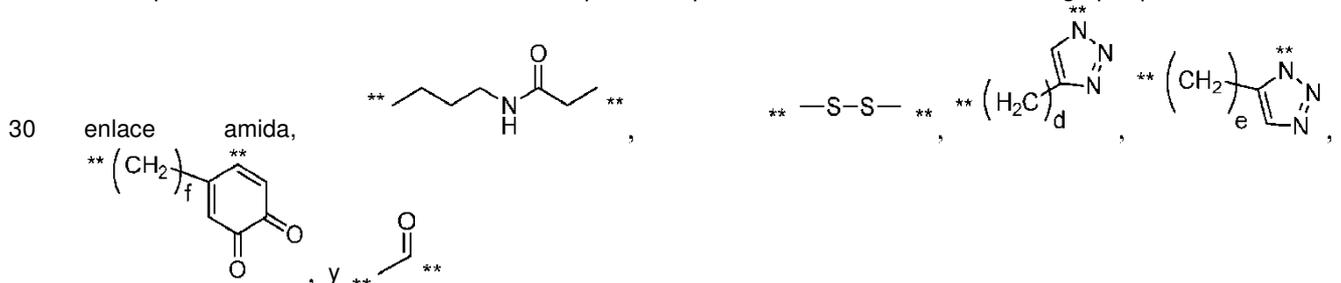
d) identificar uno o más de los péptidos cíclicos que demuestran una fuerte unión a la molécula diana, con lo que se determina una secuencia de unión al núcleo madurada;

20 e) realizar al menos una de la extensión N terminal y C terminal de la secuencia de unión al núcleo madurada determinada en la etapa d para proporcionar una secuencia de unión al núcleo extendida y madurada en una segunda micromatriz de péptidos;

25 f) exponer la molécula diana a la segunda micromatriz de péptidos que comprende una población de péptidos de la secuencia de unión al núcleo extendida y madurada generados en la etapa e en la que la población de péptidos de la secuencia de unión al núcleo extendida y madurada comprende péptidos cíclicos formados como en la etapa b; e

g) identificar un péptido cíclico extendido y madurado con una fuerte unión a la molécula diana.

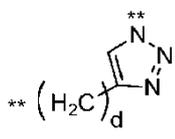
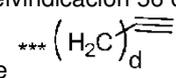
57. El procedimiento de la cláusula 56, en el que Z comprende un resto seleccionado del grupo que consiste en un



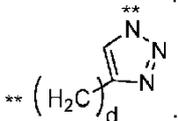
35 en el que d es un número entero de 0 a 6, e es un número entero de 0 a 6 y f es un número entero de 0 a 6, y ** es un punto de conexión con el resto del péptido cíclico.

58. El procedimiento de la cláusula 56 o 57, en el que X e Y son enlaces a Z, Z comprende ** -S-S- **, X' es un enlace a Z", Y' es un enlace a Z', y Z' y Z" comprenden cadenas laterales de cisteína.

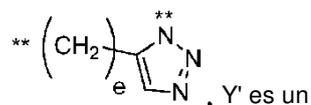
40 59. El procedimiento de la cláusula 58, que comprende además someter el péptido funcionalizado a condiciones oxidativas para provocar que se forme ** -S-S- **.

60. El procedimiento de la reivindicación 56 o 57, en el que Y es un enlace a Z, Z comprende  , Y' es un enlace a Z', Z' comprende  , Z" comprende una acida y d es 1.

45 61. El procedimiento de la cláusula 60, que comprende además poner en contacto el péptido funcionalizado con un

catalizador de cobre para provocar que se forme  .

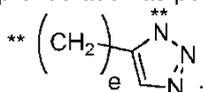
62. El procedimiento de la cláusula 56 o 57, en el que Y es un enlace a Z, Z comprende



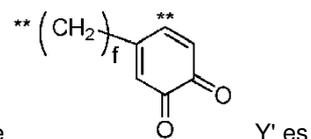
enlace a Z', Z' comprende $^{***}(\text{H}_2\text{C})_e$, Z'' comprende una acida y e es 1.

63. El procedimiento de la cláusula 62, que comprende además poner en contacto el péptido funcionalizado con un

5 catalizador de cobre para provocar que se forme



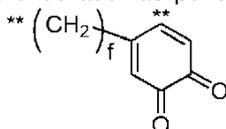
64. El procedimiento de la cláusula 56 o 57, en el que Y es un enlace a Z, Z comprende



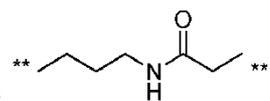
un enlace a Z', Z' comprende $^{***}(\text{CH}_2)_f$, Z'' comprende una amina y f es 1.

10 65. El procedimiento de la cláusula 64, que comprende además poner en contacto el péptido funcionalizado con

ferricianuro de potasio para provocar que se forme



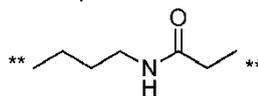
66. El procedimiento de la cláusula 56 o 57, en el que X e Y son enlaces a Z, Z comprende



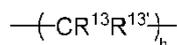
15 X' es un enlace a Z'', Y' es un enlace a Z', y Z' es una cadena lateral de glutamina y Z'' es una cadena lateral de lisina o Z' es una cadena lateral de lisina y Z'' es una cadena lateral de glutamina.

67. El procedimiento de la cláusula 66, que comprende además poner en contacto el péptido funcionalizado con una

transglutaminasa microbiana para provocar que se forme

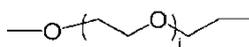


20 68. El procedimiento de una cualquiera de las cláusulas 56 a 67, en el que L' es de la fórmula (X)

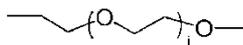


(X)

25 en la que cada R¹³ y R^{13'} se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, D, halógeno, alquilo C₁-C₆, alquenilo C₂-C₆, alquinilo C₂-C₆, cicloalquilo C₃-C₆, heterocicloalquilo de 3 a 7 miembros, arilo C₆-C₁₀, heteroarilo de 5 a 7 miembros, -OR¹⁴, -OC(O)R¹⁴, -NR¹⁴R^{14'}, -NR¹⁴C(O)R¹⁵, -C(O)R¹⁴, -C(O)OR¹⁴ y -C(O)NR¹⁴R^{14'}, en el que cada átomo de hidrógeno en alquilo C₁-C₆, alquenilo C₂-C₆, alquinilo C₂-C₆, cicloalquilo C₃-C₆, heterocicloalquilo de 3 a 7 miembros, arilo C₆-C₁₀ y heteroarilo de 5 a 7 miembros está independientemente sustituido opcionalmente con halógeno, alquilo C₁-C₆, alquenilo C₂-C₆, alquinilo C₂-C₆, -OR¹⁶; cada R¹⁴, R^{14'}, R¹⁵ y R¹⁶ se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, D, hidroxilo, alquilo C₁-C₇, alquenilo C₂-C₇, alquinilo C₂-C₇, cicloalquilo C₃-C₆, heterocicloalquilo de 3 a 7 miembros, arilo C₆-C₁₀ y heteroarilo de 5 a 7 miembros; y h es un número entero de 1 a 10; o la fórmula XI o XII



XI



XII

en la que j es un número entero de 0 a 30.

5

69. El procedimiento de la cláusula 68, en el que cada R¹³ y R^{13'} es hidrógeno.

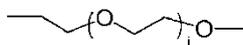
70. El procedimiento de la cláusula 68 o 69, en el que L' está presente, h es 5, m es 0, n es 1 y p es 1.

10

71. El procedimiento de la cláusula 68, en el que L' es de la fórmula XI o XII



XI



XII

15

en la que j es 7.

72. El procedimiento de una cualquiera de las cláusulas 56 a 71, en el que el grupo protector N terminal es un grupo fotoprotector.

20

73. El procedimiento de una cualquiera de las cláusulas 56 a 72, en el que el grupo protector N terminal es 2-(2-nitrofenil)propiloxicarbonilo.

25

74. El procedimiento de una cualquiera de las cláusulas 23 a 54 y 56 a 73, en el que se realiza al menos uno de un análisis sin marcador y uno de afinidad de los péptidos de secuencia de unión al núcleo extendidos y madurados.

75. El procedimiento de una cualquiera de las cláusulas 23 a 54 y 56 a 74, en el que la primera o segunda micromatriz de péptidos comprende al menos uno de compuesto de vidrio, plástico y carbono.

30

76. El procedimiento de una cualquiera de las cláusulas 23 a 54 y 56 a 75, en el que los péptidos funcionalizados y los péptidos cíclicos en la primera o la segunda micromatriz de péptidos comprenden el mismo número de aminoácidos.

35

77. El procedimiento de una cualquiera de las cláusulas 23 a 54 y 56 a 76, en el que los péptidos funcionalizados y los péptidos cíclicos en la primera o la segunda micromatriz de péptidos no incluyen el aminoácido cisteína o metionina, o los motivos de histidina-prolina-glutamina, o repeticiones de aminoácidos de 2 o más aminoácidos.

40

78. El procedimiento de una cualquiera de las cláusulas 23 a 54 y 56 a 77, en el que la población de péptidos de secuencia de unión al núcleo extendidos y madurados incluye al menos uno de un oligopéptido de síntesis con titubeo N terminal y un oligopéptido de síntesis con titubeo C terminal.

45

79. El procedimiento de una cualquiera de las cláusulas 23 a 54 y 56 a 78, en el que la primera o segunda micromatriz de péptidos comprende uno o más péptidos lineales y en el que el procedimiento comprende además la etapa de poner en contacto los uno o más péptidos lineales en la primera o segunda micromatriz de péptidos con una proteasa que pueda digerir los uno o más péptidos lineales.

50

80. El procedimiento de la cláusula 79, en el que la proteasa es una amino proteasa o una mezcla de amino proteasas.

81. El procedimiento de la cláusula 79, en el que la proteasa es dipeptidil peptidasa IV, aminopeptidasa m o una combinación de las mismas.

82. Un polipéptido de andamio de anticuerpo de vaca presentado en ARNm que comprende un péptido de interés.

83. El polipéptido de andamio de anticuerpo de vaca presentado en ARNm de la cláusula 82 que comprende la secuencia MGCTSVHQETKKYQS(X*)₂SYTYNYEHVDVWGCG (SEQ ID NO: 1) en el que (X*)₂ es una secuencia de

- aminoácidos aleatoria, y en el que X* es una secuencia de aminoácidos y c es el número de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos aleatoria.
- 5 84. El polipéptido de andamio de anticuerpo de vaca presentado en ARNm de la cláusula 82 que comprende la secuencia **MGCTSVHQETKKYQS(X*)_cSYTYNYEHVDVWGCGSADYKDDDDK** (SEQ ID NO: 2) en el que (X*)_c es una secuencia de aminoácidos aleatoria, y en el que X* es una secuencia de aminoácidos y c es el número de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos aleatoria.
- 10 85. El polipéptido de andamio de anticuerpo de vaca presentado en ARNm de la cláusula 82 que comprende la secuencia **MGCTSVHQETKKYQS(X*)_cSYTYNYEHVDVWGCGSADYKDDDDKKK** (SEQ ID NO: 3) en el que (X*)_c es una secuencia de aminoácidos aleatoria, y en el que X* es una secuencia de aminoácidos y c es el número de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos aleatoria.
- 15 86. El polipéptido de andamio de anticuerpo de vaca presentado en ARNm de una cualquiera de las cláusulas 83 a 85 en el que X* comprende un aminoácido natural.
87. El polipéptido de andamio de anticuerpo de vaca presentado en ARNm de una cualquiera de las cláusulas 83 a 85 en el que X* comprende un aminoácido no natural.
- 20 88. El polipéptido de andamio de anticuerpo de vaca presentado en ARNm de una cualquiera de las cláusulas 83 a 87, en el que c es un número entero de 1 a 40.
89. El polipéptido de andamio de anticuerpo de vaca presentado en ARNm de una cualquiera de las cláusulas 83 a 87, en el que c es un número entero de 1 a 10.
- 25 90. El polipéptido de andamio de anticuerpo de vaca presentado en ARNm de una cualquiera de las cláusulas 83 a 89 en el que (X*)_c comprende la secuencia del péptido de interés.
- 30 91. El polipéptido de andamio de anticuerpo de vaca presentado en ARNm de la cláusula 90 en el que el péptido de interés es un péptido terapéutico.
92. Una micromatriz de péptidos que comprende un polipéptido de andamio de anticuerpo de vaca que comprende un péptido de interés.
- 35 93. La micromatriz de péptidos de la cláusula 92, en la que el polipéptido de andamio de anticuerpo de vaca comprende la secuencia **MGCTSVHQETKKYQS(X*)_cSYTYNYEHVDVWGCG** (SEQ ID NO: 1) en el que (X*)_c es una secuencia de aminoácidos aleatoria, y en el que X* es una secuencia de aminoácidos y c es el número de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos aleatoria.
- 40 94. La micromatriz de péptidos de la cláusula 92, en la que el polipéptido de andamio de anticuerpo de vaca comprende la secuencia **MGCTSVHQETKKYQS(X*)_cSYTYNYEHVDVWGCGSADYKDDDDK** (SEQ ID NO: 2) en el que (X*)_c es una secuencia de aminoácidos aleatoria, y en el que X* es una secuencia de aminoácidos y c es el número de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos aleatoria.
- 45 95. La micromatriz de péptidos de la cláusula 92, en la que el polipéptido de andamio de anticuerpo de vaca comprende la secuencia **MGCTSVHQETKKYQS(X*)_cSYTYNYEHVDVWGCGSADYKDDDDKKK** (SEQ ID NO: 3) en el que (X*)_c es una secuencia de aminoácidos aleatoria, y en el que X* es una secuencia de aminoácidos y c es el número de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos aleatoria.
- 50 96. La micromatriz de péptidos de una cualquiera de las cláusulas 93 a 95, en la que X* comprende un aminoácido natural.
97. La micromatriz de péptidos de una cualquiera de las cláusulas 93 a 95 en la que X* comprende un aminoácido no natural.
- 55 98. La micromatriz de péptidos de una cualquiera de las cláusulas 93 a 97, en la que c es un número entero de 1 a 40.
99. La micromatriz de péptidos de una cualquiera de las cláusulas 93 a 97, en la que c es un número entero de 1 a 10.
- 60 100. La micromatriz de péptidos de una cualquiera de las cláusulas 93 a 99 en la que (X*)_c comprende la secuencia del péptido de interés.
101. La micromatriz de péptidos de la cláusula 100 en la que el péptido de interés es un péptido terapéutico.

102. El procedimiento, el polipéptido de andamio de anticuerpo de vaca presentado en ARNm o la micromatriz de péptidos de una cualquiera de las cláusulas 1 a 101, en los que el polipéptido de andamio de anticuerpo de vaca comprende un casete de secuencia de aminoácidos aleatoria y el casete de secuencia de aminoácidos aleatoria comprende la secuencia del péptido de interés.

5 103. El procedimiento, el polipéptido de andamio de anticuerpo de vaca presentado en ARNm o la micromatriz de péptidos de la cláusula 102, en los que el casete de secuencia de aminoácidos aleatoria no incluye la secuencia de un anticuerpo, un fragmento de un anticuerpo o un fragmento de péptido derivado de un anticuerpo.

10 104. El procedimiento de la cláusula 43 o 44 en el que la secuencia de reconocimiento de butelasa 1 es NHV.

105. El procedimiento de la cláusula 45, 46, 66 o 67, en el que la cadena lateral de glutamina es parte de la secuencia [WY][DE][DE][YW]ALQ[GST]YD (SEQ ID NO: 4) y la cadena lateral de lisina es parte de la secuencia RSKLG (SEQ ID NO: 5).

15 106. El procedimiento de una cualquiera de las cláusulas 1 a 22 que comprende además la etapa de sintetizar el polipéptido de andamio de anticuerpo de vaca que comprende el péptido de interés en una micromatriz de péptidos para madurar y/o extender el péptido de interés o la etapa de sintetizar el péptido de interés en una micromatriz de péptidos para madurar y/o extender el péptido de interés.

20 107. El procedimiento, el polipéptido de andamio de anticuerpo de vaca presentado en ARNm o la micromatriz de péptidos de una cualquiera de las cláusulas 1 a 101, en los que el polipéptido de andamio de anticuerpo de vaca comprende un casete de secuencia de aminoácidos aleatoria en los que el casete de secuencia de aminoácidos aleatoria comprende la secuencia del péptido de interés y en los que el casete de secuencia de aminoácidos aleatoria se usa para la selección de péptidos de interés.

25 108. Un polipéptido de andamio de anticuerpo de vaca que comprende un casete de secuencia de aminoácidos aleatoria.

30 En cualquiera de los diversos modos de realización descritos en el presente documento, los siguientes rasgos característicos pueden estar presentes donde corresponda, proporcionando modos de realización adicionales de la invención. Para todos los modos de realización, también se contempla cualquier combinación aplicable de modos de realización.

35 Presentación en ARNm usando polipéptidos de andamio de anticuerpos de vaca

En un modo de realización de los procedimientos y composiciones descritos en el presente documento, la presentación en ARNm se puede usar como un procedimiento para seleccionar un péptido de interés. En modos de realización alternativos, se pueden usar otras técnicas de presentación para seleccionar péptidos de interés, que incluyen, pero sin limitarse a, la presentación en fagos, la presentación en superficie de levadura, la presentación en ADNc y la presentación en ribosomas.

45 La presentación en ARNm es una técnica de presentación y selección usada para la identificación *in vitro* de péptidos, por ejemplo, que tienen propiedades deseadas y se pueden unir a una molécula diana de interés con alta afinidad. La presentación en ARNm da como resultado péptidos traducidos que están asociados con su ARNm molde por medio de un enlace aceptor de peptidilo. Para lograr un complejo de este tipo, se puede usar un conector aceptor de peptidilo, tal como puromicina, que es un análogo terminal de ARNt acilado. Por ejemplo, se puede unir puromicina al extremo 3' del ARNm por medio de un conector adecuado, y el conjugado unido se añade a una reacción de traducción *in vitro* para incorporar puromicina al sitio A del ribosoma, y para formar un enlace covalente entre la puromicina y un péptido en el proceso de alargamiento. Los conjugados de fusión ARNm-péptido (por ejemplo, los conjugados de fusión de polipéptido de andamio de anticuerpo de vaca-ARNm descritos en el presente documento) se pueden retrotranscribir a ADN (por ejemplo, para formar los híbridos de ARNm-ADN de los conjugados de fusión de polipéptido de andamio de anticuerpo de vaca-ARNm descritos en el presente documento). Los híbridos de ARNm-ADN de los conjugados de fusión de polipéptido de andamio de anticuerpo de vaca-ARNm se pueden unir a una molécula diana inmovilizada o una molécula diana en solución en una etapa de selección, tal como cromatografía de afinidad. Se pueden aislar híbridos de ARNm-ADN de los conjugados de fusión de polipéptido de andamio de anticuerpo de vaca-ARNm que se unen fuertemente a la molécula diana, y su secuencia se puede amplificar por medio de PCR. El resultado es una secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido que se puede unir con alta afinidad a la molécula diana. Usando la presentación en ARNm, se pueden crear diversas colecciones de péptidos con un gran número de secuencias aleatorias (por ejemplo, del orden de 10^{13} secuencias aleatorias o 10^{13} secuencias aleatorias con diez aminoácidos aleatorios).

65 Los procedimientos para la presentación en ARNm son bien conocidos en la técnica y se describen en Roberts *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, 94:12297-12302, Nemoto *et al.*, *FEBS Lett.*, 1997, 414:405-408, Keefe *et al.*, *Nature*, 2001, 410:715-718, Wilson *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2001, 98:3750-3755; Cho *et al.*, *J Mol Biol.*, 2000, 297:309-319, las patentes de EE. UU. n.ºs 6.258.558, 6.261.804, 6.214.553, 6.281.344, 6.207.446 y 6.518.018, el

documento WO 98/16636, el documento WO 00/34784, el documento WO 01/64942, el documento WO 02/032925 y el documento WO 98/31700. Los procedimientos de tecnología de ADN recombinante, incluyendo, pero sin limitarse a, la preparación de colecciones de ADN, los procedimientos de transcripción *in vitro* y de traducción *in vitro*, los procedimientos de retrotranscripción y la regeneración del ADN usada en la presentación en ARNm también son bien conocidos en la técnica y se describen en Sambrook *et al.*, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 3.^a edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, (2001).

En un aspecto, la transcripción y traducción *in vitro* se puede llevar a cabo en un sistema libre de células tal como, por ejemplo, un extracto de germen de trigo, un lisado de reticulocitos de conejo, un extracto de *Escherichia coli* S30 o un sistema disponible comercialmente (por ejemplo, Síntesis de proteínas *in vitro* PURExpress, New England BioLabs, Inc.; Sistema de transcripción/traducción de acoplamiento rápido TNT T7 (Promega, Madison, Wisconsin)).

En un modo de realización, los péptidos traducidos en la presentación en ARNm se asocian con su ARNm molde por medio de un enlace aceptor de peptidilo. Un enlace aceptor de peptidilo se puede referir a cualquier molécula que se pueda añadir al extremo C de una cadena peptídica o proteica en crecimiento por la actividad catalítica de una peptidil transferasa ribosómica. Típicamente, dichos enlaces contienen (i) un nucleótido o un resto similar a un nucleótido (por ejemplo, puromicina y análogos de la misma), (ii) un aminoácido o un resto similar a un aminoácido (por ejemplo, cualquiera de los 20 aminoácidos D o L o cualquiera de los análogos de aminoácidos de los mismos (por ejemplo, 0-metil tirosina o cualquiera de los análogos descritos por Ellman *et al.*, Meth. Enzymol., 202:301 (1991), incorporados en el presente documento por referencia), y (iii) un enlace entre los dos (por ejemplo, un enlace éster, amida o cetona en la posición 3' o, menos preferentemente, la posición 2').

En algunos modos de realización, el enlace aceptor de peptidilo es una estructura similar a ARNt distinta de la puromicina. Dichos compuestos incluyen, sin limitación, cualquier compuesto que posea un aminoácido unido a una adenina o un compuesto similar a adenina, tales como nucleótidos de aminoácidos, fenilalanil-adenosina (A-Phe), tirosil adenosina (A-Tyr) y alanil adenosina (A-Ala), así como estructuras unidas a amida, tales como fenilalanil 3' desoxi 3' amino adenosina, alanil 3' desoxi 3' amino adenosina y tirosil 3' desoxi 3' amino adenosina; en cualquiera de estos compuestos, se puede usar cualquiera de los aminoácidos L naturales o sus análogos. Además, también se puede usar un conjugado de estructura 3' similar a ARNt-puromicina.

En algunos modos de realización, los conjugados de fusión de ARNm-péptido (por ejemplo, los conjugados de fusión de polipéptido de andamio de anticuerpo de vaca-ARNm descritos en el presente documento) se purifican antes de la unión a la molécula diana, por ejemplo, por cromatografía de afinidad. En determinados modos de realización, los conjugados de fusión de ARNm-péptido (por ejemplo, los conjugados de fusión de polipéptido de andamio de anticuerpo de vaca-ARNm descritos en el presente documento) se purifican mediante la unión a un anticuerpo específico para un epítipo presente en el componente peptídico de los conjugados de fusión. El epítipo, por ejemplo, puede ser una marca de secuencia de aminoácidos, por ejemplo, marcas FLAG o HA, incorporadas en la secuencia de aminoácidos del componente peptídico de los conjugados de fusión ARNm-péptido (por ejemplo, los conjugados de fusión de polipéptido de andamio de anticuerpo de vaca-ARNm descritos en el presente documento), por ejemplo, en la región N terminal o C terminal.

En algunos aspectos, antes de la unión a la molécula diana, los conjugados de fusión de polipéptido de andamio de anticuerpo de vaca-ARNm se pueden retrotranscribir. En otro modo de realización, para unir los híbridos de ARNm-ADN de los conjugados de fusión de polipéptido de andamio de anticuerpo de vaca-ARNm (formados después de la retrotranscripción) a la molécula diana de interés, la colección de híbridos de ARNm-ADN de los conjugados de fusión de polipéptido de andamio de anticuerpo de vaca-ARNm se incuban con la molécula diana. Típicamente, la molécula diana se inmoviliza sobre un soporte sólido, tal como una microesfera, pero los híbridos de ARNm-ADN de los conjugados de fusión de polipéptido de andamio de anticuerpo de vaca-ARNm se pueden poner en contacto con la molécula diana en solución, o se puede usar una combinación de estos procedimientos. Después de que los híbridos de ARNm-ADN de los conjugados de fusión de polipéptido de andamio de anticuerpo de vaca-ARNm se incuban con la molécula diana, por ejemplo, inmovilizados sobre un soporte sólido, los híbridos de ARNm-ADN de los conjugados de fusión de polipéptido de andamio de anticuerpo de vaca-ARNm que se unen a la molécula diana permanecen asociados con la molécula diana, y las moléculas que no se unen se eliminan mediante lavado. Los soportes sólidos ejemplares incluyen, por ejemplo, una resina epoxídica, una columna de agarosa, una columna SEPHAROSE™ o un chip BIACORE™. En algunos modos de realización, se puede usar a continuación PCR para amplificar el ADN capturado (es decir, denominado en el presente documento regenerar el ADN), ahora enriquecido para secuencias que codifican péptidos que se unen con alta afinidad a la molécula diana. Un experto en la técnica puede determinar qué constituye una unión de alta afinidad para cualquier interacción específica péptido-molécula diana.

En un aspecto ilustrativo, la población enriquecida se puede introducir a continuación en rondas adicionales de selección de presentación en ARNm. En cualquiera de los modos de realización descritos en el presente documento, se pueden preparar colecciones adicionales de ADN y péptidos para rondas adicionales de selección mediante generación de mutantes usando, por ejemplo, PCR propensa a errores. Estas colecciones adicionales se pueden transcribir y traducir *in vitro* siguiendo etapas similares a las de la primera ronda de selección. Los péptidos de interés adicionales presentados en ARNm se pueden someter a rondas adicionales de cribado frente a la misma molécula diana para seleccionar péptidos de interés con mayor afinidad que el/los seleccionado(s) de la primera ronda de

selección. En un aspecto, se pueden realizar múltiples rondas de selección. En un modo de realización ilustrativo, se puede secuenciar el ADN que codifica un péptido de interés (es decir, un péptido que se une a la molécula diana con alta afinidad) y se puede generar y caracterizar el péptido.

5 En un modo de realización descrito en el presente documento, se proporciona un procedimiento para seleccionar un péptido de interés. El procedimiento comprende las etapas de a) preparar una colección de péptidos usando un polipéptido de andamio de anticuerpo de vaca presentado en ARNm que comprende un péptido de interés que se va a identificar, b) seleccionar el péptido de interés de la colección de péptidos poniendo en contacto una molécula diana con el péptido de interés en el que la molécula diana se inmoviliza sobre un soporte sólido o está en solución y c) identificar la secuencia de aminoácidos del péptido de interés.

15 En un aspecto ilustrativo, la presentación en ARNm puede incluir las etapas de 1) preparar una colección de péptidos mediante la transcripción *in vitro* de una colección de ADN para formar una colección de ARNm, 2) digerir la colección de ADN con DNasa para eliminar el ADN, conjugando el ARNm de la colección de ARNm con un conector, tal como un conector oligonucleotídico de puromicina, 3) traducir *in vitro* el ARNm de la colección de ARNm para formar conjugados de fusión de polipéptido de andamio de anticuerpo de vaca-ARNm (por ejemplo, donde el polipéptido de andamio de anticuerpo de vaca está unido al ARNm por un conector, tal como un conector oligonucleotídico de puromicina), 4) purificar los conjugados de fusión de polipéptido de andamio de anticuerpo de vaca-ARNm usando una marca de purificación que es parte del polipéptido de andamio de anticuerpo de vaca, 5) retrotranscribir el ARNm de la colección de ARNm para formar híbridos de ARNm-ADN de los conjugados de fusión del polipéptido de andamio de anticuerpo de vaca-ARNm, 6) poner en contacto los híbridos de ARNm-ADN de los conjugados de fusión de polipéptido de andamio de anticuerpo de vaca-ARNm con la molécula diana para seleccionar un péptido de interés, y 7) regenerar el ADN a partir de los híbridos de ARNm-ADN de los conjugados de fusión de polipéptido de andamio de anticuerpo de vaca-ARNm.

25 En este modo de realización de presentación en ARNm, el polipéptido de andamio de anticuerpo de vaca puede comprender la secuencia

30 MGCTSVHQETKKYQS(X*)_cSYTYNYEHVDVWGCG (SEQ ID NO:1)
 MGCTSVHQETKKYQS(X*)_cSYTYNYEHVDVWGCGSADYKDDDDK (SEQ ID NO:2) o
 MGCTSVHQETKKYQS(X*)_cSYTYNYEHVDVWGCGSADYKDDDDKKK (SEQ ID NO: 3)

35 en la que (X*)_c es una secuencia de aminoácidos aleatoria, y en la que X* es una secuencia de aminoácidos y c es el número de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos aleatoria. En un modo de realización, X* puede comprender un aminoácido natural o un aminoácido no natural. En otro modo de realización, c puede ser un número entero de 1 a 5, 1 a 6, 1 a 7, 1 a 8, 1 a 9, 1 a 10, 1 a 11, 1 a 12, 1 a 13, 1 a 14, 1 a 15, 1 a 16, 1 a 17, 1 a 18, 1 a 19, 1 a 20, 1 a 21, 1 a 22, 1 a 23, 1 a 24, 1 a 25, 1 a 26, 1 a 27, 1 a 28, 1 a 29, 1 a 30, 1 a 31, 1 a 32, 1 a 33, 1 a 34, 1 a 35, 1 a 36, 1 a 37, 1 a 38, 1 a 39 o 1 a 40. En un modo de realización ilustrativo, (X*)_c puede comprender la secuencia del péptido de interés. En otro modo de realización, el péptido de interés es un péptido terapéutico.

40 En un modo de realización, los polipéptidos de andamio de anticuerpos de vaca descritos en el presente documento comprenden un casete de secuencia de aminoácidos aleatoria. El casete de secuencia de aminoácidos aleatoria incluye una secuencia de aminoácidos aleatoria para la selección de péptidos de interés, y se indica como (X*)_c en el modo de realización ejemplar anterior.

45 En este modo realización de presentación en ARNm, la colección de ADN puede ser una colección de ADNc, la transcripción *in vitro* se puede realizar usando una ARN polimerasa, tal como la ARN polimerasa T7, el conector, tal como un conector oligonucleotídico de puromicina, se puede unir al ARNm en el extremo 3' del ARNm, la marca de purificación que forma parte del polipéptido de andamio de anticuerpo de vaca puede ser cualquier marca de purificación adecuada, tal como una marca FLAG, una AviTag, una marca HA, una marca His o cualquier otra marca de purificación adecuada conocida en la técnica, y puede estar en el extremo N o el extremo C del polipéptido de andamio de anticuerpo de vaca, y los miembros de la colección de ADN pueden comprender una secuencia promotora de ARN polimerasa, una secuencia potenciadora y una secuencia de marca de purificación.

55 En otro modo de realización, se proporciona un polipéptido de andamio de anticuerpo de vaca presentado en ARNm que comprende un péptido de interés. En diversos aspectos, el polipéptido de andamio de anticuerpo de vaca puede comprender la secuencia

60 MGCTSVHQETKKYQS(X*)_cSYTYNYEHVDVWGCG (SEQ ID NO:1)
 MGCTSVHQETKKYQS(X*)_cSYTYNYEHVDVWGCGSADYKDDDDK (SEQ ID NO:2) o
 MGCTSVHQETKKYQS(X*)_cSYTYNYEHVDVWGCGSADYKDDDDKKK (SEQ ID NO: 3)

65 en la que (X*)_c es una secuencia de aminoácidos aleatoria, y en la que X* es una secuencia de aminoácidos y c es el número de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos aleatoria. En un modo de realización, X* puede comprender un aminoácido natural o un aminoácido no natural. En otro modo de realización, c puede ser un número entero de 1 a

- 5, 1 a 6, 1 a 7, 1 a 8, 1 a 9, 1 a 10, 1 a 11, 1 a 12, 1 a 13, 1 a 14, 1 a 15, 1 a 16, 1 a 17, 1 a 18, 1 a 19, 1 a 20, 1 a 21, 1 a 22, 1 a 23, 1 a 24, 1 a 25, 1 a 26, 1 a 27, 1 a 28, 1 a 29, 1 a 30, 1 a 31, 1 a 32, 1 a 33, 1 a 34, 1 a 35, 1 a 36, 1 a 37, 1 a 38, 1 a 39 o 1 a 40. En un modo de realización ilustrativo, (X*)_c puede comprender la secuencia del péptido de interés. En otro modo de realización, el péptido de interés es un péptido terapéutico. En un modo de realización, los polipéptidos de andamio de anticuerpos de vaca descritos en el presente documento comprenden un casete de secuencia de aminoácidos aleatoria. El casete de secuencia de aminoácidos aleatoria incluye una secuencia de aminoácidos aleatoria para la selección de péptidos de interés, y se indica como (X*)_c en el modo de realización ejemplar anterior.
- 10 En otros modos de realización, se pueden usar otros polipéptidos de andamio de anticuerpos de vaca como sigue. En un modo de realización, el polipéptido de andamio de anticuerpo de vaca puede comprender un motivo N (base N terminal), un motivo A (hebra beta ascendente), un motivo R (aleatorio), un motivo D (hebra beta descendente) y un motivo C (base C terminal) (véase la figura 6 por ejemplo). En un modo de realización, el motivo N puede comprender un péptido seleccionado del grupo que consiste en CTTVHQ (SEQ ID NO:6), CTSVHQ (SEQ ID NO:7), CSSVTQ (SEQ ID NO:8), CSTVHQ (SEQ ID NO:9), CATVRQ (SEQ ID NO:10), CSPVHQ (SEQ ID NO:11), CATVYQ (SEQ ID NO:12), CTAVYQ (SEQ ID NO:13), CTNVHQ (SEQ ID NO:14), CATVHQ (SEQ ID NO:15), CTTVRQ (SEQ ID NO:16), CSTVYQ (SEQ ID NO:17), CTIVHQ (SEQ ID NO:18), CAIVYQ (SEQ ID NO:19), CTTVYQ (SEQ ID NO:20), CTTVFQ (SEQ ID NO:21), CAAVFQ (SEQ ID NO:22), CGTVHQ (SEQ ID NO:23), CASVHQ (SEQ ID NO:24), CTAVFQ (SEQ ID NO:25), CATVFQ (SEQ ID NO:26), CAAAHQ (SEQ ID NO:27), CVVVYQ (SEQ ID NO:28), CGTVFQ (SEQ ID NO:29), CGAVHQ (SEQ ID NO:30), CATKKQ (SEQ ID NO:31), CITVHQ (SEQ ID NO:32), CTIVHQ (SEQ ID NO:33), CITAHQ (SEQ ID NO:34), CVIVHQ (SEQ ID NO:35), CTIVNQ (SEQ ID NO:36), CAAVHQ (SEQ ID NO:37), CGTVYQ (SEQ ID NO:38), CVTVHQ (SEQ ID NO:39), CTTVLQ (SEQ ID NO:40), CTTTHQ (SEQ ID NO: 41) y CTTDYQ (SEQ ID NO: 42). En otro modo de realización, el motivo A puede comprender un péptido seleccionado del grupo que consiste en ETKKYQS (SEQ ID NO:43), ETRKT (SEQ ID NO:44), RTHVSR (SEQ ID NO:45), KTRRKT (SEQ ID NO:46), IF (SEQ ID NO:47), KTRTTQGNT (SEQ ID NO:48), TTLRD (SEQ ID NO:49), KTRTTQGEYLSLMVTLLKDD (SEQ ID NO:50), KTRTTQGNLSLMVTLLKDD (SEQ ID NO:51), KTRTTQGNT (SEQ ID NO:52), KPGQHKGILVLMVTLLKDD (SEQ ID NO:53), KTRTTQGILVLMVTLLKDD (SEQ ID NO:54), ETKKN (SEQ ID NO:55), EIRKC (SEQ ID NO:56), QTRKC (SEQ ID NO:57), QTRKS (SEQ ID NO:58), KTNQSKN (SEQ ID NO:59), TTHQIHT (SEQ ID NO:60), KTTSIRS (SEQ ID NO:61), KTKKT (SEQ ID NO:62), KTKKL (SEQ ID NO:63), HTNKKR (SEQ ID NO:64), HTNQNR (SEQ ID NO:65), KTNER (SEQ ID NO:66), KTNERC (SEQ ID NO:67), KTNRERC (SEQ ID NO:68), STNKKD (SEQ ID NO:69), ETLIR (SEQ ID NO:70), KTRTT (SEQ ID NO:71), KTNREMS (SEQ ID NO:72), ETKRS (SEQ ID NO:73), RTRQR (SEQ ID NO:74), KTETR (SEQ ID NO:75), KTNKES (SEQ ID NO:76), KSRKES (SEQ ID NO:77), ETRTN (SEQ ID NO:78), KTEKH (SEQ ID NO:79), KTKEL (SEQ ID NO:80), HTEPT (SEQ ID NO:81), ETRKS (SEQ ID NO:82), ETRKD (SEQ ID NO:83), ETKKS (SEQ ID NO:84), KTRTTQGNT (SEQ ID NO:85), KTNQSKS (SEQ ID NO:86), QTHKVRD (SEQ ID NO:87), RTGQK (SEQ ID NO:88), KTKQN (SEQ ID NO:89), QTHEKRS (SEQ ID NO:90), QTKRKS (SEQ ID NO:91), ETKRT (SEQ ID NO:92), ETQKS (SEQ ID NO:93), ETHKR (SEQ ID NO:94), ETHKN (SEQ ID NO:95), QTHATRR (SEQ ID NO:96), RTEGQQS (SEQ ID NO:97), ETKTKSG (SEQ ID NO:98), HTKEIKT (SEQ ID NO:99), ETHQQRG (SEQ ID NO:100), KTEKK (SEQ ID NO:101), RTQKS (SEQ ID NO:102), QTNKR (SEQ ID NO:103), ETQRTS (SEQ ID NO:104), KDKH (SEQ ID NO:105), QTTEKGKT (SEQ ID NO:106), KTDVT (SEQ ID NO:107), ETHTQRT (SEQ ID NO:108), KTEKS (SEQ ID NO:109), KTNQKQW (SEQ ID NO:110), ETRTN (SEQ ID NO:111), KTTTTS (SEQ ID NO:112), KTEQR (SEQ ID NO:113), MTKT (SEQ ID NO:114), KTESVRS (SEQ ID NO:115), QTTNR (SEQ ID NO:116), LTKKT (SEQ ID NO:117), KTTQQS (SEQ ID NO:118), HTNKKR (SEQ ID NO:119), QTRKS (SEQ ID NO:120), KTARS (SEQ ID NO:121), IC (SEQ ID NO:122), QTTKR (SEQ ID NO:123), LTRAH (SEQ ID NO:124), RTEKS (SEQ ID NO:125), RTKRS (SEQ ID NO:126), ITHKE (SEQ ID NO:127), HTTTKNT (SEQ ID NO:128), KTLK (SEQ ID NO:129), EVQKKT (SEQ ID NO:130), KTQRS (SEQ ID NO:131), ETKTRST (SEQ ID NO:132), RTTTERS (SEQ ID NO:133), KTQRT (SEQ ID NO:134), y KTRTTQGNT (SEQ ID NO: 135).
- 20 Aún en otro modo de realización, el D puede comprender un péptido seleccionado del grupo que consiste en CYTYNYEF (SEQ ID NO:136), HYTYTYDF (SEQ ID NO:137), HYTYTYEW (SEQ ID NO:138), KHRYTYEW (SEQ ID NO:139), NYIYKYSF (SEQ ID NO:140), PYIYTYQF (SEQ ID NO:141), SFTYTYEW (SEQ ID NO:142), SYIYIYQW (SEQ ID NO:143), SYNYTYSW (SEQ ID NO:144), SYSYSYEF (SEQ ID NO:145), SYTYNYDF (SEQ ID NO:146), SYTYNYEW (SEQ ID NO:147), SYTYNYQF (SEQ ID NO:148), SYVWTHNF (SEQ ID NO:149), TYKYVYEW (SEQ ID NO:150), TYTYTYEF (SEQ ID NO:151), TYTYTYEW (SEQ ID NO:152), VFTYTYEF (SEQ ID NO:153), AYTYEW (SEQ ID NO:154), DYIYTY (SEQ ID NO:155), IHSYEF (SEQ ID NO:156), SFTYEF (SEQ ID NO:157), SHSYEF (SEQ ID NO:158), THTYEF (SEQ ID NO:159), TWTYEF (SEQ ID NO:160), TYNYEW (SEQ ID NO:161), TYSYEF (SEQ ID NO:162), TYSYEH (SEQ ID NO:163), TYTYDF (SEQ ID NO:164), TYTYEF (SEQ ID NO:165), TYTYEW (SEQ ID NO:166), AYEF (SEQ ID NO:167), AYSF (SEQ ID NO:168), AYSY (SEQ ID NO:169), CYSF (SEQ ID NO:170), DYT (SEQ ID NO:171), KYEH (SEQ ID NO:172), KYEW (SEQ ID NO:173), MYEF (SEQ ID NO:174), NWIY (SEQ ID NO:175), NYDY (SEQ ID NO:176), NYQW (SEQ ID NO:177), NYSF (SEQ ID NO:178), PYEW (SEQ ID NO:179), RYNW (SEQ ID NO:180), RYTY (SEQ ID NO:181), SYEF (SEQ ID NO:182), SYEH (SEQ ID NO:183), SYEW (SEQ ID NO:184), SYKW (SEQ ID NO:185), SYTY (SEQ ID NO:186), TYDF (SEQ ID NO:187), TYEF (SEQ ID NO:188), TYEW (SEQ ID NO:189), TYQW (SEQ ID NO:190), TYTY (SEQ ID NO:191), y VYEW (SEQ ID NO: 192). Todavía en otro modo de realización ilustrativo, el motivo C puede comprender un péptido seleccionado del grupo que consiste en YVDAW
- 25

(SEQ ID NO:193), HVDVW (SEQ ID NO:194), HVDW (SEQ ID NO:195), GVDW (SEQ ID NO:196), YIDW (SEQ ID NO:197), HVDSW (SEQ ID NO:198), HIDW (SEQ ID NO:199), YVDTW (SEQ ID NO:200), NVDAW (SEQ ID NO:201), HVNAW (SEQ ID NO:202), YVTAW (SEQ ID NO:203), YITAW (SEQ ID NO:204), YVEAW (SEQ ID NO:205), HVDEW (SEQ ID NO:206), HVDTW (SEQ ID NO:207), YADW (SEQ ID NO:208), YGDW (SEQ ID NO:209), HADW (SEQ ID NO:210), YVEAW (SEQ ID NO:211), NVDSW (SEQ ID NO:212), NVDAW (SEQ ID NO:213), GVDW (SEQ ID NO:214), NIDW (SEQ ID NO:215), RIDVM (SEQ ID NO:216), YVETW (SEQ ID NO:217), YVNAW (SEQ ID NO:218), HADVW (SEQ ID NO:219), HVESW (SEQ ID NO:220), HVETW (SEQ ID NO:221),

NVEAW (SEQ ID NO:222), YVDSW (SEQ ID NO:223), y RVDTW (SEQ ID NO: 224). En otro aspecto, el motivo R puede ser una secuencia de aminoácidos aleatoria $(X^*)_c$, en la que X^* es una secuencia de aminoácidos y c es el número de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos aleatoria.

5 En los diversos modos de realización descritos en el presente documento, la molécula diana puede ser cualquier molécula, incluyendo, pero sin limitarse a, una biomacromolécula, tal como una proteína, un péptido, un ácido nucleico (por ejemplo, ADN o ARN), un polícarbohidrato o una molécula pequeña tal como un compuesto orgánico o un complejo organometálico, o cualquier otra molécula que contribuya a una enfermedad, tal como las enfermedades
10 enumeradas a continuación (por ejemplo, un receptor para el péptido terapéutico, una enzima inhibida o activada por el péptido terapéutico, o cualquier otra molécula en la que la actividad de la molécula se altera por el péptido terapéutico). En un modo de realización, la molécula diana puede ser una molécula implicada en un estado de enfermedad y el péptido de interés o el péptido cíclico pueden ser un péptido terapéutico.

15 En el modo de realización donde el péptido de interés o el péptido cíclico es un péptido terapéutico, la enfermedad que se trata se puede seleccionar del grupo que consiste en cáncer, una enfermedad infecciosa, cardiopatía (por ejemplo, aterosclerosis) y otras enfermedades relacionadas con el colesterol, apoplejía, heridas, dolor, una enfermedad inflamatoria, tal como artritis (por ejemplo, artritis reumatoide), enfermedad inflamatoria intestinal, psoriasis, diabetes *mellitus* o una enfermedad autoinmunitaria, una enfermedad respiratoria, tal como asma o
20 enfermedad pulmonar obstructiva crónica, enfermedades diarreicas, una enfermedad genética, un trastorno neurológico, tal como enfermedad de Alzheimer, distrofia muscular o enfermedad de Parkinson, un trastorno mental o cualquier otro tipo de enfermedad que se pueda tratar con un péptido terapéutico (por ejemplo, un péptido cíclico).

25 En otros modos de realización, la enfermedad puede ser un cáncer seleccionado del grupo que consiste en un carcinoma, un sarcoma, un linfoma, un melanoma, un mesotelioma, un carcinoma nasofaríngeo, una leucemia, un adenocarcinoma y un mieloma. Aún en otros modos de realización, la enfermedad puede ser un cáncer seleccionado del grupo que consiste en cáncer de pulmón, cáncer óseo, cáncer de páncreas, cáncer de piel, cáncer de cabeza o cuello, melanoma, cáncer de útero, cáncer de ovario, cáncer de endometrio, cáncer de recto, cáncer de estómago,
30 cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, enfermedad hodgkiniana, cáncer de esófago, cáncer de pulmón no microcítico, cáncer de próstata, leucemia, linfoma, mesotelioma, cáncer de vejiga, linfoma de Burkitt, cáncer de riñón y cáncer cerebral, o cualquier otro tipo de cáncer que se pueda tratar con un péptido terapéutico (por ejemplo, un péptido cíclico).

35 Micromatrices de péptidos y su uso

En un modo de realización, se proporciona una micromatriz de péptidos que comprende un polipéptido de andamio de anticuerpo de vaca que comprende un péptido de interés. En otro modo de realización, se proporciona una micromatriz de péptidos que comprende el péptido de interés identificado usando el polipéptido de andamio de anticuerpo de vaca.

40 En diversos aspectos, el polipéptido de andamio de anticuerpo de vaca puede comprender la secuencia MGCTSVHQETKKYQS $(X^*)_c$ SYTYNYEHVDVWGCG (SEQ ID NO: 1), MGCTSVHQETKKYQS $(X^*)_c$ SYTYNYEHVDVWGCGSADYKDDDDK (SEQ ID NO: 2) o
45 MGCTSVHQETKKYQS $(X^*)_c$ SYTYNYEHVDVWGCGSADYKDDDDKKK (SEQ ID NO: 3) en la que $(X^*)_c$ es una secuencia de aminoácidos aleatoria, y en la que X^* es una secuencia de aminoácidos y c es el número de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos aleatoria. En un modo de realización, X^* puede comprender un aminoácido natural o un aminoácido no natural. En otro modo de realización, c puede ser un número entero de 1 a 5, 1 a 6, 1 a 7, 1 a 8, 1 a 9, 1 a 10, 1 a 11, 1 a 12, 1 a 13, 1 a 14, 1 a 15, 1 a 16, 1 a 17, 1 a 18, 1 a 19, 1 a 20, 1 a 21, 1 a 22, 1 a 23, 1 a 24,
50 1 a 25, 1 a 26, 1 a 27, 1 a 28, 1 a 29, 1 a 30, 1 a 31, 1 a 32, 1 a 33, 1 a 34, 1 a 35, 1 a 36, 1 a 37, 1 a 38, 1 a 39 o 1 a 40. En un modo de realización ilustrativo, $(X^*)_c$ puede comprender la secuencia del péptido de interés. En otro modo de realización, el péptido de interés es un péptido terapéutico.

En un modo de realización, los polipéptidos de andamio de anticuerpos de vaca descritos en el presente documento comprenden un casete de secuencia de aminoácidos aleatoria. El casete de secuencia de aminoácidos aleatoria incluye una secuencia de aminoácidos aleatoria para la selección de péptidos de interés, y se indica como $(X^*)_c$ en el modo de realización ejemplar anterior.

En estos modos de realización, el término "aminoácido natural" se refiere a uno de los 20 aminoácidos que se encuentran típicamente en proteínas y se usan para la biosíntesis de proteínas, así como a otros aminoácidos que se

pueden incorporar en las proteínas durante la traducción (incluyendo pirrolisina y selenocisteína). Los 20 aminoácidos naturales incluyen histidina, alanina, valina, glicina, leucina, isoleucina, ácido aspártico, ácido glutámico, serina, glutamina, asparagina, treonina, arginina, prolina, fenilalanina, tirosina, triptófano, cisteína, metionina y lisina.

5 En estos modos de realización, el término "aminoácido no natural" se refiere a un compuesto orgánico que no está entre los codificados por el código genético estándar o se incorpora en las proteínas durante la traducción. Por lo tanto, los aminoácidos no naturales incluyen, pero no se limitan a aminoácidos o análogos de aminoácidos, los estereoisómeros D de aminoácidos, los análogos beta-amino de aminoácidos, citrulina, homocitrulina, homoarginina, hidroxiprolina, homoprolina, ornitina, 4-amino-fenilalanina, ciclohexilalanina, ácido α -aminoisobutírico, *N*-metilalanina, *N*-metil-glicina, norleucina, ácido *N*-metil glutámico, *terc*-butilglicina, ácido α -aminobutírico, *terc*-butilalanina, ácido 2-aminoisobutírico, ácido α -aminoisobutírico, ácido 2-aminoindano-2-carboxílico, selenometionina, deshidroalanina, lantionina, ácido γ -aminobutírico y derivados de los mismos en los que el nitrógeno amínico está mono o dialquilado.

15 En el modo de realización donde el péptido de interés o el péptido cíclico es un péptido terapéutico, la enfermedad que se trata se puede seleccionar del grupo que consiste en cáncer, una enfermedad infecciosa, cardiopatía (por ejemplo, aterosclerosis) y otras enfermedades relacionadas con el colesterol, apoplejía, heridas, dolor, una enfermedad inflamatoria, tal como artritis (por ejemplo, artritis reumatoide), enfermedad inflamatoria intestinal, psoriasis, diabetes *mellitus* o una enfermedad autoinmunitaria, una enfermedad respiratoria, tal como asma o enfermedad pulmonar obstructiva crónica, enfermedades diarreicas, una enfermedad genética, un trastorno neurológico, tal como enfermedad de Alzheimer, distrofia muscular o enfermedad de Parkinson, un trastorno mental o cualquier otro tipo de enfermedad que se pueda tratar con un péptido terapéutico (por ejemplo, un péptido cíclico).

25 En otros modos de realización, la enfermedad puede ser un cáncer seleccionado del grupo que consiste en un carcinoma, un sarcoma, un linfoma, un melanoma, un mesotelioma, un carcinoma nasofaríngeo, una leucemia, un adenocarcinoma y un mieloma. Aún en otros modos de realización, la enfermedad puede ser un cáncer seleccionado del grupo que consiste en cáncer de pulmón, cáncer óseo, cáncer de páncreas, cáncer de piel, cáncer de cabeza o cuello, melanoma, cáncer de útero, cáncer de ovario, cáncer de endometrio, cáncer de recto, cáncer de estómago, cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, enfermedad hodgkiniana, cáncer de esófago, cáncer de pulmón no microcítico, cáncer de próstata, leucemia, linfoma, mesotelioma, cáncer de vejiga, linfoma de Burkitt, cáncer de riñón y cáncer cerebral, o cualquier otro tipo de cáncer que se pueda tratar con un péptido terapéutico (por ejemplo, un péptido cíclico).

35 En el modo de realización donde el péptido de interés o el péptido cíclico es un péptido terapéutico, la molécula diana puede ser, por ejemplo, una proteína u otra molécula que contribuye a una enfermedad, tal como las enfermedades enumeradas anteriormente (por ejemplo, un receptor para el péptido terapéutico, una enzima inhibida o activada por el péptido terapéutico, o cualquier otra molécula en la que la actividad de la molécula se altera por el péptido terapéutico).

40 En otro modo de realización, la presentación en ARNm como se describe anteriormente en el presente documento usando el polipéptido de andamio de anticuerpo de vaca para seleccionar un péptido de interés va seguida de la sintetización del polipéptido de andamio de anticuerpo de vaca que comprende el péptido de interés en una o más micromatrices de péptidos o la sintetización del péptido de interés, identificado usando el polipéptido de andamio de anticuerpo de vaca, en una o más micromatrices de péptidos. En diversos modos de realización, este procedimiento puede comprender cualquiera de los procedimientos de las cláusulas 56 a 73 descritos anteriormente en esta sección de Descripción detallada de la solicitud.

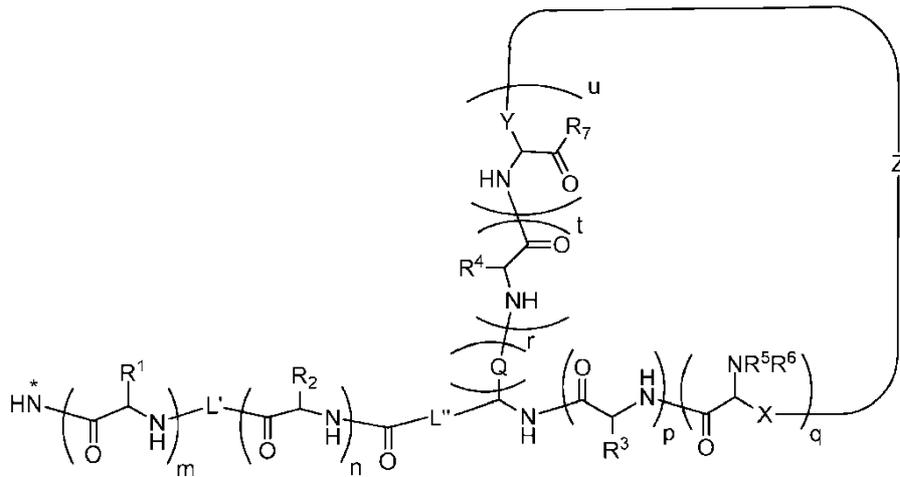
Aún en otro modo de realización, el péptido de interés, identificado usando la presentación en ARNm, se sintetiza a continuación en una micromatriz de péptidos y se madura y/o extiende y se cicla *in situ* en la micromatriz de péptidos.

50 En un modo de realización ilustrativo, el procedimiento de maduración/extensión/ciclación comprende las etapas de:

a) sintetizar el péptido de interés, o derivados del mismo, en una primera micromatriz de péptidos, en el que los derivados del péptido de interés incluyen al menos una alteración en la secuencia del péptido de interés seleccionada de una única sustitución aminoacídica, una doble sustitución aminoacídica, una delección de uno o más aminoácidos, y una inserción de uno o más aminoácidos, con lo que se generan péptidos funcionalizados en la primera micromatriz de péptidos;

b) formar a partir de los péptidos funcionalizados, en los que los péptidos funcionalizados están en forma lineal, péptidos cíclicos de fórmula I

60



I

en la que cada R¹, R², R³ y R⁴ es independientemente una cadena lateral de aminoácido natural o una cadena lateral de aminoácido no natural;

5

cada R⁵ y R⁶ es independientemente hidrógeno o un grupo de caperuza N terminal;

cada R⁷ es independientemente -OH o un grupo de caperuza C terminal;

10

Q se selecciona del grupo que consiste en un carbonilo, una cadena lateral de aminoácido natural y una cadena lateral de aminoácido no natural;

cada X e Y se selecciona independientemente del grupo que consiste en un enlace, una cadena lateral de aminoácido natural unida covalentemente a Z y una cadena lateral de aminoácido no natural unida covalentemente a Z;

15

Z es un grupo que comprende un resto seleccionado del grupo que consiste en un enlace amida, un enlace disulfuro, un enlace isopeptídico, un 1,2,3-triazol y una 1,2-quinona opcionalmente sustituida;

L' y L'' son cada uno independientemente un grupo de unión bivalente opcional o un enlace;

20

m es un número entero de 0 a 6;

n es un número entero de 0 a 6;

25

p es un número entero de 0 a 100;

q es 0 o 1;

r es 0 o 1;

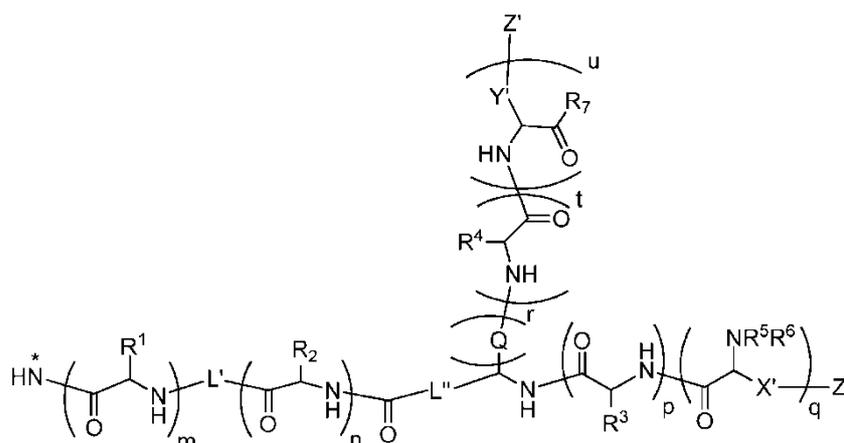
30

t es un número entero de 0 a 100;

u es 0 o 1; y * es un punto de conexión que conecta el péptido cíclico a un soporte de matriz que tiene una superficie reactiva;

35

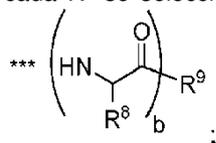
comprendiendo el procedimiento la etapa de hacer reaccionar un péptido funcionalizado de fórmula II en condiciones que hacen que se forme Z



II

en la que R¹, R², R³, R⁴, R⁵, R⁶, Q, m, n, p, q, r, t, u y * son como se define para la fórmula I;

5 cada R⁷ se selecciona independientemente del grupo que consiste en -OH, un grupo de caperuza C terminal y



cada R⁸ es independientemente una cadena lateral de aminoácido natural o una cadena lateral de aminoácido no natural;

10

cada R⁹ es independientemente -OH o un grupo de caperuza C terminal;

cada X' se selecciona independientemente del grupo que consiste en un enlace, una cadena lateral de aminoácido natural unida covalentemente a Z'' y una cadena lateral de aminoácido no natural unida covalentemente a Z'';

15

cada Y' se selecciona independientemente del grupo que consiste en un enlace, una cadena lateral de aminoácido natural unida covalentemente a Z' y una cadena lateral de aminoácido no natural unida covalentemente a Z';

20

Z' y Z'' se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en un enlace, -OH, hidrógeno, un tiol, una amina, un ácido carboxílico, una amida, un alquino, una acida, un aminofenol opcionalmente sustituido, una cadena lateral de aminoácido natural, una cadena lateral de aminoácido no natural, un grupo protector N terminal y un grupo protector C terminal, siempre que Z' y Z'' sean grupos complementarios que se combinen para formar Z;

25

b es un número entero de 0 a 50;

y *** es un punto de conexión con el resto del péptido funcionalizado;

en el que los péptidos funcionalizados y los péptidos cíclicos se inmovilizan en la superficie reactiva;

30

c) exponer los péptidos cíclicos a la molécula diana, con lo que la molécula diana se une a al menos un péptido cíclico;

d) identificar uno o más de los péptidos cíclicos que demuestran una fuerte unión a la molécula diana, con lo que se determina una secuencia de unión al núcleo madurada;

35

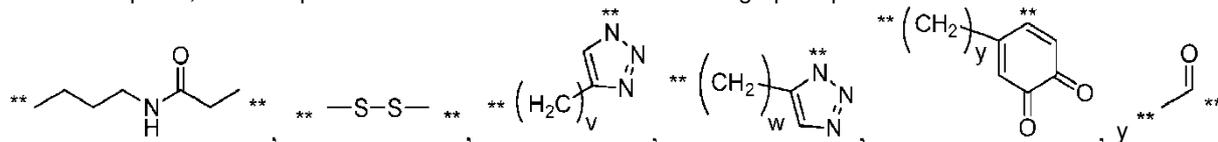
e) realizar al menos una de la extensión N terminal y C terminal de la secuencia de unión al núcleo madurada determinada en la etapa d para proporcionar una secuencia de unión al núcleo extendida y madurada en una segunda micromatriz de péptidos;

40

f) exponer la molécula diana a la segunda micromatriz de péptidos que comprende una población de péptidos de la secuencia de unión al núcleo extendida y madurada generados en la etapa e en la que la población de péptidos de la secuencia de unión al núcleo extendida y madurada comprende péptidos cíclicos formados como en la etapa b; e

g) identificar un péptido cíclico extendido y madurado con una fuerte unión a la molécula diana.

En un aspecto, Z comprende un resto seleccionado del grupo que consiste en un enlace amida,



5 en el que v es un número entero de 0 a 6, w es un número entero de 0 a 6 e y es un número entero de 0 a 6, y ** es un punto de conexión con el resto del péptido cíclico. En otro aspecto, Z comprende un enlace peptídico, Z' comprende un grupo protector N terminal, Q es un carbonilo, q es 0, r es 1 y u es 0.

10 En otro modo de realización, el procedimiento comprende además eliminar Z' del resto del péptido funcionalizado para provocar que se forme el enlace peptídico.

Aún en otro modo de realización, X e Y son enlaces a Z, Z comprende ** -S-S- **, X' es un enlace a Z'', Y' es un enlace a Z', Z' y Z'' comprenden cadenas laterales de cisteína, q es 1 y u es 1. En otro aspecto, el procedimiento comprende además someter el péptido funcionalizado a condiciones oxidativas para provocar que se forme ** -S-S- **.

15 Todavía en otro modo de realización, Y es un enlace a Z, Z comprende $\text{**} (\text{H}_2\text{C})_v \text{---} \text{N} \text{---} \text{N} \text{---} \text{N} \text{---} \text{**}$, Y' es un enlace a Z', Z' comprende $\text{***} (\text{H}_2\text{C})_v \text{---} \text{C} \equiv \text{C} \text{---} \text{**}$, Z'' comprende una acida, u es 1 y v es 1. En este modo de realización, el procedimiento puede comprender además poner en contacto el péptido funcionalizado con un catalizador de cobre para provocar

20 que se forme $\text{**} (\text{H}_2\text{C})_v \text{---} \text{N} \text{---} \text{N} \text{---} \text{N} \text{---} \text{**}$.

En otro aspecto ilustrativo, Y es un enlace a Z, Z comprende $\text{**} (\text{CH}_2)_w \text{---} \text{N} \text{---} \text{N} \text{---} \text{N} \text{---} \text{**}$, Y' es un enlace a Z', Z' comprende $\text{***} (\text{H}_2\text{C})_v \text{---} \text{C} \equiv \text{C} \text{---} \text{**}$, Z'' comprende una acida, u es 1 y v es 1. En este aspecto, el procedimiento puede comprender además poner en contacto el péptido funcionalizado con un catalizador de cobre para provocar que se forme

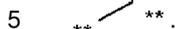
25 $\text{**} (\text{CH}_2)_w \text{---} \text{N} \text{---} \text{N} \text{---} \text{N} \text{---} \text{**}$.

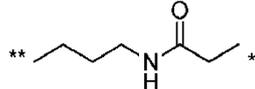
En otro modo de realización, Z comprende $\text{**} (\text{CH}_2)_y \text{---} \text{C}_6\text{H}_3 \text{---} \text{C}(=\text{O}) \text{---} \text{C}(=\text{O}) \text{---} \text{**}$, Y' es un enlace a Z', Z' comprende $\text{***} (\text{CH}_2)_y \text{---} \text{C}_6\text{H}_3 \text{---} \text{OH} \text{---} \text{NH}_2 \text{---} \text{**}$, r es 0, u es 1 e y es 1. En este modo de realización, el procedimiento puede comprender además poner en contacto el péptido funcionalizado con ferricianuro de potasio para provocar que se forme

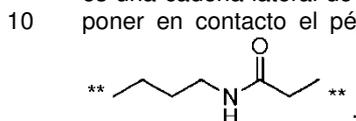
30 $\text{**} (\text{CH}_2)_y \text{---} \text{C}_6\text{H}_3 \text{---} \text{C}(=\text{O}) \text{---} \text{C}(=\text{O}) \text{---} \text{**}$.

Todavía en otro modo de realización, R³ y R⁸ se definen de modo que el péptido funcionalizado comprende una

secuencia de reconocimiento de butelasa 1, Y es un enlace a Z, Z comprende , Y' es un enlace a Z', Z' es una cadena lateral de asparagina o ácido aspártico, q es 0 y u es 1. En este modo de realización, el procedimiento puede comprender además poner en contacto el péptido funcionalizado con butelasa 1 para provocar que se forme



En otro aspecto, X e Y son enlaces a Z, Z comprende , X' es un enlace a Z'', Y' es un enlace a Z', Z' es una cadena lateral de glutamina y Z'' es una cadena lateral de lisina o Z' es una cadena lateral de lisina y Z'' es una cadena lateral de glutamina, q es 1 y u es 1. En este aspecto, el procedimiento puede comprender además poner en contacto el péptido funcionalizado con una transglutaminasa microbiana para provocar que se forme



En otros modos de realización ilustrativos de este procedimiento de ciclación *in situ*, 1) se puede realizar al menos uno de un análisis sin marcador y uno de afinidad del péptido de la secuencia de unión al núcleo extendido y madurado, 2) los péptidos funcionalizados y los péptidos cíclicos en la primera o la segunda micromatriz de péptidos pueden comprender el mismo número de aminoácidos, 3) los péptidos funcionalizados y los péptidos cíclicos en la primera o la segunda micromatriz de péptidos no incluyen el aminoácido cisteína o metionina, o motivos de histidina-prolina-glutamina o repeticiones de aminoácidos de 2 o más aminoácidos, y/o 4) la población de péptidos de secuencia de unión al núcleo extendidos y madurados puede incluir al menos uno de un oligopéptido de síntesis con titubeo N terminal y un oligopéptido de síntesis con titubeo C terminal.

En un modo de realización para los derivados de péptidos de interés descritos en la etapa a) anterior, el péptido de interés se puede modificar mediante una única sustitución aminoacídica, una doble sustitución aminoacídica, una delección de uno o más aminoácidos o una inserción de uno o más aminoácidos, con lo que se generan péptidos funcionalizados en la primera micromatriz de péptidos. En este modo de realización, los aminoácidos en los péptidos de interés pueden estar sustituidos con cualquiera de los otros 19 aminoácidos naturales o con cualquier aminoácido no natural adecuado. En otro modo de realización ilustrativo, los péptidos de interés o péptidos cíclicos descritos en el presente documento pueden comprender aminoácidos naturales o no naturales, o una combinación de los mismos.

En un modo de realización, se puede realizar otra etapa para incrementar el rendimiento de péptidos cíclicos en la micromatriz de péptidos. En este aspecto, la primera o segunda micromatriz de péptidos comprende uno o más péptidos lineales, junto con péptidos cíclicos debido a la ineficacia de la ciclación. Por tanto, en este aspecto, el procedimiento de ciclación puede comprender además la etapa de poner en contacto los uno o más péptidos lineales en la primera o segunda micromatriz de péptidos con una proteasa que pueda digerir los uno o más péptidos lineales. En este modo de realización, las etapas del procedimiento de maduración/extensión/ciclación descrito anteriormente se pueden repetir para incrementar el rendimiento de péptidos cíclicos en la micromatriz de péptidos. En un modo de realización ilustrativo, la proteasa puede ser una aminoproteasa, tal como aminopeptidasa m, cistinil aminopeptidasa, glutamil aminopeptidasa, leucil aminopeptidasa o piroglutamil peptidasa, o una mezcla de aminoproteasas. En otro aspecto ilustrativo, la proteasa puede ser una dipeptidasa, tal como dipeptidil peptidasa IV, una carboxipeptidasa, una tripeptidilpeptidasa, una metaloexopeptidasa, o una combinación de las mismas.

En un modo de realización del procedimiento de maduración/extensión/ciclación descrito anteriormente, se puede formar un enlace isopeptídico para ciclar péptidos en una micromatriz de péptidos. En un aspecto, los aminoácidos que se pueden unir pueden ser un residuo de glutamina y un residuo de lisina en el mismo péptido, y el enlace se puede formar usando una transglutaminasa.

En este modo de realización, la parte que contiene glutamina del péptido puede comprender un motivo de secuencia de GDYALQGPG (SEQ ID NO: 225). En el modo de realización donde el motivo de secuencia es GDYALQGPG (SEQ ID NO: 225), la parte que contiene glutamina del péptido puede comprender una secuencia seleccionada del grupo que consiste en CGDYALQGPG

(SEQ ID NO:226), WGGDYALQGGPG (SEQ ID NO:227), YGGDYALQGGPG (SEQ ID NO:228), DGGDYALQGGPG (SEQ ID NO:229), GDGDYALQGGPG (SEQ ID NO:230), NGGDYALQGGPG (SEQ ID NO:231), GCGDYALQGGPG (SEQ ID NO:232), EGGDYALQGGPG (SEQ ID NO:233), PGGDYALQGGPG (SEQ ID NO:234), TGGDYALQGGPG (SEQ ID NO:235), QGGDYALQGGPG (SEQ ID NO:236), IGGDYALQGGPG (SEQ ID NO:237), FGGDYALQGGPG (SEQ ID NO:238), HGGDYALQGGPG (SEQ ID NO:239), LGGDYALQGGPG (SEQ ID NO:240), VGGDYALQGGPG (SEQ ID NO:241), RGGDYALQGGPG (SEQ ID NO:242), GWGDYALQGGPG (SEQ ID NO:243), MGGDYALQGGPG (SEQ ID NO:244), SGGDYALQGGPG (SEQ ID NO:245), AGGDYALQGGPG (SEQ ID NO:246), GYGDYALQGGPG (SEQ ID NO:247), GEGDYALQGGPG (SEQ ID NO:248), GPGDYALQGGPG (SEQ ID NO:249), GHGDYALQGGPG (SEQ ID NO: 250) y NNGDYALQGGPG (SEQ ID NO: 251), o una combinación de las mismas. En otro modo de realización, la parte que contiene glutamina del péptido puede comprender la secuencia DYALQ (SEQ ID NO: 252).

5 En otro modo de realización, la parte que contiene glutamina del péptido puede comprender una secuencia seleccionada del grupo que consiste en GGGDYALQGGG (SEQ ID NO:253), WGGDYALQGGG (SEQ ID NO:254), GGGGDYALQGGGG (SEQ ID NO: 255) y GGGDYALQGGGG (SEQ ID NO: 256), o una combinación de las mismas. En otro modo de realización, la parte que contiene glutamina del péptido puede comprender la secuencia GGGDYALQGGG (SEQ ID NO: 253).

10 Aún en otro modo de realización, la parte que contiene glutamina del péptido puede comprender un motivo de secuencia de [YF][VA]LQG (SEQ ID NO: 257). En este modo de realización, la parte que contiene glutamina del péptido puede comprender una secuencia seleccionada del grupo que consiste en DYALQ (SEQ ID NO:252), DYVLQ (SEQ ID NO:258), NYALQ (SEQ ID NO:259), EYALQ (SEQ ID NO:260), PYALQ (SEQ ID NO:261), EYVLQ (SEQ ID NO:262), DFALQ (SEQ ID NO:263), FYALQ (SEQ ID NO:264), NYVLQ (SEQ ID NO:265), RYALQ (SEQ ID NO:266), YFALQ (SEQ ID NO:267), PYVLQ (SEQ ID NO:268), WYALQ (SEQ ID NO:269), SYALQ (SEQ ID NO:270), HYALQ (SEQ ID NO:271), EFALQ (SEQ ID NO: 272) y NFVLQ (SEQ ID NO: 273), o una combinación de las mismas.

20 Todavía en otro aspecto ilustrativo, la parte que contiene glutamina del péptido puede comprender una secuencia seleccionada del grupo que consiste en DYFLQ (SEQ ID NO:274), EYVAQ (SEQ ID NO:275), DYVAQ (SEQ ID NO:276), DFYLQ (SEQ ID NO: 277), EYFLQ (SEQ ID NO: 278), o una combinación de las mismas.

25 Aún en otro modo de realización, el péptido puede contener una lisina y la parte que contiene lisina del péptido puede comprender un motivo de secuencia de SK[LS]K (SEQ ID NO: 279) o [KR][ST]KL (SEQ ID NO: 280). En este modo de realización, la parte que contiene lisina del péptido puede comprender una secuencia seleccionada del grupo que consiste en ARSKL (SEQ ID NO:281), KSKLA (SEQ ID NO:282), TSKL (SEQ ID NO:283), KLSKL (SEQ ID NO:284), RSKLG (SEQ ID NO:285), RGSKL (SEQ ID NO:286), RSKSK (SEQ ID NO:287), SKSKL (SEQ ID NO:288), PKTKL (SEQ ID NO:289), RSKLA (SEQ ID NO:290), GRSKL (SEQ ID NO:291), SKLSK (SEQ ID NO:292), FTKSK (SEQ ID NO:293), RLKSK (SEQ ID NO:294), KLGAK (SEQ ID NO:295), QRSKL (SEQ ID NO:296), LSKLK (SEQ ID NO:297), NRTKL (SEQ ID NO: 298), QRTKL (SEQ ID NO: 299), GGGRSKLAGGG (SEQ ID NO: 300) y GGGARSKLGGGG (SEQ ID NO: 301), o una combinación de las mismas.

30 En otro modo de realización ilustrativo, el péptido puede contener una lisina y la parte que contiene lisina del péptido puede comprender una secuencia seleccionada del grupo que consiste en RGTKL (SEQ ID NO:302), FPKLK (SEQ ID NO:303), KLKYK (SEQ ID NO:304), RAKYK (SEQ ID NO:305), KTKYK (SEQ ID NO:306), y GYKLK (SEQ ID NO: 307), o una combinación de las mismas.

35 Todavía en otro modo de realización, el péptido puede comprender un péptido sustrato de glutamina transglutaminasa y un péptido sustrato de lisina transglutaminasa. Aún en otro modo de realización, el péptido sustrato de glutamina y/o lisina transglutaminasa puede comprender una secuencia de DYALQ (SEQ ID NO: 252) o puede tener un motivo de secuencia que comprende [FY][FYT]LQ (SEQ ID NO:308), [YF]VAQ (SEQ ID NO:309), K[YLS]K (SEQ ID NO:310), o TKL (SEQ ID NO: 311).

40 En otro modo de realización, se contemplan péptidos sustrato de transglutaminasa que tienen aproximadamente un 60 %, aproximadamente un 70 %, aproximadamente un 75 %, aproximadamente un 80 %, aproximadamente un 85 %, aproximadamente un 90 %, aproximadamente un 95 %, aproximadamente un 96 %, aproximadamente un 97 %, aproximadamente un 98 % o aproximadamente un 99 % de homología con cualquiera de SEQ ID NO: 4 a 85. La determinación del porcentaje de identidad o similitud entre secuencias se puede hacer, por ejemplo, usando el programa GAP (Genetics Computer Group, programa informático; disponible por medio de Accelrys en <http://www.accelrys.com>), y las alineaciones se pueden hacer usando, por ejemplo, el algoritmo ClustalW (programa informático VNTI, InforMax Inc.). Se puede realizar una búsqueda en una base de datos de secuencias usando la secuencia peptídica que se va a comparar. Los algoritmos para la búsqueda en la base de datos se basan típicamente en el programa informático BLAST (Altschul *et al.*, 1990).

En un modo de realización ilustrativo, la unión de un péptido sustrato de glutamina transglutaminasa y un péptido sustrato de lisina transglutaminasa para formar un enlace isopeptídico que da como resultado la ciclación del péptido se puede realizar usando una transglutaminasa. En otro modo de realización, se puede usar una transglutaminasa microbiana (por ejemplo, una transglutaminasa de *Streptovercillium sp.*) o una transglutaminasa de mamífero. En el modo de realización donde la enzima es una transglutaminasa de mamífero, la transglutaminasa de mamífero se puede seleccionar, por ejemplo, del grupo que consiste en transglutaminasa del factor XIII A humano, transglutaminasa del factor XIII B humano, una transglutaminasa del factor XIII, una transglutaminasa de queratinocitos, una transglutaminasa de tipo tisular, una transglutaminasa epidérmica, una transglutaminasa de próstata, una transglutaminasa neuronal, una transglutaminasa 5 humana y una transglutaminasa 7 humana.

En diversos aspectos ilustrativos, los péptidos cíclicos o péptidos de interés que constituyen las micromatrices de péptidos descritas en el presente documento pueden ser péptidos de aproximadamente 5 a aproximadamente 19 aminoácidos, aproximadamente 5 a aproximadamente 18 aminoácidos, aproximadamente 5 a aproximadamente 17 aminoácidos, aproximadamente 5 a aproximadamente 16 aminoácidos, aproximadamente 5 a aproximadamente 15 aminoácidos, aproximadamente 5 a aproximadamente 14 aminoácidos, aproximadamente 5 a aproximadamente 13 aminoácidos, aproximadamente 5 a aproximadamente 12 aminoácidos, aproximadamente 5 a aproximadamente 11 aminoácidos, aproximadamente 5 a aproximadamente 10 aminoácidos, aproximadamente 5 a aproximadamente 9, aproximadamente 5 a aproximadamente 8, aproximadamente 5 a aproximadamente 7 o aproximadamente 5 a aproximadamente 6 aminoácidos. En otros aspectos ilustrativos, los péptidos cíclicos o péptidos de interés descritos en el presente documento pueden ser péptidos de 5 a 19 aminoácidos, 5 a 18 aminoácidos, 5 a 17 aminoácidos, 5 a 16 aminoácidos, 5 a 15 aminoácidos, 5 a 14 aminoácidos, 5 a 13 aminoácidos, 5 a 12 aminoácidos, 5 a 11 aminoácidos, 5 a 10 aminoácidos, 5 a 9 aminoácidos, 5 a 8 aminoácidos, 5 a 7 aminoácidos o 5 a 6 aminoácidos. Aún en otro modo de realización ilustrativo, los péptidos cíclicos o péptidos de interés se pueden seleccionar del grupo que consiste en pentámeros, hexámeros, heptámeros, octómeros, nonámeros, decámeros, undecámeros, dodecámeros, tridecámeros, tetradecámeros, pentadecámeros, hexadecámeros, heptadecámeros, octodecámeros o nonadecámeros, o una combinación de los mismos.

En diversos modos de realización, las micromatrices de péptidos descritas en el presente documento pueden tener al menos $1,6 \times 10^5$ péptidos, al menos $2,0 \times 10^5$ péptidos, al menos $3,0 \times 10^5$ péptidos, al menos $4,0 \times 10^5$ péptidos, al menos $5,0 \times 10^5$ péptidos, al menos $6,0 \times 10^5$ péptidos, al menos $7,0 \times 10^5$ péptidos, al menos $8,0 \times 10^5$ péptidos, al menos $9,0 \times 10^5$ péptidos, al menos $1,0 \times 10^6$ péptidos, al menos $1,2 \times 10^6$ péptidos, al menos $1,4 \times 10^6$ péptidos, al menos $1,6 \times 10^6$ péptidos, al menos $1,8 \times 10^6$ péptidos, al menos $1,0 \times 10^7$ péptidos o al menos $1,0 \times 10^8$ péptidos unidos al soporte de matriz de la micromatriz de péptidos. En otros modos de realización, las micromatrices de péptidos descritas en el presente documento pueden tener aproximadamente $1,6 \times 10^5$ péptidos, aproximadamente $2,0 \times 10^5$ péptidos, aproximadamente $3,0 \times 10^5$ péptidos, aproximadamente $4,0 \times 10^5$ péptidos, aproximadamente $5,0 \times 10^5$ péptidos, aproximadamente $6,0 \times 10^5$ péptidos, aproximadamente $7,0 \times 10^5$ péptidos, aproximadamente $8,0 \times 10^5$ péptidos, aproximadamente $9,0 \times 10^5$ péptidos, aproximadamente $1,0 \times 10^6$ péptidos, aproximadamente $1,2 \times 10^6$ péptidos, aproximadamente $1,4 \times 10^6$ péptidos, aproximadamente $1,6 \times 10^6$ péptidos, aproximadamente $1,8 \times 10^6$ péptidos, aproximadamente $1,0 \times 10^7$ péptidos o aproximadamente $1,0 \times 10^8$ péptidos unidos al soporte de matriz de la micromatriz de péptidos. Como se describe en el presente documento, una micromatriz de péptidos que comprende un número particular de péptidos puede significar una única micromatriz de péptidos en un único soporte de matriz, o los péptidos se pueden dividir y unir a más de un soporte de matriz para obtener el número de péptidos descritos en el presente documento.

En un modo de realización, los péptidos cíclicos o péptidos de interés para su uso en las micromatrices de péptidos descritas en el presente documento pueden ser sintéticos. En un aspecto, los péptidos cíclicos o péptidos de interés en las micromatrices de péptidos descritas en el presente documento se pueden sintetizar como se describe en el ejemplo 1. También se puede usar cualquier protocolo apropiado para sintetizar péptidos para su uso en micromatrices de péptidos que son bien conocidos por los expertos en la técnica.

En diversos modos de realización, los péptidos cíclicos o péptidos de interés unidos a las micromatrices de péptidos pueden carecer de cisteínas, pueden carecer de repeticiones de aminoácidos, pueden ser excepcionales (es decir, cada péptido es diferente de los otros péptidos en la matriz) y/o pueden representar péptidos cíclicos, péptidos de interés o péptidos cíclicos de interés con una longitud seleccionada del grupo que consiste en pentámeros, hexámeros, heptámeros, octómeros, nonámeros, decámeros, undecámeros y dodecámeros, o una combinación de los mismos.

Como se describe en el presente documento, una "micromatriz de péptidos" significa una colección de péptidos creada intencionalmente que se puede preparar sintéticamente. En un modo de realización, los péptidos en la micromatriz de péptidos pueden ser diferentes entre sí. Los procedimientos para sintetizar micromatrices de péptidos, incluyendo micromatrices de péptidos preparadas por síntesis de matrices de péptidos dirigida por luz sin máscara, son conocidos en la técnica y se describen procedimientos ejemplares en las publicaciones de solicitud de patente de EE. UU. n.ºs US 2004/0023367 y US 2009/0176664 y las patentes de EE. UU. n.ºs 6.375.903 y 5.143.854. Procedimientos adicionales se describen a continuación en el presente documento en el ejemplo 1.

En un modo de realización, los péptidos en la micromatriz de péptidos están unidos a un soporte de matriz. Un soporte de matriz se refiere a un material o materiales que tienen una superficie o superficies rígidas o semirrígidas. En algunos

aspectos, al menos una superficie del soporte de matriz será sustancialmente plana, aunque en algunos aspectos las regiones pueden estar físicamente separadas para diferentes péptidos con, por ejemplo, pocillos, regiones elevadas, pasadores, zanjas grabadas o similares. Aún en otro modo de realización, la micromatriz de péptidos se prepara mediante síntesis de matrices de péptidos dirigida por luz sin máscara.

5 En diversos modos de realización, los materiales de soporte de matrices pueden incluir, por ejemplo, silicio, polímeros biocompatibles tales como, por ejemplo, poli(metacrilato de metilo) (PMMA) y polidimetilsiloxano (PDMS), vidrio, plástico, SiO₂, cuarzo, nitruro de silicio, vidrio funcionalizado, oro, platino, compuesto de carbono o aluminio. Las superficies funcionalizadas incluyen, por ejemplo, vidrio funcionalizado con amina, vidrio funcionalizado con carboxilo y vidrio funcionalizado con hidroxilo. Adicionalmente, un soporte de matriz puede estar opcionalmente recubierto con una o más capas para proporcionar una superficie para la unión o funcionalización molecular, una reactividad incrementada o disminuida, detección de unión y similares. El material de soporte de matriz apropiado se puede seleccionar por un experto en la técnica.

15 En un modo de realización, la micromatriz de péptidos se puede preparar usando síntesis de matrices de péptidos dirigida por luz sin máscara. La síntesis de matrices de péptidos dirigida por luz sin máscara puede utilizar microespejos y óptica de proyección que enfocan una imagen de los microespejos en el soporte de matriz donde se llevan a cabo las reacciones. En un modo de realización, bajo el control de un ordenador, cada uno de los microespejos se cambia selectivamente entre una primera posición en la que proyecta la luz sobre el sustrato a través del sistema
20 óptico y una segunda posición en la que desvía la luz del sustrato. En este modo de realización, los espejos controlables individualmente pueden dirigir haces de luz para producir imágenes o patrones de luz. En un modo de realización, se pueden modular reacciones en diferentes regiones en el soporte de matriz al proporcionar irradiación de diferentes potencias usando un dispositivo de microespejo. Dichos dispositivos están disponibles comercialmente. En un aspecto, la irradiación de luz controlada permite que el control de las reacciones proceda a una velocidad deseable.

En un modo de realización, los péptidos cíclicos o péptidos de interés se unen covalentemente al soporte de matriz. En otro modo de realización, los péptidos cíclicos, péptidos de interés o péptidos cíclicos de interés se unen covalentemente al soporte de matriz. Aún en otro modo de realización, los péptidos se unen al soporte de matriz mediante un conector, tal como un conector escindible. En un modo de realización ilustrativo, el conector tiene una longitud de aproximadamente 4 a aproximadamente 40 átomos. Son conectores ejemplares aril acetileno, oligómeros de etilenglicol que contienen 2-10 unidades monoméricas (PEG), diaminas, diácidos, aminoácidos y similares, y combinaciones de los mismos.

35 Aún en otros modos de realización de los modos de realización descritos en el presente documento, el andamio de anticuerpo de vaca en cualquier modo de realización descrito en el presente documento se puede reemplazar con cualquier polipéptido de andamio de anticuerpo, incluyendo un polipéptido de andamio de anticuerpo de un animal no bovino. Como se usa en el presente documento, "polipéptido de andamio de anticuerpo" significa un polipéptido que comprende secuencias de la región CDR H3 de un anticuerpo de un animal no bovino. Los modos de realización que usan un "polipéptido de andamio de anticuerpo" incluyen los modos de realización descritos a continuación en las cláusulas 109 a 193. Los ejemplos de animales no bovinos incluyen, pero no se limitan a, un tiburón (por ejemplo, nuevos receptores de antígeno de inmunoglobulina (IgNAR) de suero de tiburón), un camello (por ejemplo, regiones de VnHs de camélido) y un ser humano (por ejemplo, anticuerpos contra el virus de la gripe y contra el VIH humanos con largas regiones CDR H3).

45 109. Un procedimiento para seleccionar un péptido de interés, comprendiendo el procedimiento las etapas de

a) preparar una colección de péptidos usando un polipéptido de andamio de anticuerpo presentado en ARNm a partir de una región CDR H3 de anticuerpo que comprende el péptido de interés que se va a identificar;

50 b) seleccionar el péptido de interés de la colección de péptidos poniendo en contacto una molécula diana con el péptido de interés en el que la molécula diana se inmoviliza sobre un soporte sólido o está en solución; e

55 c) identificar la secuencia de aminoácidos del péptido de interés.

110. El procedimiento de la cláusula 109, en el que la etapa de preparación de la colección de péptidos comprende la etapa de transcripción *in vitro* de una colección de ADN para formar una colección de ARNm.

60 111. El procedimiento de la cláusula 109 o 110, que comprende además la etapa de digerir la colección de ADN con DNasa.

112. El procedimiento de la cláusula 109 o 110, que comprende además la etapa de conjugar el ARNm de la colección de ARNm con un conector oligonucleotídico de puromicina.

65 113. El procedimiento de una cualquiera de las cláusulas 110 a 112, que comprende además la etapa de traducir *in vitro* el ARNm de la colección de ARNm para formar conjugados de fusión de polipéptido de andamio de anticuerpo-

ARNm que comprenden el polipéptido de andamio de anticuerpo en el que el polipéptido de andamio de anticuerpo comprende una marca de purificación.

5 114. El procedimiento de la cláusula 113, que comprende además la etapa de purificar los conjugados de fusión de polipéptido de andamio de anticuerpo-ARNm usando la marca de purificación.

10 115. El procedimiento de la cláusula 113 o 114, que comprende además la etapa de retrotranscribir el ARNm de la colección de ARNm para formar híbridos de ARNm-ADN de los conjugados de fusión de polipéptido de andamio de anticuerpo-ARNm.

116. El procedimiento de la cláusula 115, en el que la etapa de selección comprende poner en contacto los híbridos de ARNm-ADN de los conjugados de fusión de polipéptido de andamio de anticuerpo-ARNm con la molécula diana.

15 117. El procedimiento de la cláusula 116, que comprende además la etapa de regenerar el ADN de los híbridos de ARNm-ADN de los conjugados de fusión de polipéptido de andamio de anticuerpo-ARNm.

118. El procedimiento de una cualquiera de las cláusulas 110 a 117, en el que la colección de ADN es una colección de ADNc.

20 119. El procedimiento de una cualquiera de las cláusulas 110 a 118, en el que la transcripción *in vitro* se realiza usando ARN polimerasa T7.

25 120. El procedimiento de una cualquiera de las cláusulas 112 a 119, en el que el conector oligonucleotídico de puromicina se une al ARNm en el extremo 3' del ARNm.

121. El procedimiento de una cualquiera de las cláusulas 113 a 120, en el que la marca de purificación es una marca FLAG.

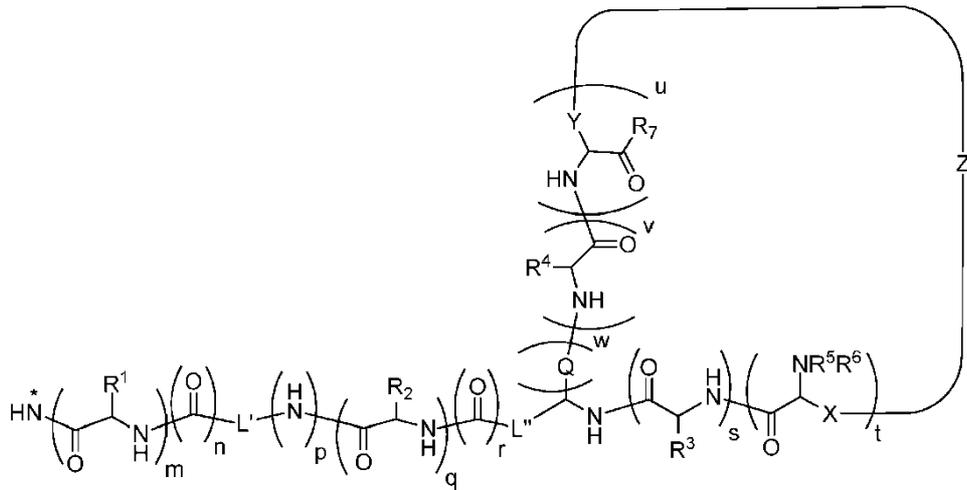
30 122. El procedimiento de una cualquiera de las cláusulas 110 a 121, en el que los miembros de la colección de ADN comprenden una secuencia promotora de ARN polimerasa, una secuencia potenciadora y una secuencia de marca de purificación.

35 123. El procedimiento de una cualquiera de las cláusulas 113 a 122, en el que la marca de purificación es una marca C terminal.

124. El procedimiento de una cualquiera de las cláusulas 109 a 123, que comprende además las etapas de:

40 a) sintetizar el péptido de interés, o derivados del mismo, en una primera micromatriz de péptidos, en el que los derivados del péptido de interés incluyen al menos una alteración en la secuencia del péptido de interés seleccionada de una única sustitución aminoacídica, una doble sustitución aminoacídica, una delección de uno o más aminoácidos, y una inserción de uno o más aminoácidos, con lo que se generan péptidos funcionalizados en la primera micromatriz de péptidos;

45 b) formar a partir de los péptidos funcionalizados, en los que los péptidos funcionalizados están en forma lineal, péptidos cíclicos de fórmula I

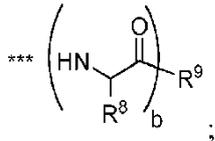


I

en la que cada R¹, R², R³ y R⁴ es independientemente una cadena lateral de aminoácido natural o una cadena lateral de aminoácido no natural;

5 cada R⁵ y R⁶ se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, un grupo de caperuza N terminal y un grupo protector N terminal;

R⁷ se selecciona del grupo que consiste en -OH, un grupo de caperuza C terminal, un grupo protector C terminal, y



cada R⁸ es independientemente una cadena lateral de aminoácido natural o una cadena lateral de aminoácido no natural;

15 R⁹ se selecciona del grupo que consiste en -OH, un grupo de caperuza C terminal y un grupo protector C terminal;

Q se selecciona del grupo que consiste en un enlace, un carbonilo, una cadena lateral de aminoácido natural y una cadena lateral de aminoácido no natural;

20 cada X e Y se selecciona independientemente del grupo que consiste en un enlace, una cadena lateral de aminoácido natural unida covalentemente a Z y una cadena lateral de aminoácido no natural unida covalentemente a Z;

Z es un grupo que comprende un resto seleccionado del grupo que consiste en un enlace amida, un enlace disulfuro, un enlace isopeptídico, un 1,2,3-triazol y una 1,2-quinona opcionalmente sustituida;

25 cada L' y L'' es independientemente un grupo de unión bivalente opcional o un enlace;

b es un número entero de 0 a 50;

30 m es un número entero de 0 a 6;

n es 0 o 1;

p es 0 o 1;

35 q es un número entero de 0 a 6;

r es 0 o 1;

40 s es un número entero de 0 a 100;

t es 0 o 1;

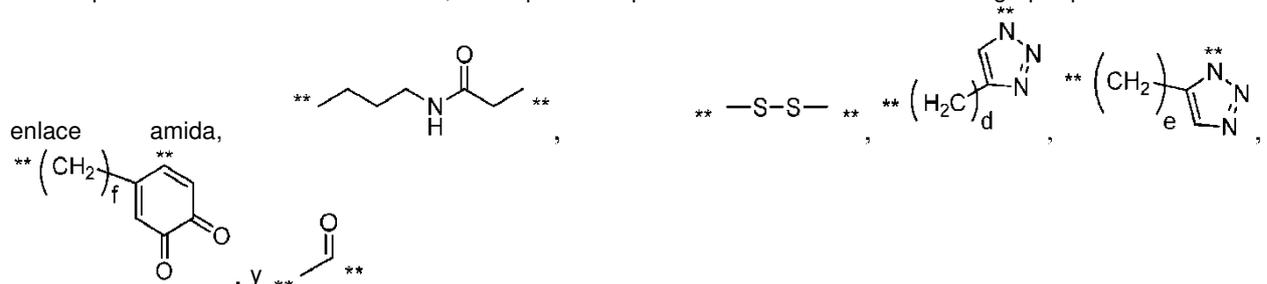
d) identificar uno o más de los péptidos cíclicos que demuestran una fuerte unión a la molécula diana, con lo que se determina una secuencia de unión al núcleo madurada;

5 e) realizar al menos una de la extensión N terminal y C terminal de la secuencia de unión al núcleo madurada determinada en la etapa d para proporcionar una secuencia de unión al núcleo extendida y madurada en una segunda micromatriz de péptidos;

10 f) exponer la molécula diana a la segunda micromatriz de péptidos que comprende una población de péptidos de la secuencia de unión al núcleo extendida y madurada generados en la etapa e en la que la población de péptidos de la secuencia de unión al núcleo extendida y madurada comprende péptidos cíclicos formados como en la etapa b; e

g) identificar un péptido cíclico extendido y madurado con una fuerte unión a la molécula diana.

15 125. El procedimiento de la cláusula 124, en el que Z comprende un resto seleccionado del grupo que consiste en un



20 en el que d es un número entero de 0 a 6, e es un número entero de 0 a 6 y f es un número entero de 0 a 6, y ** es un punto de conexión con el resto del péptido cíclico.

126. El procedimiento de la cláusula 124 o 125, en el que Z comprende un enlace peptídico, Z' comprende un grupo protector N terminal, t es 0, u es 0 e y es 0.

25 127. El procedimiento de la cláusula 126, que comprende además eliminar Z' del resto del péptido funcionalizado para provocar que se forme el enlace peptídico.

30 128. El procedimiento de la cláusula 124 o 125, en el que Q y X son enlaces a Z, Z comprende $** -S-S- **$, X' es un enlace a Z'', Q' es un enlace a Z', Z' y Z'' comprenden cadenas laterales de cisteína, t es 1, u es 0, v es 0, w es 1 e y es 0.

129. El procedimiento de la cláusula 128, que comprende además someter el péptido funcionalizado a condiciones oxidativas para provocar que se forme $** -S-S- **$.

35 130. El procedimiento de la cláusula 124 o 125, en el que X e Y son enlaces a Z, Z comprende $** -S-S- **$, X' es un enlace a Z'', Y' es un enlace a Z', Z' y Z'' comprenden cadenas laterales de cisteína, t es 1, u es 1 e y es 1.

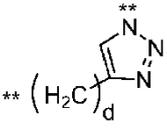
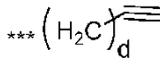
40 131. El procedimiento de la cláusula 130, que comprende además someter el péptido funcionalizado a condiciones oxidativas para provocar que se forme $** -S-S- **$.

132. El procedimiento de la cláusula 124 o 125, en el que Q es un enlace a Z, Z comprende , Q' es un

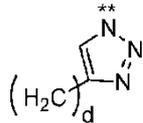
enlace a Z', Z' comprende $*** (H_2C)_d$, Z'' comprende una acida, d es 1, u es 0, v es 0, w es 1 e y es 0.

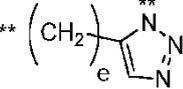
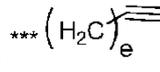
133. El procedimiento de la cláusula 132, que comprende además poner en contacto el péptido funcionalizado con un

45 catalizador de cobre para provocar que se forme .

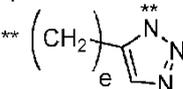
134. El procedimiento de la cláusula 124 o 125, en el que Y es un enlace a Z, Z comprende , Y' es un enlace a Z', Z' comprende , Z'' comprende una acida, d es 1, u es 1 e y es 1.

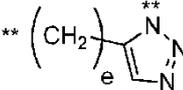
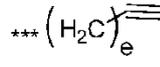
135. El procedimiento de la cláusula 134, que comprende además poner en contacto el péptido funcionalizado con un

5 catalizador de cobre para provocar que se forme .

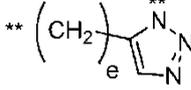
136. El procedimiento de la cláusula 124 o 125, en el que Q es un enlace a Z, Z comprende , Q' es un enlace a Z', Z' comprende , Z'' comprende una acida, e es 1, u es 0, v es 0, w es 1 e y es 0.

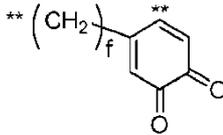
10 137. El procedimiento de la cláusula 136, que comprende además poner en contacto el péptido funcionalizado con un

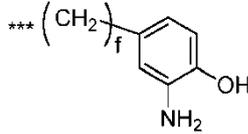
catalizador de cobre para provocar que se forme .

138. El procedimiento de la cláusula 124 o 125, en el que Y es un enlace a Z, Z comprende , Y' es un enlace a Z', Z' comprende , Z'' comprende una acida, e es 1, u es 1 e y es 1.

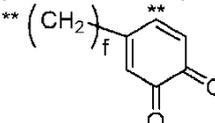
15 139. El procedimiento de la cláusula 138, que comprende además poner en contacto el péptido funcionalizado con un

catalizador de cobre para provocar que se forme .

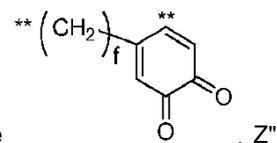
140. El procedimiento de la cláusula 124 o 125, en el que Q es un enlace a Z, Z comprende , Q'

20 es un enlace a Z', Z' comprende , Z'' comprende una amina, f es 1, u es 0, v es 0, w es 1 e y es 0.

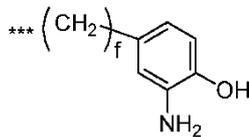
141. El procedimiento de la cláusula 140, que comprende además poner en contacto el péptido funcionalizado con

25 ferricianuro de potasio para provocar que se forme .

142. El procedimiento de la cláusula 124 o 125, en el que Y es un enlace a Z, Z comprende

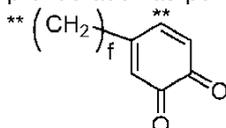


comprende una amina, Y' es un enlace a Z', Z' comprende



, f es 1, u es 1 e y es 1.

143. El procedimiento de la cláusula 142, que comprende además poner en contacto el péptido funcionalizado con



5 ferricianuro de potasio para provocar que se forme

144. El procedimiento de la cláusula 124 o 125, en el que R⁴, R¹⁰ y R¹¹ se definen de modo que el péptido funcionalizado comprende una secuencia de reconocimiento de butelasa 1, Y es un enlace a Z, Z comprende



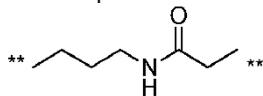
, Y' es un enlace a Z', Z' es una cadena lateral de asparagina o ácido aspártico, u es 1 e y es 1.

10

145. El procedimiento de la cláusula 144, que comprende además poner en contacto el péptido funcionalizado con

butelasa 1 para provocar que se forme .

146. El procedimiento de la cláusula 124 o 125, en el que Q y X son enlaces a Z, Z comprende



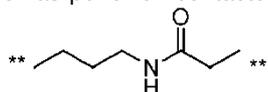
15

, Q' es un enlace a Z', X' es un enlace a Z'', Z' es una cadena lateral de glutamina y Z'' es una cadena lateral de lisina o Z' es una cadena lateral de lisina y Z'' es una cadena lateral de glutamina, t es 1, u es 0, v es 0, w es 1 e y es 0.

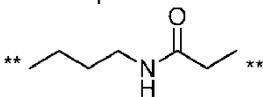
147. El procedimiento de la cláusula 146, que comprende además poner en contacto el péptido funcionalizado con

20

una transglutaminasa microbiana para provocar que se forme



148. El procedimiento de la cláusula 124 o 125, en el que X e Y son enlaces a Z, Z comprende

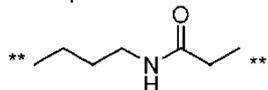


25

, X' es un enlace a Z'', Y' es un enlace a Z', Z' es una cadena lateral de glutamina y Z'' es una cadena lateral de lisina o Z' es una cadena lateral de lisina y Z'' es una cadena lateral de glutamina, t es 1, u es 1 e y es 1.

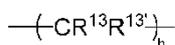
149. El procedimiento de la cláusula 148, que comprende además poner en contacto el péptido funcionalizado con

una transglutaminasa microbiana para provocar que se forme



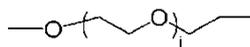
30

150. El procedimiento de una cualquiera de las cláusulas 124 a 149, en el que cada L' y L'' es independientemente de la fórmula V

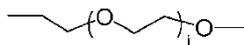


V

en la que cada R^{13} y $R^{13'}$ se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, D, halógeno, alquilo C_1-C_6 , alqueniilo C_2-C_6 , alquinilo C_2-C_6 , cicloalquilo C_3-C_6 , heterocicloalquilo de 3 a 7 miembros, arilo C_6-C_{10} , heteroarilo de 5 a 7 miembros, $-OR^{14}$, $-OC(O)R^{14}$, $-NR^{14}R^{14'}$, $-NR^{14}C(O)R^{15}$, $-C(O)R^{14}$, $-C(O)OR^{14}$ y $-C(O)NR^{14}R^{14'}$, en el que cada átomo de hidrógeno en alquilo C_1-C_6 , alqueniilo C_2-C_6 , alquinilo C_2-C_6 , cicloalquilo C_3-C_6 , heterocicloalquilo de 3 a 7 miembros, arilo C_6-C_{10} y heteroarilo de 5 a 7 miembros está independientemente sustituido opcionalmente con halógeno, alquilo C_1-C_6 , alqueniilo C_2-C_6 , alquinilo C_2-C_6 , $-OR^{16}$; cada R^{14} , $R^{14'}$, R^{15} y R^{16} se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, D, hidroxilo, alquilo C_1-C_7 , alqueniilo C_2-C_7 , alquinilo C_2-C_7 , cicloalquilo C_3-C_6 , heterocicloalquilo de 3 a 7 miembros, arilo C_6-C_{10} y heteroarilo de 5 a 7 miembros; y h es un número entero de 1 a 10; o la fórmula VI o VII



VI



VII

en la que j es un número entero de 0 a 30.

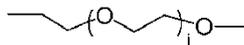
151. El procedimiento de la cláusula 150, en el que cada R^{13} y $R^{13'}$ es hidrógeno.

152. El procedimiento de la cláusula 150 o 151, en el que L' está presente, h es 5, m es 0, n es 1 y p es 1.

153. El procedimiento de la cláusula 150, en el que al menos uno de L' y L'' es de la fórmula VI o VII



VI



VII

en la que j es 7.

154. El procedimiento de una cualquiera de las cláusulas 124 a 153, en el que el grupo protector N terminal es un grupo fotoprotector.

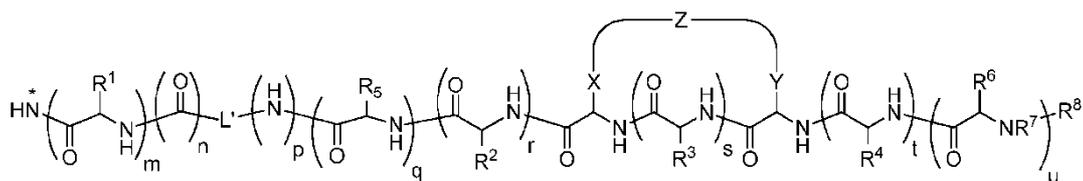
155. El procedimiento de una cualquiera de las cláusulas 124 a 154, en el que el grupo protector N terminal es 2-(2-nitrofenil)propiloxicarbonilo.

156. El procedimiento de una cualquiera de las cláusulas 109 a 123 que comprende además la etapa de sintetizar el polipéptido de andamio de anticuerpo en una o más micromatrices de péptidos en las que el polipéptido de andamio de anticuerpo comprende el péptido de interés.

157. El procedimiento de la cláusula 156, que comprende las etapas de:

a) sintetizar el polipéptido de andamio de anticuerpo que comprende el péptido de interés, o derivados del péptido de interés, en una primera micromatriz de péptidos, en el que los derivados del péptido de interés incluyen al menos una alteración en la secuencia del péptido de interés seleccionada de una única sustitución aminoacídica, una doble sustitución aminoacídica, una delección de uno o más aminoácidos, y una inserción de uno o más aminoácidos, con lo que se generan péptidos funcionalizados en la primera micromatriz de péptidos;

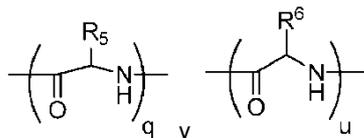
b) formar a partir de los péptidos funcionalizados, en los que los péptidos funcionalizados están en forma lineal, péptidos cíclicos de fórmula VIII



VIII

en la que cada R¹, R², R³ y R⁴ es independientemente una cadena lateral de aminoácido natural o una cadena lateral de aminoácido no natural;

5 cada R⁵ y R⁶ es independientemente una cadena lateral de aminoácido natural o una cadena lateral de aminoácido



no natural seleccionada de modo que pueden formar una lámina beta;

10 cada R⁷ se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, un grupo de caperuza N terminal y un grupo protector N terminal;

R⁸ se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, un grupo de caperuza N terminal y un grupo protector;

15 cada X e Y se selecciona independientemente del grupo que consiste en un enlace, una cadena lateral de aminoácido natural unida covalentemente a Z y una cadena lateral de aminoácido no natural unida covalentemente a Z;

Z es un grupo que comprende un resto seleccionado del grupo que consiste en un enlace amida, un enlace disulfuro, un enlace isopeptídico, un 1,2,3-triazol y una 1,2-quinona opcionalmente sustituida;

20 L' es un grupo de unión bivalente opcional o un enlace;

m es un número entero de 0 a 6;

25 n es 0 o 1;

p es 0 o 1;

q es un número entero de 0 a 50;

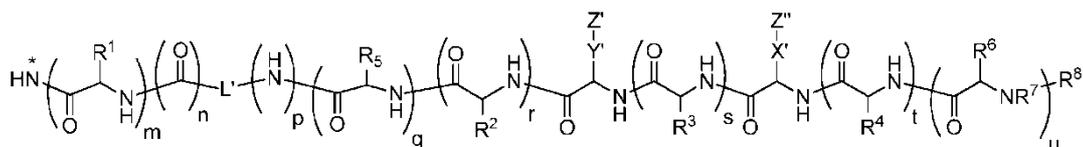
30 r es un número entero de 0 a 50;

s es un número entero de 0 a 50;

35 t es un número entero de 0 a 50;

u es un número entero de 0 a 50; y * es un punto de conexión que conecta el péptido cíclico a un soporte de matriz que tiene una superficie reactiva;

40 comprendiendo el procedimiento la etapa de hacer reaccionar un péptido funcionalizado de fórmula IX en condiciones que hacen que se forme Z



IX

en la que R¹, R², R³, R⁴, R⁵, R⁶, R⁷ y R⁸, m, n, p, q, r, s, t, u, L' y * son como se define para la fórmula VIII;

45

X' se selecciona del grupo que consiste en un enlace, una cadena lateral de aminoácido natural unida covalentemente a Z" y una cadena lateral de aminoácido no natural unida covalentemente a Z";

5 Y' se selecciona del grupo que consiste en un enlace, una cadena lateral de aminoácido natural unida covalentemente a Z' y una cadena lateral de aminoácido no natural unida covalentemente a Z"; y

10 cada Z' y Z" se selecciona independientemente del grupo que consiste en un enlace, -OH, hidrógeno, un tiol, una amina, un ácido carboxílico, una amida, un alquino, una acida, un aminofenol opcionalmente sustituido, una cadena lateral de aminoácido natural, una cadena lateral de aminoácido no natural, un grupo protector N terminal y un grupo protector C terminal, siempre que Z' y Z" sean grupos complementarios que se combinen para formar Z;

en el que los péptidos funcionalizados y los péptidos cíclicos se inmovilizan en la superficie reactiva;

15 c) exponer los péptidos cíclicos a la molécula diana, con lo que la molécula diana se une a al menos un péptido cíclico;

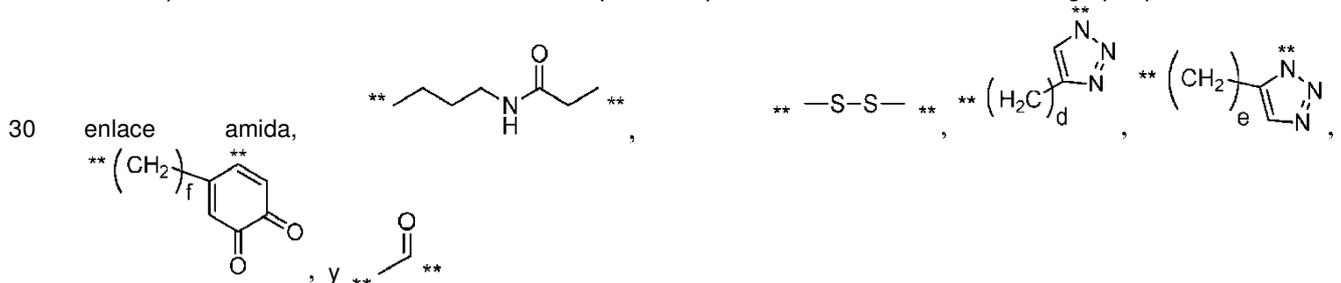
d) identificar uno o más de los péptidos cíclicos que demuestran una fuerte unión a la molécula diana, con lo que se determina una secuencia de unión al núcleo madurada;

20 e) realizar al menos una de la extensión N terminal y C terminal de la secuencia de unión al núcleo madurada determinada en la etapa d para proporcionar una secuencia de unión al núcleo extendida y madurada en una segunda micromatriz de péptidos;

25 f) exponer la molécula diana a la segunda micromatriz de péptidos que comprende una población de péptidos de la secuencia de unión al núcleo extendida y madurada generados en la etapa e en la que la población de péptidos de la secuencia de unión al núcleo extendida y madurada comprende péptidos cíclicos formados como en la etapa b; e

g) identificar un péptido cíclico extendido y madurado con una fuerte unión a la molécula diana.

158. El procedimiento de la cláusula 157, en el que Z comprende un resto seleccionado del grupo que consiste en un



35 en el que d es un número entero de 0 a 6, e es un número entero de 0 a 6 y f es un número entero de 0 a 6, y ** es un punto de conexión con el resto del péptido cíclico.

159. El procedimiento de la cláusula 157 o 158, en el que X e Y son enlaces a Z, Z comprende ** -S-S- **, X' es un enlace a Z", Y' es un enlace a Z', y Z' y Z" comprenden cadenas laterales de cisteína.

40 160. El procedimiento de la cláusula 159, que comprende además someter el péptido funcionalizado a condiciones oxidativas para provocar que se forme ** -S-S- **.

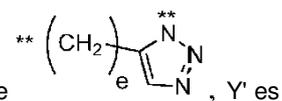
161. El procedimiento de la cláusula 157 o 158, en el que Y es un enlace a Z, Z comprende , Y' es un

enlace a Z', Z' comprende , Z" comprende una acida y d es 1.

45 162. El procedimiento de la cláusula 161, que comprende además poner en contacto el péptido funcionalizado con un

catalizador de cobre para provocar que se forme

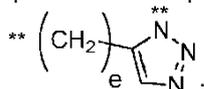
163. El procedimiento de la cláusula 157 o 158, en el que Y es un enlace a Z, Z comprende



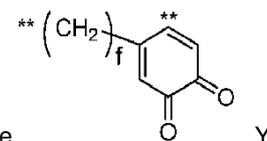
un enlace a Z', Z' comprende $^{***}(\text{H}_2\text{C})_e$, Z'' comprende una acida y e es 1.

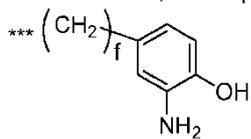
164. El procedimiento de la cláusula 163, que comprende además poner en contacto el péptido funcionalizado con un

5 catalizador de cobre para provocar que se forme



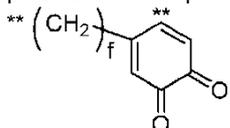
165. El procedimiento de la cláusula 157 o 158, en el que Y es un enlace a Z, Z comprende



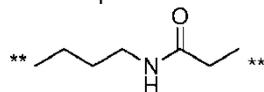
es un enlace a Z', Z' comprende $^{***}(\text{CH}_2)_f$ , Z'' comprende una amina y f es 1.

10 166. El procedimiento de la cláusula 165, que comprende además poner en contacto el péptido funcionalizado con

ferricianuro de potasio para provocar que se forme



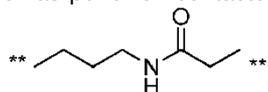
167. El procedimiento de la cláusula 157 o 158, en el que X e Y son enlaces a Z, Z comprende



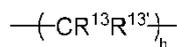
15 una cadena lateral de lisina o Z' es una cadena lateral de lisina y Z'' es una cadena lateral de glutamina.

168. El procedimiento de la cláusula 167, que comprende además poner en contacto el péptido funcionalizado con

una transglutaminasa microbiana para provocar que se forme



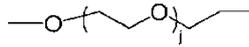
20 169. El procedimiento de una cualquiera de las cláusulas 157 a 158, en el que L' es de la fórmula (X)



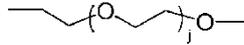
(X)

25 en la que cada R¹³ y R^{13'} se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, D, halógeno, alquilo C₁-C₆, alqueniilo C₂-C₆, alquinilo C₂-C₆, cicloalquilo C₃-C₆, heterocicloalquilo de 3 a 7 miembros, arilo C₆-C₁₀, heteroarilo de 5 a 7 miembros, -OR¹⁴, -OC(O)R¹⁴, -NR¹⁴R^{14'}, -NR¹⁴C(O)R¹⁵, -C(O)R¹⁴, -C(O)OR¹⁴ y -C(O)NR¹⁴R^{14'}, en el que cada átomo de hidrógeno en alquilo C₁-C₆, alqueniilo C₂-C₆, alquinilo C₂-C₆, cicloalquilo C₃-C₆, heterocicloalquilo de 3 a 7 miembros, arilo C₆-C₁₀ y heteroarilo de 5 a 7 miembros está independientemente sustituido opcionalmente con halógeno, alquilo C₁-C₆, alqueniilo C₂-C₆, alquinilo C₂-C₆, -OR¹⁶; cada R¹⁴, R^{14'}, R¹⁵ y R¹⁶ se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, D, hidroxilo, alquilo C₁-C₇, alqueniilo C₂-C₇, alquinilo C₂-C₇, cicloalquilo C₃-C₆, heterocicloalquilo de 3 a 7 miembros, arilo C₆-C₁₀ y heteroarilo de 5 a 7 miembros; y h es un número entero de 1 a 10; o la fórmula XI o XII

30



XI



XII

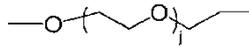
5 en la que j es un número entero de 0 a 30.

170. El procedimiento de la cláusula 169, en el que cada R¹³ y R^{13'} es hidrógeno.

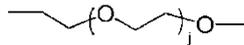
171. El procedimiento de la cláusula 169 o 170, en el que L' está presente, h es 5, m es 0, n es 1 y p es 1.

10

172. El procedimiento de la cláusula 169, en el que L' es de la fórmula XI o XII



XI



XII

15

en la que j es 7.

173. El procedimiento de una cualquiera de las cláusulas 157 a 172, en el que el grupo protector N terminal es un grupo fotoprotector.

20

174. El procedimiento de una cualquiera de las cláusulas 157 a 173, en el que el grupo protector N terminal es 2-(2-nitrofenil)propiloxicarbonilo.

175. El procedimiento de una cualquiera de las cláusulas 124 a 155 y 157 a 174, en el que se realiza al menos uno de un análisis sin marcador y uno de afinidad de los péptidos de secuencia de unión al núcleo extendidos y madurados.

25

176. El procedimiento de una cualquiera de las cláusulas 124 a 155 y 157 a 175, en el que la primera o segunda micromatriz de péptidos comprende al menos uno de compuesto de vidrio, plástico y carbono.

30

177. El procedimiento de una cualquiera de las cláusulas 124 a 155 y 157 a 176, en el que los péptidos funcionalizados y los péptidos cíclicos en la primera o la segunda micromatriz de péptidos comprenden el mismo número de aminoácidos.

178. El procedimiento de una cualquiera de las cláusulas 124 a 155 y 157 a 177, en el que los péptidos funcionalizados y los péptidos cíclicos en la primera o la segunda micromatriz de péptidos no incluyen el aminoácido cisteína o metionina, o los motivos de histidina-prolina-glutamina, o repeticiones de aminoácidos de 2 o más aminoácidos.

35

179. El procedimiento de una cualquiera de las cláusulas 124 a 155 y 157 a 178, en el que la población de péptidos de secuencia de unión al núcleo extendidos y madurados incluye al menos uno de un oligopéptido de síntesis con titubeo N terminal y un oligopéptido de síntesis con titubeo C terminal.

40

180. El procedimiento de una cualquiera de las cláusulas 124 a 155 y 157 a 179, en el que la primera o segunda micromatriz de péptidos comprende uno o más péptidos lineales y en el que el procedimiento comprende además la etapa de poner en contacto los uno o más péptidos lineales en la primera o segunda micromatriz de péptidos con una proteasa que pueda digerir los uno o más péptidos lineales.

45

181. El procedimiento de la cláusula 180, en el que la proteasa es una amino proteasa o una mezcla de amino proteasas.

50

182. El procedimiento de la cláusula 180 en el que la proteasa es dipeptidil peptidasa IV, aminopeptidasa m o una combinación de las mismas.

183. Un polipéptido de andamio de anticuerpo presentado en ARNm que comprende un péptido de interés.

184. El polipéptido de andamio de anticuerpo presentado en ARNm de la cláusula 183 en el que el péptido de interés es un péptido terapéutico.

185. Una micromatriz de péptidos que comprende un polipéptido de andamio de anticuerpo que comprende un péptido de interés.

186. La micromatriz de péptidos de la cláusula 185 en la que el péptido de interés es un péptido terapéutico.

187. El procedimiento, el polipéptido de andamio de anticuerpo presentado en ARNm o la micromatriz de péptidos de una cualquiera de las cláusulas 109 a 186, en los que el polipéptido de andamio de anticuerpo comprende un casete de secuencia de aminoácidos aleatoria y el casete de secuencia de aminoácidos aleatoria comprende la secuencia del péptido de interés.

188. El procedimiento, el polipéptido de andamio de anticuerpo presentado en ARNm o la micromatriz de péptidos de la cláusula 187, en los que el casete de secuencia de aminoácidos aleatoria no incluye la secuencia de un anticuerpo, un fragmento de un anticuerpo o un fragmento de péptido derivado de un anticuerpo.

189. El procedimiento de la cláusula 144 o 145 en el que la secuencia de reconocimiento de butelasa 1 es NHV.

190. El procedimiento de la cláusula 146, 147, 167 o 168, en el que la cadena lateral de glutamina es parte de la secuencia [WY][DE][DE][YW]ALQ[GST]YD (SEQ ID NO: 4) y la cadena lateral de lisina es parte de la secuencia RSKLG (SEQ ID NO: 5).

191. El procedimiento de una cualquiera de las cláusulas 109 a 123 que comprende además la etapa de sintetizar el polipéptido de andamio de anticuerpo que comprende el péptido de interés en una micromatriz de péptidos para madurar y/o extender el péptido de interés.

192. El procedimiento, el polipéptido de andamio de anticuerpo presentado en ARNm o la micromatriz de péptidos de una cualquiera de las cláusulas 109 a 186, en los que el polipéptido de andamio de anticuerpo comprende un casete de secuencia de aminoácidos aleatoria en los que el casete de secuencia de aminoácidos aleatoria comprende la secuencia del péptido de interés y en el que el casete de secuencia de aminoácidos aleatoria se usa para la selección de péptidos de interés.

193. Un polipéptido de andamio de anticuerpo que comprende un casete de secuencia de aminoácidos aleatoria.

En otro modo de realización, los procedimientos, las micromatrices de péptidos y los polipéptidos de andamio de anticuerpos de vaca presentados en ARNm y los polipéptidos de andamio de anticuerpos descritos en el presente documento incluyen los siguientes ejemplos. Los ejemplos ilustran además rasgos característicos adicionales de los diversos modos de realización de la invención descritos en el presente documento. Sin embargo, se debe entender que los ejemplos son ilustrativos y no se deben interpretar como limitantes de otros modos de realización de la invención descritos en el presente documento. Además, se aprecia que otras variaciones de los ejemplos se incluyen en los diversos modos de realización de la invención descritos en el presente documento.

Ejemplo 1

Micromatrices

En el estado de la técnica se conocen diversos procedimientos para la producción de micromatrices. Por ejemplo, la detección de péptidos prefabricados o la síntesis *in situ* mediante detección de reactivos, por ejemplo, en membranas, ejemplifican procedimientos conocidos. Otros procedimientos conocidos usados para generar matrices de péptidos de mayor densidad son las denominadas técnicas fotolitográficas, donde el diseño sintético de los biopolímeros deseados se controla mediante grupos protectores fotolábiles (PLPG) adecuados que liberan el sitio de enlace para el siguiente componente respectivo (por ejemplo, aminoácido) tras la exposición a radiación electromagnética, tal como la luz (Fodor *et al.*, (1993) *Nature* 364:555-556; Fodor *et al.*, (1991) *Science* 251:767-773). En el estado de la técnica se conocen dos técnicas fotolitográficas diferentes. La primera es una máscara fotolitográfica, usada para dirigir la luz a áreas específicas de la superficie de síntesis efectuando la desprotección localizada de los PLPG. Los procedimientos "enmascarados" incluyen la síntesis de polímeros utilizando un soporte (por ejemplo, una "máscara") que se acopla a un sustrato y proporciona un espacio de reactor entre el sustrato y el soporte. Los modos de realización ejemplares de dicha síntesis de matrices "enmascarada" se describen, por ejemplo, en las patentes de EE. UU. n.ºs 5.143.854 y 5.445.934. La segunda técnica fotolitográfica es la fotolitografía sin máscara, donde la luz se dirige a áreas específicas de la superficie de síntesis, efectuando la desprotección localizada de los PLPG mediante tecnologías de proyección digital, tales como dispositivos de microespejos (Singh-Gasson *et al.*, *Nature Biotechn.* 17 (1999) 974-978). Se debe

entender que los modos de realización de los procedimientos divulgados en el presente documento pueden comprender o utilizar cualquiera de las diversas técnicas de síntesis de micromatrices descritas anteriormente.

5 El uso de PLPG (grupos protectores fotolábiles), que proporciona la base para la síntesis de micromatrices de péptidos basada en fotolitografía, es bien conocido en la técnica. Los PLPG comúnmente usados para la síntesis de biopolímeros basada en fotolitografía son, por ejemplo, α -metil-6-nitropiperonil-oxicarbonilo (MeNPOC) (Pease *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1994) 91:5022-5026), 2-(2-nitrofenil)-propoxycarbonilo (NPPOC) (Hasan *et al.* (1997) *Tetrahedron* 53:4247-4264), nitroveratriloxicarbonilo (NVOC) (Fodor *et al.* (1991) *Science* 251:767-773) y 2-nitrobenciloxycarbonilo (NBOC) (Patchornik *et al.* (1970) 21:6333-6335).

10 Se han introducido aminoácidos en la síntesis fotolitográfica de péptidos en fase sólida de micromatrices de péptidos, que estaban protegidos con NPPOC como un grupo protector amino fotolábil, en el que se usaban portaobjetos de vidrio como soporte (publicación de patente de EE. UU. n.º 2005/0101763 A1). El procedimiento que usa aminoácidos protegidos con NPPOC tiene la desventaja de que la semivida tras la irradiación con luz de todos los aminoácidos protegidos (excepto uno) está dentro del intervalo de aproximadamente 2 a 3 minutos en determinadas condiciones. Por el contrario, en las mismas condiciones, la tirosina protegida con NPPOC presenta una semivida de prácticamente 10 minutos. Dado que la velocidad del procedimiento de síntesis completo depende del subprocedimiento más lento, este fenómeno incrementa el tiempo del procedimiento de síntesis en un factor de 3 a 4. Simultáneamente, el grado de daño provocado por los iones radicalarios fotogenerados a los oligómeros en crecimiento se incrementa con el requisito de dosis de luz excesiva y en incremento.

15 Una única micromatriz de péptidos o, en algunos casos, múltiples micromatrices (por ejemplo, 3, 4, 5 o más micromatrices) se pueden localizar en un soporte de matriz. El tamaño de las micromatrices de péptidos depende del número de micromatrices en un soporte de matriz. Cuanto mayor sea el número de micromatrices por soporte de matriz, más pequeñas tienen que ser las matrices para que ajusten en el soporte de matriz. Las matrices se pueden diseñar en cualquier conformación, pero preferentemente se diseñan como cuadrados o rectángulos.

20 El término rasgo característico se refiere a un área definida en la superficie de una micromatriz de péptidos. El rasgo característico comprende biomoléculas, tales como péptidos, y similares. Un rasgo característico puede contener biomoléculas con diferentes propiedades, tales como diferentes secuencias u orientaciones, en comparación con otros rasgos característicos. El tamaño de un rasgo característico está determinado por dos factores: i) el número de rasgos característicos en una micromatriz, cuanto mayor sea el número de rasgos característicos en una micromatriz, más pequeño será cada rasgo característico único, ii) el número de elementos de espejo de aluminio direccionables individualmente que se usan para la irradiación de un rasgo característico. Cuanto mayor sea el número de elementos de espejo usados para la irradiación de un rasgo característico, mayor será el rasgo característico único. El número de rasgos característicos en una micromatriz puede estar limitado por el número de elementos de espejo (píxeles) presentes en el dispositivo de microespejo. Por ejemplo, el dispositivo de microespejo de última generación de Texas Instruments, Inc. actualmente contiene 4,2 millones de elementos de espejo (píxeles), por tanto el número de rasgos característicos dentro de una micromatriz ejemplar de este tipo está limitado por lo tanto por este número. Sin embargo, se debe entender que el dispositivo de microespejo de Texas Instruments, Inc. se proporciona solo para propósitos ejemplares y son posibles micromatrices de mayor densidad.

25 Se debe entender que el término soporte de matriz se refiere a cualquier material sólido que tenga un área de superficie a la que se puedan unir moléculas orgánicas a través de la formación de enlaces o que se puedan absorber a través de interacciones electrónicas o estáticas, tales como un enlace covalente o la formación de complejos a través de un grupo funcional específico. El soporte de matriz puede ser una combinación de materiales, tales como plástico sobre vidrio, carbono sobre vidrio y similares. La superficie funcional puede ser moléculas orgánicas simples, pero también puede comprender copolímeros, dendrímeros, cepillos moleculares y similares. Se puede usar plástico como soporte y, preferentemente, el plástico es una poliolefina con propiedades ópticas definidas, como TOPAS® o ZEONOR/EX®.

30 El término "grupo funcional", como se usa en este ejemplo, se refiere a cualquiera de numerosas combinaciones de átomos que forman parte de moléculas químicas, que experimentan reacciones características por sí mismas y que influyen en la reactividad del resto de la molécula. Los grupos funcionales típicos incluyen, pero no se limitan a, hidroxilo, carboxilo, aldehído, carbonilo, amino, ácido, alquilino, tiol y nitrilo. Los grupos funcionales potencialmente reactivos incluyen, por ejemplo, aminas, ácidos carboxílicos, alcoholes, dobles enlaces y similares. Los grupos funcionales preferentes son grupos funcionales potencialmente reactivos de aminoácidos, tales como grupos amino o grupos carboxilo.

35 Como se entiende por un experto en la técnica, las micromatrices de péptidos comprenden un principio de ensayo con el que miles (o millones) de péptidos (en algunos modos de realización presentados en múltiples copias) están unidos o inmovilizados a la superficie de un soporte de matriz (que en algunos modos de realización comprende un vidrio, compuesto de carbono y/o chip o portaobjetos de plástico). En algunos modos de realización, la micromatriz de péptidos, después de la incubación con una molécula diana, experimenta una o más etapas de lavado, y a continuación se expone a un sistema de detección, por ejemplo, que utiliza fluorescencia, quimioluminiscencia, procedimientos colorimétricos o autorradiografía.

En el caso de acontecimientos de unión, después de escanear los portaobjetos de micromatrices, el escáner puede grabar una imagen numérica de 20 bits, 16 bits u 8 bits en formato de archivo de imagen etiquetado (*.tif). La imagen .tif permite la interpretación y cuantificación de los datos obtenidos del portaobjetos de micromatrices escaneado. Estos datos cuantitativos pueden ser la base para realizar un análisis estadístico en acontecimientos de unión medidos o modificaciones de péptidos en el portaobjetos de micromatrices. Para la evaluación e interpretación de las señales detectadas se debe realizar una asignación del punto peptídico (visible en la imagen) y la secuencia peptídica correspondiente. Los datos para la asignación normalmente se guardan en el archivo de la lista de matrices de GenePix (.gal) y se suministran conjuntamente con la micromatriz de péptidos. El archivo .gal (un archivo de texto separado por tabulación) se puede abrir usando módulos de un programa informático de cuantificación de micromatrices o procesar con un editor de texto (por ejemplo, un bloc de notas) o Microsoft Excel. Este archivo 'gal' se proporciona más a menudo por el fabricante de micromatrices y se genera mediante los archivos de entrada txt y el programa informático de seguimiento integrado en los robots que realizan la fabricación de micromatrices.

Una micromatriz de péptidos es un portaobjetos plano con péptidos colocados en forma de puntos sobre el mismo o ensamblados directamente en la superficie mediante síntesis *in situ*. Los péptidos se unen idealmente covalentemente a través de un enlace quimioselectivo que da lugar a péptidos con la misma orientación para el perfil de interacción. Procedimientos alternativos incluyen la unión covalente inespecífica y la inmovilización en adhesivo.

Después de la identificación de una secuencia de unión al núcleo, se puede llevar a cabo un proceso de "maduración de péptidos" con el que la secuencia de unión al núcleo se altera de diversas maneras (a través de sustituciones, deleciones e inserciones de aminoácidos) en cada posición de la secuencia de unión al núcleo para optimizar/verificar además la secuencia de unión al núcleo apropiada. Por ejemplo, de acuerdo con algunos modos de realización (por ejemplo, cuando la secuencia de unión al núcleo comprende un número dado de, tal como 5, aminoácidos), se produce una matriz de maduración. La matriz de maduración puede tener, por ejemplo, inmovilizada a ella, una población de secuencias de unión al núcleo, con lo que cada aminoácido en la secuencia de unión al núcleo ha experimentado una sustitución aminoacídica en cada posición.

Una secuencia de unión al núcleo de ejemplo/hipotética se describe como que consiste en un péptido pentámero que tiene la secuencia de aminoácidos -M1M2M3M4M5- (SEQ ID NO: 372). La maduración de aciertos puede implicar cualquiera de, o una combinación de cualquiera o la totalidad de, las sustituciones, deleciones e inserciones de aminoácidos en las posiciones 1, 2, 3, 4 y 5. Por ejemplo, con respecto a la secuencia de unión al núcleo hipotética -M1M2M3M4M5- (SEQ ID NO: 372), los modos de realización pueden incluir el aminoácido M en la posición 1 que está sustituido con cada uno de los otros 19 aminoácidos (por ejemplo, A1M2M3M4M5- (SEQ ID NO: 373), P1M2M3M4M5- (SEQ ID NO: 374), V1M2M3M4M5- (SEQ ID NO: 375), Q1M2M3M4M5- (SEQ ID NO: 376), etc.). Cada posición (2, 3, 4 y 5) también tendría el aminoácido M sustituido con cada uno de los otros 19 aminoácidos (por ejemplo, con la posición 2 las sustituciones se asemejarían a M1A2M3M4M5- (SEQ ID NO: 377), M1Q2M3M4M5- (SEQ ID NO: 378), M1P2M3M4M5- (SEQ ID NO: 379), M1N2M3M4M5- (SEQ ID NO: 380), etc.). Se debe entender que se crea un péptido (inmovilizado en una matriz) que comprende las secuencias sustituidas y/o delecionadas y/o insertadas del núcleo.

En algunos modos de realización de maduración de acuerdo con la presente divulgación, se puede realizar una doble sustitución aminoacídica. Una doble subestación de aminoácidos incluye alterar el aminoácido en una posición dada (por ejemplo, una sustitución M→P, por ejemplo en la posición 1) y a continuación sustituir el aminoácido en la posición 2 con cada uno de los otros 19 aminoácidos, el aminoácido en la posición 2. Este proceso se repite hasta que se combinan todas las combinaciones posibles de las posiciones 1 y 2. A modo de ejemplo, en referencia de nuevo a la secuencia de unión al núcleo hipotética que tiene un péptido pentámero con secuencia de aminoácidos -M1M2M3M4M5- (SEQ ID NO: 372), una doble sustitución aminoacídica con respecto a las posiciones 1 y 2 puede incluir, por ejemplo, una sustitución M→P en la posición 1, y a continuación una subestación de los 20 aminoácidos en la posición 2 (por ejemplo, -P1A2M3M4M5- (SEQ ID NO: 381), -P1F2M3M4M5- (SEQ ID NO: 382), -P1V2M3M4M5- (SEQ ID NO: 383), -P1E2M3M4M5- (SEQ ID NO: 384), etc.), una sustitución M→V en la posición 1, y a continuación una subestación de los 20 aminoácidos en la posición 2 (por ejemplo, -V1A2M3M4M5- (SEQ ID NO: 385), -V1F2M3M4M5- (SEQ ID NO: 386), -V1V2M3M4M5- (SEQ ID NO: 387), -V1E2M3M4M5- (SEQ ID NO: 388), etc.), una sustitución M→A en la posición 1, y a continuación una subestación de los 20 aminoácidos en la posición 2 (por ejemplo, -A1A2M3M4M5- (SEQ ID NO: 389), -A1F2M3M4M5- (SEQ ID NO: 390), -A1V2M3M4M5- (SEQ ID NO: 391), -A1E2M3M4M5- (SEQ ID NO: 392), etc.).

En algunos modos de realización de maduración, se puede realizar una deleción de aminoácidos para cada posición de aminoácido de la secuencia de unión al núcleo. Una deleción de aminoácidos incluye la preparación de un péptido que incluye la secuencia de unión al núcleo, pero la deleción de un único aminoácido de la secuencia de unión al núcleo (de modo que se cree un péptido en el que se delecciona el aminoácido en cada péptido). A modo de ejemplo, en referencia de nuevo a la secuencia de unión al núcleo hipotética que tiene un péptido pentámero con secuencia de aminoácidos -M1M2M3M4M5- (SEQ ID NO: 372), una deleción de aminoácidos incluiría la preparación de una serie de péptidos que tengan las siguientes secuencias -M2M3M4M5- (SEQ ID NO: 393); -M1M3M4M5- (SEQ ID NO: 393); -M1M2M4M5- (SEQ ID NO: 393); -M1M2M3M5- (SEQ ID NO: 393); y -M1M2M3M4- (SEQ ID NO: 393).

Cabe destacar que, después de una delección de aminoácidos del hipotético pentámero, se crean 5 nuevos tetrámeros. De acuerdo con algunos modos de realización, se puede realizar una sustitución aminoacídica o un escaneo de una doble subestación de aminoácidos para cada nuevo tetrámero generado.

5 De forma similar al escaneo de delecciones de aminoácidos analizado anteriormente, algunos modos de realización de maduración pueden incluir un escaneo de inserciones de aminoácidos, con lo que cada uno de los 20 aminoácidos se inserta antes y después de cada posición de la secuencia de unión al núcleo. A modo de ejemplo, en referencia de nuevo a la secuencia de unión al núcleo hipotética que tiene un péptido pentámero con secuencia de aminoácidos
10 –M1M2M3M4M5– (SEQ ID NO: 372), un escaneo de inserciones de aminoácidos podría incluir las siguientes secuencias, –XM1M2M3M4M5– (SEQ ID NO: 394); –M1XM2M3M4M5– (SEQ ID NO: 395); –M1M2XM3M4M5– (SEQ ID NO: 396); –M1M2M3XM4M5– (SEQ ID NO: 397); –M1M2M3M4XM5– (SEQ ID NO: 398); y –M1M2M3M4M5X– (SEQ ID NO: 399) (donde X representa un amino individual, seleccionado de los 20 aminoácidos conocidos o un subconjunto específico definido de aminoácidos, con lo que se creará una réplica peptídica para cada uno de los 20 o subconjunto definido de aminoácidos).

15 También se debe entender que los péptidos sustituidos con aminoácidos, los péptidos sustituidos con aminoácidos dobles, los péptidos de escaneo de delecciones de aminoácidos y los péptidos de escaneo de inserciones de aminoácidos descritos anteriormente también pueden incluir una, o ambas de, una secuencia de aminoácidos con titubeo N terminal y C terminal. Al igual que con las secuencias de aminoácidos con titubeo N terminal y C terminal,
20 las secuencias de aminoácidos con titubeo N terminal y C terminal pueden comprender tan solo 1 aminoácido o hasta 15 o 20 aminoácidos, y la secuencia de aminoácidos con titubeo N terminal puede tener la misma longitud que, ser más larga o más corta que la secuencia de aminoácidos con titubeo C terminal. Además, las secuencias de aminoácidos con titubeo N terminal y C terminal pueden comprender cualquier grupo definido de aminoácidos en cualquier proporción dada (por ejemplo, glicina y serina en una proporción 3:1).

25 Una vez que se preparan las diversas variaciones de sustitución, delección e inserción de la secuencia de unión al núcleo (por ejemplo, de forma inmovilizada en un soporte de matriz, tal como una micromatriz), se analiza una propiedad predeterminada de la molécula diana purificada, por ejemplo, en condiciones de reacción o unión apropiadas.

30 Tras la maduración de la secuencia de unión al núcleo (de modo que se identifica una secuencia de aminoácidos más óptima de la secuencia de unión al núcleo para unirse a la molécula diana, por ejemplo), las posiciones N terminal y/o C terminal pueden experimentar una etapa de extensión, con lo que la longitud de la secuencia de unión al núcleo madurada se extiende adicionalmente para incrementar la especificidad y la afinidad por la molécula diana.

35 De acuerdo con diversos modos de realización de la extensión N terminal de la presente divulgación, una vez que se identifica la secuencia de unión al núcleo madurada a través del proceso de maduración, se puede añadir (o sintetizar en) el extremo N terminal de una secuencia de unión al núcleo madurada cualquier aminoácido específico, por ejemplo. Del mismo modo, de acuerdo con diversos modos de realización de la extensión C terminal de la presente divulgación,
40 una vez que se identifica la secuencia de unión al núcleo madurada a través del proceso de maduración, se puede añadir (o sintetizar en) en el extremo C terminal de una secuencia de unión al núcleo madurada cualquier aminoácido específico. De acuerdo con algunos modos de realización de la presente divulgación, la secuencia de unión al núcleo madurada usada en la extensión C terminal y la extensión N terminal puede incluir también una, o ambas, de una secuencia de aminoácidos con titubeo N terminal y C terminal. Las secuencias de aminoácidos con titubeo N terminal
45 y C terminal pueden comprender tan solo 1 aminoácido o hasta 15 o 20 aminoácidos (o más), y la secuencia de aminoácidos con titubeo N terminal puede tener la misma longitud que, ser más larga o más corta que la secuencia de aminoácidos con titubeo C terminal. Además, las secuencias de aminoácidos con titubeo N terminal y C terminal pueden comprender cualquier grupo definido de aminoácidos en cualquier proporción dada (por ejemplo, glicina y serina en una proporción 3:1). Las extensiones descritas anteriormente pueden dar como resultado un péptido de
50 secuencia de unión al núcleo extendido y maduro.

55 En uso, una matriz de extensión se puede exponer a una molécula diana purificada concentrada, con lo que la molécula diana se puede unir a cualquier péptido de interés (por ejemplo, un péptido cíclico), independiente de los otros péptidos que comprenden las poblaciones. Después de la exposición a la molécula diana, se puede someter a ensayo la unión o actividad, por ejemplo, de la molécula diana. Como se conoce la secuencia peptídica para cada localización en la matriz, es posible trazar/cuantificar/comparar/contrastar las secuencias (y las fuerzas de unión o la actividad, por ejemplo) de la molécula diana en relación con el péptido específico que comprende el péptido de secuencia de unión al núcleo extendido y maduro. Un procedimiento ejemplar es revisar la fuerza de unión en un agrupamiento basado en la distribución de análisis por principios, tal como se describe en *Standardizing and Simplifying Analysis of Peptide Library Data*, Andrew D White *et al.*, J Chem Inf Model, 2013, 53(2), pp 493-499, incorporado en el presente documento por referencia. El agrupamiento de la unión a los péptidos respectivos mostrado en un agrupamiento basado en la distribución de análisis por principios indica péptidos que tienen secuencias peptídicas superpuestas. Como se demuestra con mayor detalle a continuación, a partir de las secuencias peptídicas superpuestas (de cada grupo), se puede identificar y construir un péptido de secuencia de unión al núcleo extendido y maduro para una evaluación

adicional. En algunos modos de realización de la presente solicitud, un péptido de secuencia de unión al núcleo extendido y madurado experimenta un proceso de maduración posterior.

5 Después de la identificación de una secuencia de unión al núcleo extendida y madurada, se puede realizar un análisis de especificidad de acuerdo con algunos modos de realización de la presente divulgación. Un ejemplo de un análisis de especificidad incluye un análisis del sistema "Biacore™" que se usa para caracterizar péptidos de interés (por ejemplo, péptidos cíclicos) en términos de la interacción específicamente con una molécula diana, las tasas cinéticas (de "aso", unión, y "dis", disociación) y afinidad (fuerza de unión). Biacore™ es una marca de General Electric Company. En www.biacore.com/lifesciences/introduction/index.html está disponible una visión general del sistema y el proceso Biacore™. Un beneficio de "Biacore™" es la capacidad de realizar los análisis de cinética, especificidad y afinidad de una manera sin marcadores.

EJEMPLO 2

15 Diseño de un polipéptido de andamio CDR H3 de anticuerpo de vaca para presentación en ARNm

Las CDR H3 bovinas ultralargas tienen determinadas regiones consenso que definen el límite del dominio "tallo" y el "botón" de estos polipéptidos. Por ejemplo, muchos anticuerpos (tales como BLV1H12 y BLV5B8) tienen un motivo "T(T/S)VHQ" (SEQ ID NO: 312) en la base de sus hebras ascendentes. En cuanto a las hebras descendentes del tallo, tienen aromáticos alternos (por ejemplo, YXYXY) que forman una escalera a través de interacciones de apilamiento. Como resultado, se determinaron las siguientes secuencias para un polipéptido de andamio de anticuerpo de vaca para su uso en la presentación en ARNm: **MGCTSVHQETKKYQS(X)₁₀SYTYNYEHVDVWGCGSADYKDDDDKKK** (SEQ ID NO:313). Como se muestra en la figura 1, las bases N terminales, la hebra beta ascendente, la hebra beta descendente y las bases C terminales forman la región del tallo. La región de botón del polipéptido que se produjo contiene 10 residuos aleatorios X₁₀, donde X puede ser cualquiera de los veinte aminoácidos naturales (véase la figura 1). Se anexó una marca FLAG en el extremo C para una fácil recuperación de las moléculas de fusión durante el proceso de selección. Teóricamente, el número de secuencias de aminoácidos excepcionales que podrían aparecer en una colección usando este polipéptido de andamio de anticuerpo de vaca es $\sim 10^{13}$ (20¹⁰).

30 EJEMPLO 3

Construcción de una colección de ADN sintético que codifica la colección de péptidos combinatorios

35 Para codificar la colección de péptidos de longitud completa mencionada anteriormente, se preparó un ADN molde que contenía más de doscientas bases. Con esta longitud, la fidelidad a menudo se compensaba con la síntesis química. Por lo tanto, en primer lugar se creó un ADN molde que codificaba parte de la colección (encargada a través de IDT). A continuación se llevó a cabo una PCR de alta fidelidad para extender la colección a su longitud completa. Todos los miembros de la colección de ADN resultante contenían un promotor de la ARN polimerasa T7, una secuencia potenciadora, una secuencia de codificación de la marca FLAG C terminal y un casete aleatorio que codificaba los diez codones aleatorios consecutivos (véase la figura 1). La región aleatoria usó la secuencia **NNS** (SEQ ID NO: 314) (**NNC** (SEQ ID NO:315) o **NNG** (SEQ ID NO: 316)) para minimizar la aparición de los codones de parada. Para un polipéptido de andamio de anticuerpo de vaca que presenta un único péptido, el péptido de unión a trombina, el casete de secuencia de aminoácidos aleatorio se reemplazó con la siguiente secuencia:

45 **TGCATTATCAAAAAGAGCCGCGATCCGGGCCGCTGC** (SEQ ID NO: 317), que codificaba el péptido **CIHKSRDPGRC** (SEQ ID NO: 318).

EJEMPLO 4

50 Expresión de un péptido de unión a trombina y una colección de péptidos

El ADN que codificaba el péptido de unión a trombina o la colección de péptidos se usó como molde en la síntesis de proteínas *in vitro* PURExpress según las instrucciones del fabricante. La mezcla de reacción resultante se comprobó en un gel de SDS page desnaturalizante y se visualizó mediante tinción con plata (véase la figura 2). La banda que correspondía al fragmento de péptido de unión a trombina se cortó adicionalmente, se digirió en gel y se envió para un análisis por espectrometría de masas (UW Biotechnology Center), que confirmó adicionalmente la síntesis satisfactoria del péptido como se diseñó (véase a continuación).

Modificaciones fijas: Carbamidometilo (C)
 Modificaciones variables: Desamidado (NQ), oxidación (M)
 Escisión por tripsina: corta el lado C terminal de KR a menos que el siguiente residuo sea P
 Cobertura de secuencia: **98 %**
 Los péptidos emparejados se muestran en rojo en negrita

1 MGCTSVHQET KKYQSCILKK SRDFGRCSYT YNYEHVDVWG CGSAWSHPQF
 51 EKGSAEQKLI SEEDLG (SEQ ID NO:369)

EJEMPLO 5

5 Construcción de una colección de presentación en ARNm con estructuras de tallo y botón y selección de proteínas de unión diana de alta afinidad (trombina)

1) Elementos de secuencia de la colección de presentación en ARNm propuesta

10 Se creó una colección de presentación en ARNm novedosa que codificaba la cadena polipeptídica CTSVHQETKKYQS(X₁₀)SYTYNYEHVDVW (SEQ ID NO: 319). La secuencia de aminoácidos "CTSVHQETKKYQS...SYTYNYEHVDVW" (SEQ ID NOS: 320 y 370, respectivamente) se adoptó a partir de la estructura de tallo y botón de la región CDR H3 de anticuerpos de vaca. X₁₀ se refiere a diez aminoácidos aleatorios que se presentan en la parte superior de la región de botón durante la selección. Se espera que la parte peptídica de la colección de presentación en ARNm tenga las siguientes secuencias si están en su longitud completa:

15 MGCTSVHQETKKYQS(X₁₀)SYTYNYEHVDVWGC GSADYKDDDDK KK (SEQ ID NO:321)

20 "DYKDDDDK" (SEQ ID NO: 322) es una marca FLAG que se incorporó para permitir una purificación eficaz de las moléculas de fusión péptido/ARNm durante la selección.

La colección de ARNm que codifica las secuencias peptídicas mencionadas anteriormente tenía las siguientes secuencias:

GGGUUAACUUUAGUAAGGAGGACAGCUAAAUGGGUUGC
 ACCAGCGUGCAUCAGGAGACCAAGAAUACCAGAGCNNSNNSN
 NSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNSAGCUACACCUACAACUACGAA
 CAUGUGGAUGUAUGGGGUUGC GGCUCCGCUGACUACAAAGAU
 GACGACGAUAAGAAAAA (SEQ ID NO:323)

25 donde "AUG" (SEQ ID NO: 324) es el codón de iniciación. La colección de ADN correspondiente tenía las siguientes secuencias:

TAATACGACTCACTATAGGGTAACTTTAGTAAGGAGGAC
 AGCTAAATGGGTTGCACCAGCGTGCATCAGGAGACCAAGAAATA
 CCAGAGCNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNSAGCTACAC
 CTACAAC TACGAACATGTGGATGTATGGGGTTGCGGCTCCGCTG
 ACTACAAAG (SEQ ID NO:325)

30 ATGACGACGATAAGAAAAA (SEQ ID NO: 326)

donde "TAATACGACTCACTATAGGG" (SEQ ID NO: 327) es el sitio del promotor T7.

35 2) Amplificación por PCR de la colección 300-53-N10
 300-53-N10:

ES 2 743 448 T3

Se calentó el ARNm a 75 °C durante 1 min antes de ensamblar la reacción de la ligasa, que a continuación se incubó a 15 °C durante 2 h. Se purificó el ARNm usando una columna RNeasy (QIAGEN) y se eluyó en 30 ul de H₂O, 647,4 ng/ul, y a continuación se usó para la traducción con PURExpress.

- 5) Traducción con PURExpress deltaRF123 (NEB) del espaciador de ARNm
- | | |
|----------------------------------|-------|
| Solución A | 20 ul |
| Solución B (menos RF123) | 15 ul |
| RNasin | 1 ul |
| Espaciador de ARNm (647,4 ng/ul) | 15 ul |
- Se incubó la mezcla a 37 °C durante 1,5 h. A continuación se le añadió al 2 % 5 ul de SDS al 20 %.
- Las siguientes etapas usaron microesferas anti-FLAG para capturar las moléculas de fusión y permitieron el lavado y la recuperación en las microesferas
- Se lavaron 50 ul de microesferas magnéticas anti-FLAG M2 (Sigma) con TBSTE + BSA al 2 % 1X. Se mezcló la reacción de traducción con 350 ul de TBSTE + BSA al 2 % 1X y microesferas bloqueadas. A continuación se incubó la reacción a 4 °C durante 30 min y se lavó 3X en TE+ Tween 20 al 0,2 %.
- 6) Se realizó la extensión del cebador RT en las microesferas y se eluyeron los conjugados de fusión como sigue:
- Resuspendidos en 40 ul:
- | | |
|---------------------------------|---------|
| Cebador inverso 300-22-2 100 uM | 1 ul |
| dNTP 10 mM | 2 ul |
| H ₂ O sin RNasa | 23,5 ul |
| Tampón RT 5X (Invitrogen) | 8 ul |
| DTT 0,1 M | 4 ul |
| RNasin (Promega) | 0,5 ul |
| Superscript III (Invitrogen) | 1 ul |
- Se incubó la mezcla a 50 °C durante 30 min, se lavó 3X en TE + Tween 20 al 0,2 % y se transfirió a un nuevo tubo.
- A continuación se eluyó la mezcla 2X con 50 ul de HCl de guanidina 6 M en TE, 1 ul de 10 mg/ml de ARNt, precipitado de etanol, 30' a -20 °C.
- A continuación se centrifugó la mezcla y se resuspendió en 100 ul de 1xTE, y se le añadió 1xTBSTE/Tween al 0,2 % a 1 ml.
- 7) Preselección
- Se añadió 1 ml de las fusiones de la etapa previa a 50 ul de microesferas M270 SA bloqueadas con TBSTE + BSA al 2 % a temperatura ambiente, y se incubaron a temperatura ambiente durante 30 min, y se retiró el sobrenadante para la unión con trombina biotilada.
- 8) Se unieron fusiones preseleccionadas a 3 ul de trombina humana biotilada a 1 U/ul a 4 °C durante 1 h con rotación
- 9) Captura de microesferas M270
- Se lavaron 25 ul de suspensión de microesferas M270 SA y se bloquearon con TBSTE + BSA al 2 %. A continuación se recogieron las microesferas, se mezclaron con 1 ml de cada complejo de fusión/diana y se incubaron a temperatura ambiente durante 30 min. La mezcla se lavó 3X en TBSTE, se transfirió a un nuevo tubo y se eluyó el ADNc con 50 ul de NaOH 0,1 N a temperatura ambiente durante 3 min. A continuación, 2,5 ul de NaAc 3 M, pH 5,5. Se le añadió la columna de centrifugación BioRad y se ajustó el volumen a 147 ul con H₂O.
- 10) Amplificar la colección por PCR con Phusion
- Esta etapa de PCR se llevó a cabo para amplificar la colección para la siguiente ronda de selección y también para ayudar a determinar cómo de satisfactoria fue la selección

Se preparó mezcla de PCR (200 ul):

Tampón HF 5X (NEB)	40 ul
Cebador directo 300-48-1 10 uM	4 ul
Cebador inverso 300-22-2 10 uM	4 ul
dNTP 10 mM	4 ul
ADNc	147 ul
Polimerasa Phusion	1 ul

5 Se sometieron a prueba diversos ciclos de PCR y se llevó a cabo una electroforesis en gel de agarosa para ayudar a determinar los números de ciclos más apropiados donde se pueden detectar suficientes productos de amplificación sin sobreamplificación. Como se ilustra en la figura 3, en este caso particular, se sometieron a prueba los números de ciclo 15, 19, 24, 27 y 30, y el número de ciclo 24 se usó para amplificación adicional por PCR.

10 11) Rondas iterativas de selecciones -

Las siguientes rondas de selecciones (3-5) se llevaron a cabo siguiendo el procedimiento anterior con restricción incrementada (por ejemplo, menores cantidades de entrada de moléculas de fusión y número incrementado de etapas de lavado). Después de cada ronda de selección, se realizó una amplificación por PCR similar para preparar la colección de ADN para la siguiente ronda de selección.

15 En resumen, por ejemplo, una ronda de presentación en ARNm consistió en las siguientes etapas: transcripción *in vitro*, digestión con DNasa, conjugación con el conector oligonucleotídico de puromicina, traducción *in vitro*/formación de fusión, purificación de la molécula de fusión FLAG, retrotranscripción, preselección o selección funcional y regeneración de las secuencias seleccionadas. En resumen, se transcribió *in vitro* la colección de ADNc usando ARN polimerasa T7, se generaron los moldes de ARNm con puromicina en los extremos 3' mediante reticulación con un oligonucleótido que contenía un residuo de psoraleno y un residuo de puromicina en sus extremos 5' y 3', respectivamente, y se realizó la traducción *in vitro* usando un kit NEB Purexpress Δ123. A continuación, las fusiones de proteína-ARNm deseadas se aislaron de la mezcla de reacción de traducción usando microesferas magnéticas anti-FLAG. A continuación, las moléculas de fusión se convirtieron en híbridos de ADN/ARN a través de retrotranscripción. Esta etapa eliminó estructuras de ARNm secundarias que podrían interferir con la selección posterior. A continuación, la colección resultante de péptidos sintéticos presentados en ARNm se usó para la selección.

30 12) Resultados y análisis

Para analizar los resultados de la selección, las colecciones de ADN se amplificaron después de cada ronda de selección usando cebadores de secuenciación especialmente diseñados que albergaban adaptadores de secuenciación de nueva generación de Illumina. Se mezclaron las colecciones, se purificaron adicionalmente y se realizó la secuenciación de nueva generación. Las secuencias peptídicas recuperadas después de cada ronda de selección se identificaron de acuerdo con su código de barras de secuenciación excepcional y se realizó una comparación y análisis adicionales. La secuenciación de nueva generación proporcionó las ventajas de un alto rendimiento y una visión general más completa de las especies seleccionadas.

40 Ejemplo 6

Progreso de la selección contra la trombina y secuencias de péptidos seleccionados

45 Cuando se usó trombina como diana, se llevaron a cabo un total de tres rondas de selecciones. La presión de selección se incrementó incrementando la restricción del lavado (de tres a cinco veces y a continuación a diez veces para la ronda de selección 1, 2 y 3). La tabla 1 ilustra las proteínas de unión principales (clasificadas de acuerdo con su frecuencia) después de cada ronda de selección. Después de la ronda de selección 3, más de un 30 % de los péptidos seleccionados contenían el motivo "RDPGR" (SEQ ID NO: 331) conservado. El péptido "RDPGRLIFQS" (SEQ ID NO: 332) más abundante se eligió para su análisis adicional.

Tabla 1. Proteínas de unión principales para trombina humana

Ronda 1			Ronda 2			Ronda 3		
secuencia	recuentos	porcentaje (%)	secuencia	recuentos	porcentaje (%)	secuencia	recuentos	porcentaje (%)
(SEQ ID NO: 333) SQSERATPRY	47	1,5E-03	(SEQ ID NO: 343) RDPGRLLFQS	2642	0,1608	(SEQ ID NO: 353) RDPGRLLFQS	170914	20,512
(SEQ ID NO: 334) RFHLFVLGTS	46	1,4E-03	(SEQ ID NO: 344) RDPGRVIFEI	1632	0,0993	(SEQ ID NO: 354) RDPGRVIFEI	83638	10,038
(SEQ ID NO: 335) PPVLPQLVLL	44	1,4E-03	(SEQ ID NO: 345) RDPGRIVFNN	781	0,0475	(SEQ ID NO: 355) RDPGRIVFNN	9534	1,144
(SEQ ID NO: 336) PLIHPRRGYA	43	1,3E-03	(SEQ ID NO: 346) RDPYNNVLISL	278	0,0170	(SEQ ID NO: 356) RDPYNNVLISL	702	0,084
(SEQ ID NO: 337) HRLQIATVYT	42	1,3E-03	(SEQ ID NO: 347) HRLQIATVYT	179	0,0109	(SEQ ID NO: 357) RSHGQFSFTF	258	0,031
(SEQ ID NO: 338) TQPKLTHIEQR	42	1,3E-03	(SEQ ID NO: 348) ETRIYIRFHT	86	0,0052	(SEQ ID NO: 358) SLFVEYRITY	224	0,027
(SEQ ID NO: 339) HCDTLELRPA	40	1,2E-03	(SEQ ID NO: 349 y 371, respectivamente) RTKIK*NGL*	86	0,0052	(SEQ ID NO: 359) QMSFRFEVRV	211	0,025
(SEQ ID NO: 340) LKQIDFRIP	39	1,2E-03	(SEQ ID NO: 350) VTSTYMFMYA	84	0,0051	(SEQ ID NO: 360) SIEFGLTFSF	195	0,023
(SEQ ID NO: 341) KCC'TSMVIQL	38	1,2E-03	(SEQ ID NO: 351) AAVRLNSSS*	75	0,0046	(SEQ ID NO: 361) VTSTYMFMYA	175	0,021
(SEQ ID NO: 342) LQRAISSYSR	38	1,2E-03	(SEQ ID NO: 352) VVEFHFKWCI	75	0,0046	(SEQ ID NO: 362) QFHLEFAFTL	164	0,020

Ejemplo 7Características de unión de proteínas de unión de trombina seleccionadas

5 Se encargó ADN molde 300-53-C lineal que codifica el péptido MGCTSVHQETKKYQSRDPGRLIFQSSYTNYEHVDVWGCBSAWSHQPFE KGS (SEQ ID NO: 363) como ADN monocatenario sintético purificado (ADNmc) de IDT.com como sigue:

5'-ATGGGTTGCACCGCGTGCATCAGGAGACCAAGAAATACCAG
AGCAGAGATCCTGGTAGATTAATATTTCAATCTAGCTACACCTACAAC
ACGAACATGTGGATGTATGGGGTTGCGGCTCCGCTTGGAGCCATCCGCA
10 GTTCGAAAAGGGTAGT -3'(SEQ ID NO:364).

Cebador PC1:

5'-TAATACGACTCACTATAGGGTAACTTTAGTAAGGAGGACAGCTAAA
TGGGTTGCACCGAG-3'(SEQ ID NO:365).

15 Cebador PC2: 5'-TTAACTACCCTTTTCGAACTGCGGATGGCTCCA - 3'(SEQ ID NO:366).

El ADNmc (SEQ ID NO: 363) se amplificó adicionalmente y se convirtió en ADN bicatenario (ADNbc) por PCR con una polimerasa de alta fidelidad de acuerdo con el siguiente protocolo

Tampón HF 5X (NEB)	200 ul
PC1 100 uM	10 ul 1000 pmol
PC2 100 uM	10 ul 1000 pmol
Molde sintético 10 uM	10 ul 100 pmol
dNTP 10 mM	20 ul
Agua	745 ul
Polimerasa Phusion Inicio en caliente	5 ul

20 La mezcla se amplificó por PCR durante 6 ciclos: 98 °C 30"->(98 °C 20"->64 °C 60"->72 °C 30") 6 ciclos ->72 °C 2'. A continuación, el producto de la PCR se purificó con dos columnas QIAGEN y se eluyó con 25 ul de H₂O cada una para un total de 50 ul. A continuación se midió la concentración de ADN y se ajustó a una concentración final de 250 ng/ul.

25 A continuación, se ensambló en hielo una reacción de traducción *in vitro* usando PURExpress (NEB, E6800) en el siguiente orden:

Solución A: 10 µl

30 Solución B: 7,5 µl

Inhibidor de la ribonucleasa RNAsin: 1 µl

H₂O sin nucleasa: 4,5 µl

35 ADNbc molde: 2 µl, 250 ng/ul

Se incubaron las muestras a 37 °C durante 3 horas. A continuación se detuvo la reacción colocando el/los tubo(s) en hielo, y las muestras se almacenaron a -20 °C para su uso futuro.

40 Se determinó la cinética de unión de los péptidos brutos de la mezcla de traducción midiendo la resonancia de plasmón superficial en un BIAcore X100. En resumen, se inmovilizaron 50 ug/ml de strepMAB-Imm (anticuerpo monoclonal específico Strep-tag® II de IBA) en NaAc 10 mM sobre un chip sensor CM5 que se activó previamente con NHS/EDC. Después de desactivación con etanolamina, se inyectó una mezcla de traducción bruta (10 ul diluidos en 113 ul de 1xHBS/EP + tampón de migración). Los péptidos expresados en la mezcla contenían una marca de strep II y, por tanto, se capturaron por la superficie modificada por StrepMAB-Imm. A continuación, se hizo fluir por la superficie trombina con un intervalo de diferentes concentraciones (0 nM, 3,125 nM, 6,25 nM, 12,5 nM, 25 nM y 50 nM) de acuerdo con el protocolo estándar de cinética de un único ciclo, consistiendo cada etapa en una fase de asociación de inyección de 120 segundos y una fase de disociación de 800 segundos. Se registró el sensograma (véase la figura

4) y se derivaron las constantes cinéticas mediante ajuste global a un modelo de unión de Langmuir 1:1 usando el programa informático de evaluación BIAcore X100.

5 Se prepararon adicionalmente dos péptidos (se sintetizaron y purificaron mediante Peptide 2.0) con las siguientes secuencias: a) Biotina - GCTSVHQETKKYQSRDPGRLLIFQSSYTYNYEHVDVW GCG (SEQ ID NO: 367) y b) Biotina - GGGGSGGGGSRDPGRLLIFQS (SEQ ID NO: 368). Las afinidades de unión de cada péptido hacia la trombina se sometieron a prueba en un sistema Biacore X100.

10 En resumen, se inmovilizaron 50 ul de 100 ug/ml de estreptavidina (en NaAc 10 mM, EDTA 0,1 mM, NaCl 1 mM, DTT 1 mM, pH 4,6) en un chip sensor CM5 que se activó previamente con NHS/EDC a un caudal de 5 µl/min. Después de desactivación con etanolamina, se inyectaron y capturaron péptidos biotinilados (10 ng/ml). Siguiendo el protocolo estándar para cinética de ciclos múltiples, se realizaron a continuación una serie de inyecciones de trombina a 0 nM, 3,125 nM, 6,25 nM, 12,5 nM, 25 nM y 50 nM. Después de cada inyección, se regeneró la superficie del sensor durante 2 min con glicina-HCl 10 mM, pH 1,7 (de GE). Se registró el sensograma (véase la figura 5) y se derivaron las constantes cinéticas mediante ajuste global a un modelo de unión de Langmuir 1:1 usando el programa informático de evaluación BIAcore X100.

20 Como se puede observar en los datos, cuando la secuencia del núcleo conservada seleccionada se coloca en el contexto del andamio de anticuerpo de vaca, su rendimiento de unión hacia la trombina se potenciaba enormemente, como se demuestra por un incremento de más de cuarenta veces en los valores de K_D cuando se compara con el péptido lineal sin secuencias de andamio de anticuerpos de vaca. El andamio de anticuerpo de vaca puede proporcionar una conformación ciclada (debido a la existencia de su "tallo" de hebra β), lo que a su vez incrementa la afinidad del péptido por su diana al disminuir el coste entrópico de la unión.

25 ***) Página 2a, línea suplementaria 10**

En este contexto, un experto en la técnica antes de que se realizara la invención conocía la siguiente técnica anterior:

30 FENG WANG *ET AL.*: "Reshaping Antibody Diversity", CELL, vol. 153, n.º 6, 1 de junio de 2013 (2013-06-01), páginas 1379-1393,

"World ADC Cow Antibodies: A New Structural Class of Antibody Using Ultra long CDR3s", Scripps Res Inst, Dept Integrat Struct and Computat Biol, La Jolla, CA 92037 EE. UU.;

35 "In vitro evolution of single-chain antibodies using mRNA display", NUCLEIC ACIDS RESEARCH, OXFORD UNIVERSITY PRESS, GB, vol. 34, n.º 19, 1 de noviembre de 2006

"Directed evolution of high-affinity antibody mimics using mRNA display", CHEMISTRY AND BIOLOGY, CURRENT BIOLOGY, LONDRES, GB, vol. 9, n.º 8, 1 de agosto de 2002

40 Documento WO 2010/039852 A2

Documento EP 2 647 704 A1

45 Documento EP 2 615 455 A1

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> ROCHE DIAGNOSTICS GMBH F. HOFFMANN-LA ROCHE AG
- 5 <120> PROCEDIMIENTO Y COMPOSICIÓN DEL POLIPÉPTIDO DE ANDAMIO DE ANTICUERPO DE VACA
- <130> P32658-WO
- 10 <140>
<141>
- <150> 62/152.004
<151> 23/04/2015
- 15 <160> 402
- <170> PatentIn versión 3.5
- 20 <210> 1
<211> 70
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
- <220>
25 <223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético
- <220>
<221> MOD_RES
<222> (16)..(55)
30 <223> Cualquier aminoácido natural o no natural
- <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (16)..(55)
35 <223> Esta región puede englobar de 1 a 5, 1 a 6, 1 a 7, 1 a 8, 1 a 9, 1 a 10, 1 a 11, 1 a 12, 1 a 13, 1 a 14, 1 a 15, 1 a 16, 1 a 17, 1 a 18, 1 a 19, 1 a 20, 1 a 21, 1 a 22, 1 a 23, 1 a 24, 1 a 25, 1 a 26, 1 a 27, 1 a 28, 1 a 29, 1 a 30,
- <220>
<221> MISC_FEATURE
40 <222> (16)..(55)
<223> continuación de anteriormente; 1 a 31, 1 a 32, 1 a 33, 1 a 34, 1 a 35, 1 a 36, 1 a 37, 1 a 38, 1 a 39 o 1 a 40 residuos, en los que algunas posiciones pueden estar ausentes
- <400> 1
Met Gly Cys Thr Ser Val His Gln Glu Thr Lys Lys Tyr Gln Ser Xaa
1 5 10 15
- Xaa
20 25 30
- Xaa
35 40 45
- 45 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Ser Tyr Thr Tyr Asn Tyr Glu His Val
50 55 60
- Asp Val Trp Gly Cys Gly
65 70
- 50 <210> 2
<211> 80
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

ES 2 743 448 T3

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

5 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (16)..(55)
 <223> Cualquier aminoácido natural o no natural

10 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (16)..(55)
 <223> Esta región puede englobar de 1 a 5, 1 a 6, 1 a 7, 1 a 8, 1 a 9, 1 a 10, 1 a 11, 1 a 12, 1 a 13, 1 a 14, 1 a 15, 1 a 16, 1 a 17, 1 a 18, 1 a 19, 1 a 20, 1 a 21, 1 a 22, 1 a 23, 1 a 24, 1 a 25, 1 a 26, 1 a 27, 1 a 28, 1 a 29, 1 a 30,

15 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (16)..(55)
 <223> continuación de anteriormente; 1 a 31, 1 a 32, 1 a 33, 1 a 34, 1 a 35, 1 a 36, 1 a 37, 1 a 38, 1 a 39 o 1 a 40

20 residuos, en los que algunas posiciones pueden estar ausentes

<400> 2
 Met Gly Cys Thr Ser Val His Gln Glu Thr Lys Lys Tyr Gln Ser Xaa
 1 5 10 15
 Xaa
 20 25 30
 Xaa
 35 40 45
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Ser Tyr Thr Tyr Asn Tyr Glu His Val
 50 55 60
 Asp Val Trp Gly Cys Gly Ser Ala Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
 65 70 75 80

25 <210> 3
 <211> 82
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

35 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (16)..(55)
 <223> Cualquier aminoácido natural o no natural

40 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (16)..(55)
 <223> Esta región puede englobar de 1 a 5, 1 a 6, 1 a 7, 1 a 8, 1 a 9, 1 a 10, 1 a 11, 1 a 12, 1 a 13, 1 a 14, 1 a 15, 1 a 16, 1 a 17, 1 a 18, 1 a 19, 1 a 20, 1 a 21, 1 a 22, 1 a 23, 1 a 24, 1 a 25, 1 a 26, 1 a 27, 1 a 28, 1 a 29, 1 a 30,

45 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (16)..(55)
 <223> continuación de anteriormente; 1 a 31, 1 a 32, 1 a 33, 1 a 34, 1 a 35, 1 a 36, 1 a 37, 1 a 38, 1 a 39 o 1 a 40

50 <400> 3

ES 2 743 448 T3

Met Gly Cys Thr Ser Val His Gln Glu Thr Lys Lys Tyr Gln Ser Xaa
 1 5 10 15

Xaa
 20 25 30

Xaa
 35 40 45

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Ser Tyr Thr Tyr Asn Tyr Glu His Val
 50 55 60

Asp Val Trp Gly Cys Gly Ser Ala Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
 65 70 75 80

Lys Lys

- 5 <210> 4
- <211> 10
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- 10 <220>
- <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
- 15 <220>
- <221> MOD_RES
- <222> (1)..(1)
- <223> Trp o Tyr
- 20 <220>
- <221> MOD_RES
- <222> (2)..(3)
- <223> Asp o Glu
- 25 <220>
- <221> MOD_RES
- <222> (4)..(4)
- <223> Trp o Tyr
- 30 <220>
- <221> MOD_RES
- <222> (8)..(8)
- <223> Gly, Ser o Thr
- 35 <400> 4
- Xaa Xaa Xaa Xaa Ala Leu Gln Xaa Tyr Asp
- 1 5 10
- <210> 5
- <211> 5
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- 40 <220>
- <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
- 45 <400> 5
- Arg Ser Lys Leu Gly
- 1 5
- <210> 6
- <211> 6

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 5 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

 <400> 6
 Cys Thr Thr Val His Gln
 1 5

 10 <210> 7
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 15 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

 <400> 7
 Cys Thr Ser Val His Gln
 1 5

 20 <210> 8
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 25 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

 <400> 8
 Cys Ser Ser Val Thr Gln
 1 5

 30 <210> 9
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

 40 <400> 9
 Cys Ser Thr Val His Gln
 1 5

 <210> 10
 <211> 6
 45 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

 50 <400> 10
 Cys Ala Thr Val Arg Gln
 1 5

 <210> 11
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 60 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 11
Cys Ser Pro Val His Gln
 1 5

5 <210> 12
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 10 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 12
Cys Ala Thr Val Tyr Gln
 1 5

15 <210> 13
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 13
Cys Thr Ala Val Tyr Gln
 1 5

25 <210> 14
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 14
Cys Thr Asn Val His Gln
 1 5

35 <210> 15
 <211> 6
 <212> PRT
 40 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

45 <400> 15
Cys Ala Thr Val His Gln
 1 5

<210> 16
 <211> 6
 50 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

55 <400> 16
Cys Thr Thr Val Arg Gln
 1 5

60 <210> 17
 <211> 6

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 5 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

 <400> 17
Cys Ser Thr Val Tyr Gln
 1 5

 10 <210> 18
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 15 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

 <400> 18
Cys Thr Ile Val His Gln
 1 5

 20 <210> 19
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 25 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

 <400> 19
Cys Ala Ile Val Tyr Gln
 1 5

 30 <210> 20
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

 40 <400> 20
Cys Thr Thr Val Tyr Gln
 1 5

 <210> 21
 <211> 6
 45 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

 50 <400> 21
Cys Thr Thr Val Phe Gln
 1 5

 <210> 22
 <211> 6
 55 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 60 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 22
Cys Ala Ala Val Phe Gln
 1 5

5 <210> 23
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 10 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 23
Cys Gly Thr Val His Gln
 1 5

15 <210> 24
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 24
Cys Ala Ser Val His Gln
 1 5

25 <210> 25
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 25
Cys Thr Ala Val Phe Gln
 1 5

35 <210> 26
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

45 <400> 26
Cys Ala Thr Val Phe Gln
 1 5

50 <210> 27
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 55 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 27
Cys Ala Ala Ala His Gln
 1 5

60 <210> 28
 <211> 6

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 5 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

 <400> 28
Cys Val Val Val Tyr Gln
 1 5

 10 <210> 29
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 15 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

 <400> 29
Cys Gly Thr Val Phe Gln
 1 5

 20 <210> 30
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 25 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

 <400> 30
Cys Gly Ala Val His Gln
 1 5

 30 <210> 31
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

 40 <400> 31
Cys Ala Thr Lys Lys Gln
 1 5

 <210> 32
 <211> 6
 45 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

 50 <400> 32
Cys Ile Thr Val His Gln
 1 5

 <210> 33
 <211> 6
 55 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 60 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 33
 Cys Thr Ile Val His Gln
 1 5

5 <210> 34
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 10 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 34
 Cys Ile Thr Ala His Gln
 1 5

15 <210> 35
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 35
 Cys Val Ile Val His Gln
 1 5

25 <210> 36
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 36
 Cys Thr Ile Val Asn Gln
 1 5

35 <210> 37
 <211> 6
 <212> PRT
 40 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

45 <400> 37
 Cys Ala Ala Val His Gln
 1 5

<210> 38
 <211> 6
 50 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

55 <400> 38
 Cys Gly Thr Val Tyr Gln
 1 5

<210> 39
 60 <211> 6

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 5 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

 <400> 39
 Cys Val Thr Val His Gln
 1 5

 10 <210> 40
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 15 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

 <400> 40
 Cys Thr Thr Val Leu Gln
 1 5

 20 <210> 41
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 25 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

 <400> 41
 Cys Thr Thr Thr His Gln
 1 5

 30 <210> 42
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

 40 <400> 42
 Cys Thr Thr Asp Tyr Gln
 1 5

 <210> 43
 <211> 7
 45 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

 50 <400> 43
 Glu Thr Lys Lys Tyr Gln Ser
 1 5

 <210> 44
 <211> 5
 55 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 60 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 44
Glu Thr Arg Lys Thr
 1 5

5 <210> 45
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 10 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 45
Arg Thr His Val Ser Arg Ser
 1 5

15 <210> 46
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 46
Lys Thr Thr Arg Lys Thr Cys
 1 5

25 <210> 47
 <211> 2
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 47
Ile Phe
 1

35 <210> 48
 <211> 9
 <212> PRT
 40 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

45 <400> 48
Lys Thr Arg Thr Thr Gln Gly Asn Thr
 1 5

<210> 49
 <211> 5
 50 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

55 <400> 49
Thr Thr Leu Arg Asp
 1 5

60 <210> 50
 <211> 20

ES 2 743 448 T3

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 5 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

 <400> 50
 Lys Thr Arg Thr Thr Gln Gly Glu Tyr Leu Ser Leu Met Val Thr Leu
 1 5 10 15
 Leu Lys Asp Asp
 20
 10
 <210> 51
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

 <400> 51
 Lys Thr Arg Thr Thr Gln Gly Asn Asn Leu Ser Leu Met Val Thr Leu
 1 5 10 15

 Leu Lys Asp Asp
 20
 20
 <210> 52
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 25
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

 <400> 52
 Lys Thr Arg Thr Thr Gln Gly Asn Thr
 1 5

 <210> 53
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 35
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 40
 <400> 53
 Lys Pro Gly Gln His Lys Gly Ile Leu Val Leu Met Val Thr Leu Leu
 1 5 10 15

 Lys Asp Asp

 <210> 54
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 45
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 50
 <400> 54

ES 2 743 448 T3

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

Lys Asp Asp

- 5 <210> 55
- <211> 5
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

- 10 <220>
- <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

- <400> 55
- Glu Thr Lys Lys Asn
- 1 5

- 15 <210> 56
- <211> 5
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

- 20 <220>
- <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

- <400> 56
- Glu Ile Arg Lys Cys
- 1 5

- 25 <210> 57
- <211> 5
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

- 30 <220>
- <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

- <400> 57
- Gln Thr Arg Lys Cys
- 1 5

- 35 <210> 58
- <211> 5
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

- 40 <220>
- <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

- <400> 58
- Gln Thr Arg Lys Ser
- 1 5

- 45 <210> 59
- <211> 7
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

- 50 <220>
- <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

- 55 <400> 59
- Lys Thr Asn Gln Ser Lys Asn
- 1 5

- <210> 60

<211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 60
Thr Thr His Gln Ile His Thr
 1 5

10 <210> 61
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 61
Lys Thr Thr Ser Ile Arg Ser
 1 5

20 <210> 62
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 62
Lys Thr Lys Lys Thr
 1 5

30 <210> 63
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 63
Lys Thr Lys Lys Leu
 1 5

40 <210> 64
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 64
His Thr Asn Lys Lys Arg
 1 5

50 <210> 65
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

60 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 65
His Thr Asn Gln Asn Arg
 1 5

5 <210> 66
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 66
Lys Thr Asn Glu Arg
 1 5

15 <210> 67
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 67
Lys Thr Asn Glu Arg Cys
 1 5

25 <210> 68
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

35 <400> 68
Lys Thr Asn Arg Glu Arg Cys
 1 5

40 <210> 69
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 69
Ser Thr Asn Lys Lys Asp
 1 5

50 <210> 70
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 70
Glu Thr Leu Ile Arg
 1 5

60 <210> 71

<211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 71
Lys Thr Arg Thr Thr
 1 5

10 <210> 72
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 72
Lys Thr Asn Arg Glu Met Ser
 1 5

20 <210> 73
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

30 <400> 73
Glu Thr Lys Arg Ser
 1 5

35 <210> 74
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 74
Arg Thr Arg Gln Arg
 1 5

45 <210> 75
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 75
Lys Thr Glu Thr Arg
 1 5

55 <210> 76
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 76
Lys Thr Asn Lys Lys Glu Ser
 1 5

5 <210> 77
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 77
Lys Ser Arg Lys Glu Ser Ser
 1 5

15 <210> 78
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

25 <400> 78
Glu Thr Arg Thr Asn
 1 5

30 <210> 79
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

35 <400> 79
Lys Thr Glu Lys His
 1 5

40 <210> 80
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 80
Lys Thr Lys Glu Leu
 1 5

50 <210> 81
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 81
His Thr Glu Pro Thr
 1 5

60 <210> 82

<211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 82
Glu Thr Arg Lys Ser
 1 5

10 <210> 83
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 83
Glu Thr Arg Lys Asp
 1 5

20 <210> 84
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 84
Glu Thr Lys Lys Ser
 1 5

30 <210> 85
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

40 <400> 85
Lys Thr Arg Thr Thr Gln Gly Asn Thr
 1 5

45 <210> 86
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 86
Lys Thr Asn Ser Gln Lys Ser
 1 5

55 <210> 87
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 87
 Gln Thr His Lys Val Arg Asp
 1 5

5 <210> 88
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 88
 Arg Thr Gly Gln Lys
 1 5

15 <210> 89
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 89
 Lys Thr Lys Gln Asn
 1 5

25 <210> 90
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

35 <400> 90
 Gln Thr His Glu Lys Arg Ser
 1 5

40 <210> 91
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 91
 Gln Thr Lys Arg Lys Ser Gly
 1 5

50 <210> 92
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 92
 Glu Thr Lys Arg Thr
 1 5

60 <210> 93

<211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 93
Glu Thr Gln Lys Ser
 1 5

10 <210> 94
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 94
Glu Thr His Lys Arg
 1 5

20 <210> 95
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 95
Glu Thr His Lys Asn
 1 5

30 <210> 96
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 96
Gln Thr His Ala Thr Arg Arg
 1 5

40 <210> 97
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 97
Arg Thr Glu Gly Gln Gln Ser
 1 5

50 <210> 98
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

60 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 98
Glu Thr Lys Thr Lys Ser Gly
 1 5

5 <210> 99
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 99
His Thr Lys Glu Ile Lys Thr
 1 5

15 <210> 100
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 100
Glu Thr His Gln Gln Arg Gly
 25 1 5

<210> 101
 <211> 5
 <212> PRT
 30 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

35 <400> 101
Lys Thr Glu Lys Lys
 1 5

<210> 102
 <211> 5
 40 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

45 <400> 102
Arg Thr Gln Lys Ser
 1 5

<210> 103
 50 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 55 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 103
Gln Thr Asn Lys Arg
 1 5

60 <210> 104

<211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 104
Glu Thr Gln Arg Thr Ser
 1 5

10 <210> 105
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

20 <400> 105
Lys Asp Lys His
 1

25 <210> 106
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 106
Gln Thr Thr Glu Lys Gly Lys Thr
 1 5

35 <210> 107
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 107
Lys Thr Asp Val Thr
 1 5

45 <210> 108
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 108
Glu Thr His Thr Gln Arg Thr
 1 5

55 <210> 109
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 109
Lys Thr Glu Lys Ser
 1 5

5 <210> 110
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 110
Lys Thr Asn Gln Lys Trp Gly
 1 5

15 <210> 111
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 111
Glu Thr Arg Thr Asn
 25 1 5

<210> 112
 <211> 7
 <212> PRT
 30 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

35 <400> 112
Lys Thr Thr Thr Thr Lys Ser
 1 5

<210> 113
 <211> 5
 40 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

45 <400> 113
Lys Thr Glu Gln Arg
 1 5

<210> 114
 <211> 5
 50 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 55 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 114
Met Thr Ile Lys Thr
 1 5

60 <210> 115

<211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 115
Lys Thr Glu Ser Val Arg Ser
 1 5

10 <210> 116
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 116
Gln Thr Thr Asn Arg
 1 5

20 <210> 117
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 117
Leu Thr Lys Lys Thr
 1 5

35 <210> 118
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 118
Lys Thr Thr Gln Gln Ser
 1 5

45 <210> 119
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 119
His Thr Asn Lys Lys Arg
 1 5

55 <210> 120
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 120
Gln Thr Arg Lys Ser
 1 5

5 <210> 121
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 121
Lys Thr Ala Arg Ser
 1 5

15 <210> 122
 <211> 2
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 122
Ile Cys
 1

25 <210> 123
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

35 <400> 123
Gln Thr Thr Lys Arg
 1 5

40 <210> 124
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 124
Leu Thr Arg Ala His
 1 5

50 <210> 125
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 125
Arg Thr Glu Lys Ser
 1 5

60 <210> 126

<211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 126
Arg Thr Lys Arg Ser
 1 5

10 <210> 127
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 127
Ile Thr His Lys Glu
 1 5

20 <210> 128
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

30 <400> 128
His Thr Thr Thr Lys Asn Thr
 1 5

35 <210> 129
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 129
Lys Thr Leu Glu Lys Thr
 1 5

45 <210> 130
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 130
Glu Val Gln Lys Lys Thr
 1 5

55 <210> 131
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 131
Lys Thr Gln Arg Ser
 1 5

5 <210> 132
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 132
Glu Thr Lys Thr Arg Ser Thr
 15 1 5

<210> 133
 <211> 7
 <212> PRT
 20 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

25 <400> 133
Arg Thr Thr Thr Glu Arg Ser
 1 5

<210> 134
 <211> 5
 30 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

35 <400> 134
Lys Thr Gln Arg Thr
 1 5

<210> 135
 <211> 9
 40 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 45 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 135
Lys Thr Arg Thr Thr Gln Gly Asn Thr
 1 5

50 <210> 136
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 136
Cys Tyr Thr Tyr Asn Tyr Glu Phe
 60 1 5

<210> 137

<211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 137
His Tyr Thr Tyr Thr Tyr Asp Phe
 1 5

10

<210> 138
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 138
His Tyr Thr Tyr Thr Tyr Glu Trp
 1 5

20

<210> 139
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 139
Lys His Arg Tyr Thr Tyr Glu Trp
 1 5

30

<210> 140
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

40

<400> 140
Asn Tyr Ile Tyr Lys Tyr Ser Phe
 1 5

45

<210> 141
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 141
Pro Tyr Ile Tyr Thr Tyr Gln Phe
 1 5

55

<210> 142
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

60

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 142
Ser Phe Thr Tyr Thr Tyr Glu Trp
 1 5

5 <210> 143
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 143
Ser Tyr Ile Tyr Ile Tyr Gln Trp
 1 5

15 <210> 144
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 144
Ser Tyr Asn Tyr Thr Tyr Ser Trp
 25 1 5

<210> 145
 <211> 8
 <212> PRT
 30 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

35 <400> 145
Ser Tyr Ser Tyr Ser Tyr Glu Tyr
 1 5

<210> 146
 <211> 8
 40 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

45 <400> 146
Ser Tyr Thr Tyr Asn Tyr Asp Phe
 1 5

<210> 147
 <211> 8
 50 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 55 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 147
Ser Tyr Thr Tyr Asn Tyr Glu Trp
 1 5

60 <210> 148

<211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 148
Ser Tyr Thr Tyr Asn Tyr Gln Phe
 1 5

10 <210> 149
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 149
Ser Tyr Val Trp Thr His Asn Phe
 1 5

20 <210> 150
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 150
Thr Tyr Lys Tyr Val Tyr Glu Trp
 1 5

30 <210> 151
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 151
Thr Tyr Thr Tyr Thr Tyr Glu Phe
 1 5

40 <210> 152
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 152
Thr Tyr Thr Tyr Thr Tyr Glu Trp
 1 5

50 <210> 153
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

60 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 153
Val Phe Thr Tyr Thr Tyr Glu Phe
 1 5

5 <210> 154
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 154
Ala Tyr Thr Tyr Glu Trp
 1 5

15 <210> 155
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 155
Asp Tyr Ile Tyr Thr Tyr
 25 1 5

<210> 156
 <211> 6
 <212> PRT
 30 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

35 <400> 156
Ile His Ser Tyr Glu Phe
 1 5

<210> 157
 <211> 6
 40 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

45 <400> 157
Ser Phe Thr Tyr Glu Phe
 1 5

<210> 158
 <211> 6
 50 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 55 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 158
Ser His Ser Tyr Glu Phe
 1 5

60 <210> 159

<211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 159
Thr His Thr Tyr Glu Phe
 1 5

<210> 160
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 160
Thr Trp Thr Tyr Glu Phe
 1 5

<210> 161
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 161
Thr Tyr Asn Tyr Glu Trp
 1 5

<210> 162
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 162
Thr Tyr Ser Tyr Glu Phe
 1 5

<210> 163
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 163
Thr Tyr Ser Tyr Glu His
 1 5

<210> 164
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 164
Thr Tyr Thr Tyr Asp Phe
 1 5

5 <210> 165
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 165
Thr Tyr Thr Tyr Glu Phe
 1 5

15 <210> 166
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 166
Thr Tyr Thr Tyr Glu Trp
 1 5

25 <210> 167
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

35 <400> 167
Ala Tyr Glu Phe
 1

40 <210> 168
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 168
Ala Tyr Ser Phe
 1

50 <210> 169
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 169
Ala Tyr Ser Tyr
 1

60 <210> 170

<211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 170
Cys Tyr Ser Phe
 1

10 <210> 171
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 171
Asp Tyr Thr Tyr
 1

20 <210> 172
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 172
Lys Tyr Glu His
 1

30 <210> 173
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 173
Lys Tyr Glu Trp
 1

40 <210> 174
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 174
Met Tyr Glu Phe
 1

50 <210> 175
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

60 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 175
Asn Trp Ile Tyr
 1

5 <210> 176
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 176
Asn Tyr Asp Tyr
 1

15 <210> 177
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

25 <400> 177
Asn Tyr Gln Trp
 1

30 <210> 178
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 178
Asn Tyr Ser Phe
 1

40 <210> 179
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 179
Pro Tyr Glu Trp
 1

50 <210> 180
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 180
Arg Tyr Asn Trp
 1

60 <210> 181

<211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 181
Arg Tyr Thr Tyr
 1

10 <210> 182
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 182
Ser Tyr Glu Phe
 1

20 <210> 183
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

30 <400> 183
Ser Tyr Glu His
 1

35 <210> 184
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 184
Ser Tyr Glu Trp
 1

45 <210> 185
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 185
Ser Tyr Lys Trp
 1

55 <210> 186
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 186
Ser Tyr Thr Tyr
1

5 <210> 187
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 187
Thr Tyr Asp Phe
1

15 <210> 188
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 188
Thr Tyr Glu Phe
1

25 <210> 189
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

35 <400> 189
Thr Tyr Glu Trp
1

40 <210> 190
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 190
Thr Tyr Gln Trp
1

50 <210> 191
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 191
Thr Tyr Thr Tyr
1

60 <210> 192
 <211> 4

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 5 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

 <400> 192
 Val Tyr Glu Trp
 1

 10 <210> 193
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 15 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

 <400> 193
 Tyr Val Asp Ala Trp
 1 5

 20 <210> 194
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 25 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

 <400> 194
 His Val Asp Val Trp
 1 5

 30 <210> 195
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

 40 <400> 195
 His Val Asp Ala Trp
 1 5

 45 <210> 196
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 50 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

 <400> 196
 Gly Val Asp Ala Trp
 1 5

 55 <210> 197
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 60 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 197
Tyr Ile Asp Ala Trp
 1 5

5 <210> 198
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 10 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 198
His Val Asp Ser Trp
 1 5

15 <210> 199
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 199
His Ile Asp Ala Trp
 1 5

25 <210> 200
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 200
Tyr Val Asp Thr Trp
 1 5

35 <210> 201
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

45 <400> 201
Asn Val Asp Ala Trp
 1 5

50 <210> 202
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 55 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 202
His Val Asn Ala Trp
 1 5

60 <210> 203
 <211> 5

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 5 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

 <400> 203
Tyr Val Thr Ala Trp
 1 5

 10 <210> 204
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 15 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

 <400> 204
Tyr Ile Thr Ala Trp
 20 1 5

 <210> 205
 <211> 5
 <212> PRT
 25 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

 30 <400> 205
Tyr Val Glu Ala Trp
 1 5

 <210> 206
 <211> 5
 35 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 40
 <400> 206
His Val Asp Glu Trp
 1 5

 <210> 207
 <211> 5
 45 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 50 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

 <400> 207
His Val Asp Thr Trp
 1 5

 55 <210> 208
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 60 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 208
Tyr Ala Asp Ala Trp
 1 5

5 <210> 209
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 10 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 209
Tyr Gly Asp Ala Trp
 1 5

15 <210> 210
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 210
His Ala Asp Ala Trp
 1 5

25 <210> 211
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 211
Tyr Val Glu Ala Trp
 1 5

35 <210> 212
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

45 <400> 212
Asn Val Asp Ser Trp
 1 5

50 <210> 213
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 55 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 213
Asn Val Asp Ala Trp
 1 5

60 <210> 214
 <211> 5

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 5 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

 <400> 214
Gly Val Asp Ala Trp
 1 5

 10 <210> 215
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 15 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

 <400> 215
Asn Ile Asp Ala Trp
 1 5

 20 <210> 216
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 25 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

 <400> 216
Arg Ile Asp Val Met
 1 5

 30 <210> 217
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

 40 <400> 217
Tyr Val Glu Thr Trp
 1 5

 <210> 218
 <211> 5
 45 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

 50 <400> 218
Tyr Val Asn Ala Trp
 1 5

 <210> 219
 <211> 5
 55 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 60 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 219
His Ala Asp Val Trp
 1 5

5 <210> 220
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 10 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 220
His Val Glu Ser Trp
 1 5

15 <210> 221
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 221
His Val Glu Thr Trp
 1 5

25 <210> 222
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 222
Asn Val Glu Ala Trp
 1 5

35 <210> 223
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

45 <400> 223
Tyr Val Asp Ser Trp
 1 5

50 <210> 224
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 224
Arg Val Asp Thr Trp
 1 5

60 <210> 225
 <211> 9

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 5 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

 <400> 225
Gly Asp Tyr Ala Leu Gln Gly Pro Gly
 1 5

 10 <210> 226
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 15 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

 <400> 226
Cys Gly Gly Asp Tyr Ala Leu Gln Gly Pro Gly
 1 5 10

 20 <210> 227
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 25 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

 <400> 227
Trp Gly Gly Asp Tyr Ala Leu Gln Gly Pro Gly
 1 5 10

 30 <210> 228
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 35 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

 <400> 228
Tyr Gly Gly Asp Tyr Ala Leu Gln Gly Pro Gly
 1 5 10

 40 <210> 229
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 45 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

 <400> 229
Asp Gly Gly Asp Tyr Ala Leu Gln Gly Pro Gly
 1 5 10

 50 <210> 230
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 55 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

 60 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 230
 Gly Asp Gly Asp Tyr Ala Leu Gln Gly Pro Gly
 1 5 10

5 <210> 231
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 10 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 231
 Asn Gly Gly Asp Tyr Ala Leu Gln Gly Pro Gly
 1 5 10

15 <210> 232
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 232
 Gly Cys Gly Asp Tyr Ala Leu Gln Gly Pro Gly
 1 5 10

25 <210> 233
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

35 <400> 233
 Glu Gly Gly Asp Tyr Ala Leu Gln Gly Pro Gly
 1 5 10

40 <210> 234
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 234
 Pro Gly Gly Asp Tyr Ala Leu Gln Gly Pro Gly
 1 5 10

50 <210> 235
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 235
 Thr Gly Gly Asp Tyr Ala Leu Gln Gly Pro Gly
 1 5 10

60 <210> 236
 <211> 11

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 5 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

 <400> 236
Gln Gly Gly Asp Tyr Ala Leu Gln Gly Pro Gly
 1 5 10

 10 <210> 237
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 15 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

 <400> 237
Ile Gly Gly Asp Tyr Ala Leu Gln Gly Pro Gly
 1 5 10

 20 <210> 238
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 25 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

 <400> 238
Phe Gly Gly Asp Tyr Ala Leu Gln Gly Pro Gly
 1 5 10

 30 <210> 239
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 35 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

 40 <400> 239
His Gly Gly Asp Tyr Ala Leu Gln Gly Pro Gly
 1 5 10

 45 <210> 240
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 50 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

 <400> 240
Leu Gly Gly Asp Tyr Ala Leu Gln Gly Pro Gly
 1 5 10

 55 <210> 241
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 60 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 241
 Val Gly Gly Asp Tyr Ala Leu Gln Gly Pro Gly
 1 5 10

5 <210> 242
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 242
 Arg Gly Gly Asp Tyr Ala Leu Gln Gly Pro Gly
 1 5 10

15 <210> 243
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 243
 Gly Trp Gly Asp Tyr Ala Leu Gln Gly Pro Gly
 1 5 10

25 <210> 244
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 244
 Met Gly Gly Asp Tyr Ala Leu Gln Gly Pro Gly
 1 5 10

35 <210> 245
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

45 <400> 245
 Ser Gly Gly Asp Tyr Ala Leu Gln Gly Pro Gly
 1 5 10

50 <210> 246
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 246
 Ala Gly Gly Asp Tyr Ala Leu Gln Gly Pro Gly
 1 5 10

60 <210> 247
 <211> 11
 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

5

<400> 247
Gly Tyr Gly Asp Tyr Ala Leu Gln Gly Pro Gly
 1 5 10

<210> 248

10 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 248
Gly Glu Gly Asp Tyr Ala Leu Gln Gly Pro Gly
 1 5 10

20 <210> 249
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 249
Gly Pro Gly Asp Tyr Ala Leu Gln Gly Pro Gly
 30 1 5 10

<210> 250

<211> 11

<212> PRT

35 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

40 <400> 250
Gly His Gly Asp Tyr Ala Leu Gln Gly Pro Gly
 1 5 10

<210> 251

<211> 11

45 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

50 <400> 251
Gly Asn Gly Asp Tyr Ala Leu Gln Gly Pro Gly
 1 5 10

<210> 252

55 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>

60 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 252

<222> (2)..(2)
 <223> Val o Ala

 <400> 257
Xaa Xaa Leu Gln Gly
 5 1 5

 <210> 258
 <211> 5
 <212> PRT
 10 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

 15 <400> 258
Asp Tyr Val Leu Gln
 1 5

 <210> 259
 <211> 5
 20 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 25
 <400> 259
Asn Tyr Ala Leu Gln
 1 5

 <210> 260
 <211> 5
 30 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 35
 <400> 260
Glu Tyr Ala Leu Gln
 1 5

 40 <210> 261
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 45 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

 <400> 261
Pro Tyr Ala Leu Gln
 50 1 5

 <210> 262
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 55
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

 <400> 262
Glu Tyr Val Leu Gln
 60 1 5

<210> 263
 <211> 5
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

 10 <400> 263
 Asp Phe Ala Leu Gln
 1 5

 <210> 264
 <211> 5
 15 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

 20 <400> 264
 Phe Tyr Ala Leu Gln
 1 5

 <210> 265
 <211> 5
 25 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

 30 <400> 265
 Asn Tyr Val Leu Gln
 1 5

 35 <210> 266
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 40 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

 <400> 266
 Arg Tyr Ala Leu Gln
 1 5
 45
 <210> 267
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 50
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

 <400> 267
 Tyr Phe Ala Leu Gln
 1 5
 55
 <210> 268
 <211> 5
 <212> PRT
 60 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 268
Pro Tyr Val Leu Gln
 5 1 5

<210> 269
 <211> 5
 <212> PRT
 10 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 269
Trp Tyr Ala Leu Gln
 15 1 5

<210> 270
 <211> 5
 20 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 270
Ser Tyr Ala Leu Gln
 25 1 5

<210> 271
 <211> 5
 30 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 271
His Tyr Ala Leu Gln
 35 1 5

<210> 272
 <211> 5
 40 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 272
Glu Phe Ala Leu Gln
 50 1 5

<210> 273
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 273
Asn Phe Val Leu Gln
 60 1 5

<210> 274
 <211> 5
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

 10 <400> 274
 Asp Tyr Phe Leu Gln
 1 5

 <210> 275
 <211> 5
 15 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

 20 <400> 275
 Glu Tyr Val Ala Gln
 1 5

 <210> 276
 <211> 5
 25 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

 30 <400> 276
 Asp Tyr Val Ala Gln
 1 5

 35 <210> 277
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 40 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

 <400> 277
 Asp Phe Tyr Leu Gln
 1 5
 45
 <210> 278
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 50
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

 <400> 278
 Glu Tyr Phe Leu Gln
 1 5
 55
 <210> 279
 <211> 4
 <212> PRT
 60 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

5 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (3)..(3)
 <223> Leu o Ser

10 <400> 279
Ser Lys Xaa Lys
 1

15 <210> 280
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

20 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> Lys o Arg

25 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 <223> Ser o Thr

30 <400> 280
Xaa Xaa Lys Leu
 1

35 <210> 281
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

40 <400> 281
Ala Arg Ser Lys Leu
 1 5

45 <210> 282
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 282
Lys Ser Lys Leu Ala
 1 5

55 <210> 283
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 283
Thr Lys Ser Lys Leu
 1 5

5 <210> 284
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 284
Lys Leu Ser Lys Leu
 1 5

15 <210> 285
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 285
Arg Ser Lys Leu Gly
 1 5

25 <210> 286
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

35 <400> 286
Arg Gly Ser Lys Leu
 1 5

40 <210> 287
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 287
Arg Ser Lys Ser Lys
 1 5

50 <210> 288
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 288
Ser Lys Ser Lys Leu
 1 5

60 <210> 289
 <211> 5

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 5 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

 <400> 289
Pro Lys Thr Lys Leu
 1 5

 10 <210> 290
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 15 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

 <400> 290
Arg Ser Lys Leu Ala
 1 5

 20 <210> 291
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 25 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

 <400> 291
Gly Arg Ser Lys Leu
 1 5

 30 <210> 292
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 35 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

 <400> 292
Ser Lys Leu Ser Lys
 1 5

 45 <210> 293
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 50 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

 <400> 293
Phe Thr Lys Ser Lys
 1 5

 55 <210> 294
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 60 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 294
Arg Leu Lys Ser Lys
 1 5

5 <210> 295
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 10 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 295
Lys Leu Gly Ala Lys
 1 5

15 <210> 296
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 296
Gln Arg Ser Lys Leu
 1 5

25 <210> 297
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 297
Leu Ser Lys Leu Lys
 1 5

35 <210> 298
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

45 <400> 298
Asn Arg Thr Lys Leu
 1 5

<210> 299
 <211> 5
 50 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

55 <400> 299
Gln Arg Thr Lys Leu
 1 5

<210> 300
 60 <211> 11

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 5 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

 <400> 300
Gly Gly Gly Arg Ser Lys Leu Ala Gly Gly Gly
 1 5 10

 10 <210> 301
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 15 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

 <400> 301
Gly Gly Gly Ala Arg Ser Lys Leu Gly Gly Gly Gly
 20 1 5 10

 <210> 302
 <211> 5
 <212> PRT
 25 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

 30 <400> 302
Arg Gly Thr Lys Leu
 1 5

 <210> 303
 <211> 5
 35 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 40
 <400> 303
Phe Pro Lys Leu Lys
 1 5

 <210> 304
 <211> 5
 45 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 50 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

 <400> 304
Lys Leu Lys Tyr Lys
 1 5

 55 <210> 305
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 60 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 305
Arg Ala Lys Tyr Lys
 1 5

5 <210> 306
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 10 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 306
Lys Thr Lys Tyr Lys
 1 5

15 <210> 307
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 307
Gly Tyr Lys Leu Lys
 1 5

25 <210> 308
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<220>
 35 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> Phe o Tyr

<220>
 40 <221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 <223> Phe, Tyr o Thr

<400> 308
Xaa Xaa Leu Gln
 45 1

<210> 309
 <211> 4
 <212> PRT
 50 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

55 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> Tyr o Phe

60 <400> 309
Xaa Val Ala Gln
 1

<210> 310
 <211> 3
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

 10 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 <223> Tyr, Leu o Ser

 15 <400> 310
Lys Xaa Lys
 1

 <210> 311
 <211> 3
 20 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 25 <400> 311
Thr Lys Leu
 1

 <210> 312
 <211> 5
 30 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 35 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 40 <223> Thr o Ser

 <400> 312
Thr Xaa Val His Gln
 1 5

 45 <210> 313
 <211> 52
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 50 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

 <220>
 <221> MOD_RES
 55 <222> (16)..(25)
 <223> Cualquiera de los 20 aminoácidos estándar

 <400> 313

ES 2 743 448 T3

Met Gly Cys Thr Ser Val His Gln Glu Thr Lys Lys Tyr Gln Ser Xaa
 1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Ser Tyr Thr Tyr Asn Tyr Glu
 20 25 30

His Val Asp Val Trp Gly Cys Gly Ser Ala Asp Tyr Lys Asp Asp Asp
 35 40 45

Asp Lys Lys Lys
 50

5 <210> 314
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 314
Asn Asn Ser
 1

15 <210> 315
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 315
Asn Asn Cys
 1

25 <210> 316
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 316
Asn Asn Gly
 1

35 <210> 317
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido sintético

45 <400> 317
tgcattatca aaaagagccg cgatccgggc cgctgc 36

50 <210> 318
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 318
 Cys Ile Ile Lys Lys Ser Arg Asp Pro Gly Arg Cys
 5 1 5 10

<210> 319
 <211> 35
 <212> PRT
 10 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

15 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (14)..(23)
 <223> Cualquiera de los 20 aminoácidos estándar

20 <400> 319
 Cys Thr Ser Val His Gln Glu Thr Lys Lys Tyr Gln Ser Xaa Xaa Xaa
 1 5 10 15
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Ser Tyr Thr Tyr Asn Tyr Glu His Val
 20 25 30
 Asp Val Trp
 35

<210> 320
 <211> 13
 <212> PRT
 25 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

30 <400> 320
 Cys Thr Ser Val His Gln Glu Thr Lys Lys Tyr Gln Ser
 1 5 10

<210> 321
 <211> 52
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (16)..(25)
 45 <223> Cualquiera de los 20 aminoácidos estándar

<400> 321

ES 2 743 448 T3

Met Gly Cys Thr Ser Val His Gln Glu Thr Lys Lys Tyr Gln Ser Xaa
 1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Ser Tyr Thr Tyr Asn Tyr Glu
 20 25 30

His Val Asp Val Trp Gly Cys Gly Ser Ala Asp Tyr Lys Asp Asp Asp
 35 40 45

Asp Lys Lys Lys
 50

- 5 <210> 322
- <211> 8
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 10 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
- <400> 322
- Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
- 1 5
- 15 <210> 323
- <211> 185
- <212> ARN
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 20 <223> Descripción de secuencia artificial: polinucleótido sintético
- <220>
- 25 <221> base_modificada
- <222> (75)..(76)
- <223> a, c, u, g, desconocida u otras
- <220>
- 30 <221> base_modificada
- <222> (78)..(79)
- <223> a, c, u, g, desconocida u otras
- <220>
- 35 <221> base_modificada
- <222> (81)..(82)
- <223> a, c, u, g, desconocida u otras
- <220>
- 40 <221> base_modificada
- <222> (84)..(85)
- <223> a, c, u, g, desconocida u otras
- <220>
- 45 <221> base_modificada
- <222> (87)..(88)
- <223> a, c, u, g, desconocida u otras
- <220>
- 50 <221> base_modificada
- <222> (90)..(91)
- <223> a, c, u, g, desconocida u otras
- <220>
- <221> base_modificada

ES 2 743 448 T3

<222> (93)..(94)
 <223> a, c, u, g, desconocida u otras

 <220>
 5 <221> base_modificada
 <222> (96)..(97)
 <223> a, c, u, g, desconocida u otras

 <220>
 10 <221> base_modificada
 <222> (99)..(100)
 <223> a, c, u, g, desconocida u otras

 <220>
 15 <221> base_modificada
 <222> (102)..(103)
 <223> a, c, u, g, desconocida u otras

 <400> 323
 ggguaaacuu uaguaaggag gacagcuaaa uggguugcac cagcgugcau caggagacca 60

 agaaauacca gagcnsnns nnsnnsnnsn nsnnsnnsn snnsagcuac accuacaacu 120

 20 acgaacaugu ggauguaugg gguugcggu cccugacua caaagaugac gacgauaaga 180
 aaaaa 185

 <210> 324
 <211> 3
 25 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido sintético
 30
 <400> 324
 aug 3

 <210> 325
 35 <211> 182
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 40 <223> Descripción de secuencia artificial: polinucleótido sintético

 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (92)..(93)
 45 <223> a, c, t, g, desconocida u otras

 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (95)..(96)
 50 <223> a, c, t, g, desconocida u otras

 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (98)..(99)
 55 <223> a, c, t, g, desconocida u otras

 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (101)..(102)
 60 <223> a, c, t, g, desconocida u otras

 <220>

<221> base_modificada
 <222> (104)..(105)
 <223> a, c, t, g, desconocida u otras

5 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (107)..(108)
 <223> a, c, t, g, desconocida u otras

10 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (110)..(111)
 <223> a, c, t, g, desconocida u otras

15 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (113)..(114)
 <223> a, c, t, g, desconocida u otras

20 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (116)..(117)
 <223> a, c, t, g, desconocida u otras

25 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (119)..(120)
 <223> a, c, t, g, desconocida u otras

30 <400> 325
 taatacgact cactataggg ttaactttag taaggaggac agctaaatgg gttgcaccag 60
 ogtgcatcag gagaccaaga aataccagag cnsnsnsns nnsnsnsns nsnsnsnsn 120
 sagctacacc tacaactacg aacatgtgga tgtatgggggt tgcggctccg ctgactacaa 180
 ag 182

<210> 326
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido sintético

40 <400> 326
 atgacgacga taagaaaaa 20

45 <210> 327
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido sintético

<400> 327
 taatacgact cactataggg 20

55 <210> 328
 <211> 162
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

60 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: polinucleótido sintético

<220>

5 <221> base_modificada
<222> (62)..(63)
<223> a, c, t, g, desconocida u otras

<220>

10 <221> base_modificada
<222> (65)..(66)
<223> a, c, t, g, desconocida u otras

<220>

15 <221> base_modificada
<222> (68)..(69)
<223> a, c, t, g, desconocida u otras

<220>

20 <221> base_modificada
<222> (71)..(72)
<223> a, c, t, g, desconocida u otras

<220>

25 <221> base_modificada
<222> (74)..(75)
<223> a, c, t, g, desconocida u otras

<220>

30 <221> base_modificada
<222> (77)..(78)
<223> a, c, t, g, desconocida u otras

<220>

35 <221> base_modificada
<222> (80)..(81)
<223> a, c, t, g, desconocida u otras

<220>

40 <221> base_modificada
<222> (83)..(84)
<223> a, c, t, g, desconocida u otras

<220>

45 <221> base_modificada
<222> (86)..(87)
<223> a, c, t, g, desconocida u otras

<220>

50 <221> base_modificada
<222> (89)..(90)
<223> a, c, t, g, desconocida u otras

<400> 328
taaggaggac agctaaatgg gttgcaccag cgtgcatcag gagaccaaga aataccagag 60
cnnsnnsnns nnsnnsnnsn nsnnsnnsn sagctacacc tacaactacg aacatgtgga 120
tgtatggggt tgcggctccg ctgactacaa agatgacgac ga 162

55 <210> 329
<211> 49
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

60 <220>
<223> Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido sintético

<400> 329
 taatacgaact cactataggg ttaactttag taaggaggac agctaaatg 49

5 <210> 330
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido sintético

<400> 330
 ttttttctta tcgtcgtcat ctttgtagtc 30

15 <210> 331
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 331
Arg Asp Pro Gly Arg
 25 1 5

<210> 332
 <211> 10
 <212> PRT
 30 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 332
Arg Asp Pro Gly Arg Leu Ile Phe Gln Ser
 35 1 5 10

<210> 333
 <211> 10
 40 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

45 <400> 333
Ser Gln Ser Glu Arg Ala Thr Pro Arg Tyr
 1 5 10

<210> 334
 50 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 55 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 334
Arg Phe His Leu Phe Ile Leu Gly Thr Ser
 1 5 10

60 <210> 335
 <211> 10
 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

5

<400> 335
Pro Pro Val Leu Pro Gln Leu Val Leu Leu
1 5 10

<210> 336

10 <211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 336
Pro Leu Ile His Pro Arg Arg Gly Tyr Ala
1 5 10

20 <210> 337

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 337
His Arg Leu Gln Ile Ala Thr Val Tyr Thr
1 5 10

30 <210> 338

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

35 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 338
Thr Gln Pro Lys Leu Thr Ile Glu Gln Arg
1 5 10

40 <210> 339

<211> 10

<212> PRT

45 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

50 <400> 339
His Cys Asp Thr Leu Glu Leu Arg Pro Ala
1 5 10

<210> 340

<211> 10

55 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

60 <400> 340

Leu Lys Gln Thr Asp Phe Arg Thr Pro Ile
1 5 10

5 <210> 341
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 341
Lys Cys Cys Thr Ser Met Val Ile Gln Leu
1 5 10

15 <210> 342
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 342
Leu Gln Arg Ala Ile Ser Ser Tyr Ser Arg
1 5 10

25 <210> 343
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 343
Arg Asp Pro Gly Arg Leu Ile Phe Gln Ser
1 5 10

35 <210> 344
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 344
Arg Asp Pro Gly Arg Val Ile Phe Glu Ile
1 5 10

45 <210> 345
 <211> 10
 <212> PRT
 50 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

55 <400> 345
Arg Asp Pro Gly Arg Ile Val Phe Asn Asn
1 5 10

60 <210> 346
 <211> 10
 <212> PRT

Ala Ala Val Arg Leu Asn Ser Ser Ser
 1 5

<210> 352
 <211> 10
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

10 <400> 352
 Val Val Glu Phe His Phe Lys Trp Cys Ile
 1 5 10

<210> 353
 15 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 20 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 353
 Arg Asp Pro Gly Arg Leu Ile Phe Gln Ser
 1 5 10

25 <210> 354
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 354
 Arg Asp Pro Gly Arg Val Ile Phe Glu Ile
 1 5 10

35 <210> 355
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 355
 Arg Asp Pro Gly Arg Ile Val Phe Asn Asn
 1 5 10

<210> 356
 <211> 10
 <212> PRT
 50 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

55 <400> 356
 Arg Asp Pro Tyr Asn Val Leu Ile Ser Leu
 1 5 10

<210> 357
 <211> 10
 60 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

5 <400> 357
Arg Ser His Gly Gln Phe Ser Phe Thr Phe
1 5 10

<210> 358
10 <211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
15 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 358
Ser Leu Phe Val Glu Tyr Arg Ile Thr Tyr
1 5 10

20 <210> 359
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 359
Gln Met Ser Phe Arg Phe Glu Val Arg Val
1 5 10

30 <210> 360
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 360
40 Ser Ile Glu Phe Gly Leu Thr Phe Ser Phe
1 5 10

<210> 361
<211> 10
<212> PRT
45 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

50 <400> 361
Val Thr Ser Thr Tyr Met Phe Met Tyr Ala
1 5 10

<210> 362
<211> 10
55 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

60 <400> 362

ES 2 743 448 T3

Gln Phe His Leu Glu Phe Ala Phe Thr Leu
 1 5 10

<210> 363
 <211> 52
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

10 <400> 363
 Met Gly Cys Thr Ser Val His Gln Glu Thr Lys Lys Tyr Gln Ser Arg
 1 5 10 15

Asp Pro Gly Arg Leu Ile Phe Gln Ser Ser Tyr Thr Tyr Asn Tyr Glu
 20 25 30

His Val Asp Val Trp Gly Cys Gly Ser Ala Trp Ser His Pro Gln Phe
 35 40 45

Glu Lys Gly Ser
 50

15 <210> 364
 <211> 156
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: polinucleótido sintético

<400> 364
 atgggttgca ccagcgtgca tcaggagacc aagaaatacc agagcagaga tcctggtaga 60
 ttaatatattc aatctagcta cacctacaac tacgaacatg tggatgtatg gggttgcggc 120
 tccgcttgga gccatccgca gttcgaaaag ggtagt 156

25 <210> 365
 <211> 60
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: cebador sintético

<400> 365
 35 taatacgact cactataggg ttaactttag taaggaggac agctaaatgg gttgcaccag 60

<210> 366
 <211> 33
 <212> ADN
 40 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: cebador sintético

45 <400> 366
 ttaactaccc ttttcgaact gcggatggct cca 33

<210> 367
 <211> 39
 50 <212> PRT

ES 2 743 448 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

5

<220>

<223> Biotina N terminal

<400> 367

Gly Cys Thr Ser Val His Gln Glu Thr Lys Lys Tyr Gln Ser Arg Asp
 1 5 10 15

Pro Gly Arg Leu Ile Phe Gln Ser Ser Tyr Thr Tyr Asn Tyr Glu His
 20 25 30

Val Asp Val Trp Gly Cys Gly
 35

10

<210> 368

<211> 20

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

20 <220>

<223> Biotina N terminal

<400> 368

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Arg Asp Pro Gly Arg Leu
 1 5 10 15

Ile Phe Gln Ser
 20

25

<210> 369

<211> 66

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético

<400> 369

Met Gly Cys Thr Ser Val His Gln Glu Thr Lys Lys Tyr Gln Ser Cys
 1 5 10 15

Ile Ile Lys Lys Ser Arg Asp Pro Gly Arg Cys Ser Tyr Thr Tyr Asn
 20 25 30

Tyr Glu His Val Asp Val Trp Gly Cys Gly Ser Ala Trp Ser His Pro
 35 40 45

Gln Phe Glu Lys Gly Ser Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp
 50 55 60

35

Leu Gly
 65

<210> 370

<400> 375
Val Met Met Met Met
 1 5

5 <210> 376
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 376
Gln Met Met Met Met
 1 5

15 <210> 377
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 377
Met Ala Met Met Met
 25 1 5

<210> 378
 <211> 5
 <212> PRT
 30 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

35 <400> 378
Met Gln Met Met Met
 1 5

<210> 379
 <211> 5
 40 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

45 <400> 379
Met Pro Met Met Met
 1 5

<210> 380
 50 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 55 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 380
Met Asn Met Met Met
 1 5

60 <210> 381

<211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 381
Pro Ala Met Met Met
 1 5

10 <210> 382
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 382
Pro Phe Met Met Met
 1 5

20 <210> 383
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 383
Pro Val Met Met Met
 1 5

30 <210> 384
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 384
Pro Glu Met Met Met
 1 5

40 <210> 385
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 385
Val Ala Met Met Met
 1 5

50 <210> 386
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

60 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 386
Val Phe Met Met Met
 1 5

5 <210> 387
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 387
Pro Val Met Met Met
 1 5

15 <210> 388
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 388
Val Glu Met Met Met
 1 5

25 <210> 389
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 389
Ala Ala Met Met Met
 1 5

35 <210> 390
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 390
Ala Phe Met Met Met
 1 5

45 <210> 391
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 391
Ala Val Met Met Met
 1 5

55 <210> 392

<211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 392
Ala Glu Met Met Met
 1 5

10 <210> 393
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 393
Met Met Met Met
 1

20 <210> 394
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

30 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> Cualquiera de los 20 aminoácidos estándar

35 <220>
 <223> Véase la memoria descriptiva presentada para la descripción detallada de las sustituciones y los modos de realización preferentes

<400> 394
Xaa Met Met Met Met Met
 1 5

40 <210> 395
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

50 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 <223> Cualquiera de los 20 aminoácidos estándar

55 <220>
 <223> Véase la memoria descriptiva presentada para la descripción detallada de las sustituciones y los modos de realización preferentes

<400> 395
Met Xaa Met Met Met Met
 1 5

60 <210> 396

- <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
- 5 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
- <220>
 <221> MOD_RES
 10 <222> (3)..(3)
 <223> Cualquiera de los 20 aminoácidos estándar
- <220>
 <223> Véase la memoria descriptiva presentada para la descripción detallada de las sustituciones y los modos de
 15 realización preferentes
- <400> 396
Met Met Xaa Met Met Met
 1 5
- 20 <210> 397
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
- 25 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
- <220>
 <221> MOD_RES
 30 <222> (4)..(4)
 <223> Cualquiera de los 20 aminoácidos estándar
- <220>
 <223> Véase la memoria descriptiva presentada para la descripción detallada de las sustituciones y los modos de
 35 realización preferentes
- <400> 397
Met Met Met Xaa Met Met
 1 5
- 40 <210> 398
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
- 45 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
- <220>
 <221> MOD_RES
 50 <222> (5)..(5)
 <223> Cualquiera de los 20 aminoácidos estándar
- <220>
 <223> Véase la memoria descriptiva presentada para la descripción detallada de las sustituciones y los modos de
 55 realización preferentes
- <400> 398
Met Met Met Met Xaa Met
 1 5
- 60 <210> 399
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

5 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (6)..(6)
 <223> Cualquiera de los 20 aminoácidos estándar

10 <220>
 <223> Véase la memoria descriptiva presentada para la descripción detallada de las sustituciones y los modos de realización preferentes

<400> 399
 Met Met Met Met Met Xaa
 1 5

<210> 400
 <211> 15
 <212> PRT
 20 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

25 <400> 400
 Met Gly Cys Thr Ser Val His Gln Glu Thr Lys Lys Tyr Gln Ser
 1 5 10 15

<210> 401
 <211> 27
 30 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

35 <400> 401
 Ser Tyr Thr Tyr Asn Tyr Glu His Val Asp Val Trp Gly Cys Gly Ser
 1 5 10 15

Ala Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Lys Lys
 20 25

<210> 402
 40 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 45 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 402
 Gly Cys Gly Ser Ala Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Lys Lys
 1 5 10 15

50

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para seleccionar un péptido de interés, comprendiendo el procedimiento las etapas de:

- 5 a) preparar una colección de péptidos usando un polipéptido de andamio de anticuerpo de vaca presentado en ARNm que comprende el péptido de interés que se va a identificar;
- b) seleccionar el péptido de interés de la colección de péptidos poniendo en contacto una molécula diana con el péptido de interés en el que la molécula diana se inmoviliza sobre un soporte sólido o está en solución; e
- 10 c) identificar la secuencia de aminoácidos del péptido de interés,

en el que el polipéptido de andamio de anticuerpo de vaca comprende la secuencia **MGCTSVHQETKKYQS(X*)_cSYTYNYEHVDVWGCGSADYKDDDDKKK** (SEQ ID NO: 3)

15 en la que (X*)_c es una secuencia de aminoácidos aleatoria, y en la que X* es una secuencia de aminoácidos y c es el número de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos aleatoria.

20 2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la etapa de preparación de la colección de péptidos comprende la etapa de transcripción *in vitro* de una colección de ADN para formar una colección de ARNm.

3. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que los miembros de la colección de ADN comprenden una secuencia promotora de ARN polimerasa, una secuencia potenciadora y una secuencia de marca de purificación.

25 4. El procedimiento de la reivindicación 2, que comprende además la etapa de traducir *in vitro* el ARNm de la colección de ARNm para formar conjugados de fusión de polipéptido de andamio de anticuerpo de vaca-ARNm que comprenden el polipéptido de andamio de anticuerpo de vaca en el que el polipéptido de andamio de anticuerpo de vaca comprende una marca de purificación.

30 5. El procedimiento de la reivindicación 4, que comprende además la etapa de purificar los conjugados de fusión de polipéptido de andamio de anticuerpo de vaca-ARNm usando la marca de purificación.

35 6. El procedimiento de la reivindicación 5, que comprende además la etapa de retrotranscribir el ARNm de la colección de ARNm para formar híbridos de ARNm-ADN de los conjugados de fusión de polipéptido de andamio de anticuerpo de vaca-ARNm.

40 7. El procedimiento de la reivindicación 6, en el que la etapa de selección comprende poner en contacto los híbridos de ARNm-ADN de los conjugados de fusión de polipéptido de andamio de anticuerpo de vaca-ARNm con la molécula diana.

8. El procedimiento de la reivindicación 1, que comprende además uno de:

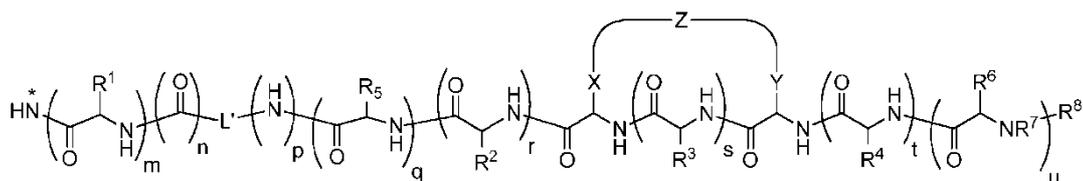
45 i) sintetizar el polipéptido de andamio de anticuerpo de vaca que comprende el péptido de interés en una micromatriz de péptidos para al menos uno de madurar y extender el péptido de interés; y

ii) sintetizar el péptido de interés en una micromatriz de péptidos para madurar y/o extender el péptido de interés.

9. El procedimiento de la reivindicación 8, que comprende las etapas de:

50 a) sintetizar el polipéptido de andamio de anticuerpo de vaca que comprende el péptido de interés, o derivados del péptido de interés, en una primera micromatriz de péptidos, en el que los derivados del péptido de interés incluyen al menos una alteración en la secuencia del péptido de interés seleccionada de una única sustitución aminoacídica, una doble sustitución aminoacídica, una delección de uno o más aminoácidos, y una inserción de uno o más aminoácidos, con lo que se generan péptidos funcionalizados en la primera micromatriz de péptidos;

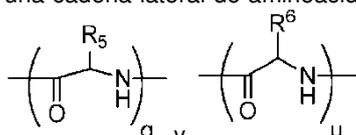
55 b) formar a partir de los péptidos funcionalizados, en los que los péptidos funcionalizados están en forma lineal, péptidos cíclicos de fórmula VIII



VIII

en la que cada R¹, R², R³ y R⁴ es independientemente una cadena lateral de aminoácido natural o una cadena lateral de aminoácido no natural;

5 cada R⁵ y R⁶ es independientemente una cadena lateral de aminoácido natural o una cadena lateral de aminoácido



no natural seleccionada de modo que q y u pueden formar una lámina beta;

10 cada R⁷ se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, un grupo de caperuza N terminal y un grupo protector N terminal;

R⁸ se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, un grupo de caperuza N terminal y un grupo protector;

15 cada X e Y se selecciona independientemente del grupo que consiste en un enlace, una cadena lateral de aminoácido natural unida covalentemente a Z y una cadena lateral de aminoácido no natural unida covalentemente a Z;

Z es un grupo que comprende un resto seleccionado del grupo que consiste en un enlace amida, un enlace disulfuro, un enlace isopeptídico, un 1,2,3-triazol y una 1,2-quinona opcionalmente sustituida;

20 L' es un grupo de unión bivalente opcional o un enlace;

m es un número entero de 0 a 6;

25 n es 0 o 1;

p es 0 o 1;

q es un número entero de 0 a 50;

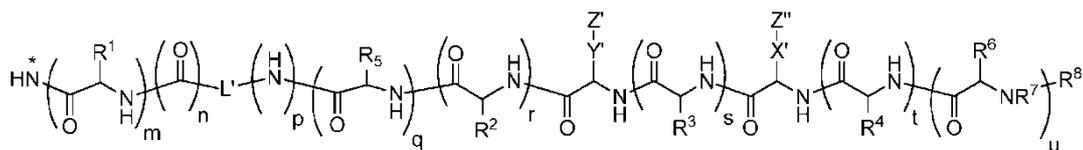
30 r es un número entero de 0 a 50;

s es un número entero de 0 a 50;

35 t es un número entero de 0 a 50;

u es un número entero de 0 a 50; y * es un punto de conexión que conecta el péptido cíclico a un soporte de matriz que tiene una superficie reactiva;

40 comprendiendo el procedimiento la etapa de hacer reaccionar un péptido funcionalizado de fórmula IX en condiciones que hacen que se forme Z



IX

en la que R¹, R², R³, R⁴, R⁵, R⁶, R⁷ y R⁸, m, n, p, q, r, s, t, u, L' y * son como se define para la fórmula VIII;

45 X' se selecciona del grupo que consiste en un enlace, una cadena lateral de aminoácido natural unida covalentemente a Z'' y una cadena lateral de aminoácido no natural unida covalentemente a Z'';

Y' se selecciona del grupo que consiste en un enlace, una cadena lateral de aminoácido natural unida covalentemente a Z' y una cadena lateral de aminoácido no natural unida covalentemente a Z"; y

5 cada Z' y Z" se selecciona independientemente del grupo que consiste en un enlace, -OH, hidrógeno, un tiol, una amina, un ácido carboxílico, una amida, un alquino, una acida, un aminofenol opcionalmente sustituido, una cadena lateral de aminoácido natural, una cadena lateral de aminoácido no natural, un grupo protector N terminal y un grupo protector C terminal, siempre que Z' y Z" sean grupos complementarios que se combinen para formar Z;

10 en el que los péptidos funcionalizados y los péptidos cíclicos se inmovilizan en la superficie reactiva;

c) exponer los péptidos cíclicos a la molécula diana, con lo que la molécula diana se une a al menos un péptido cíclico;

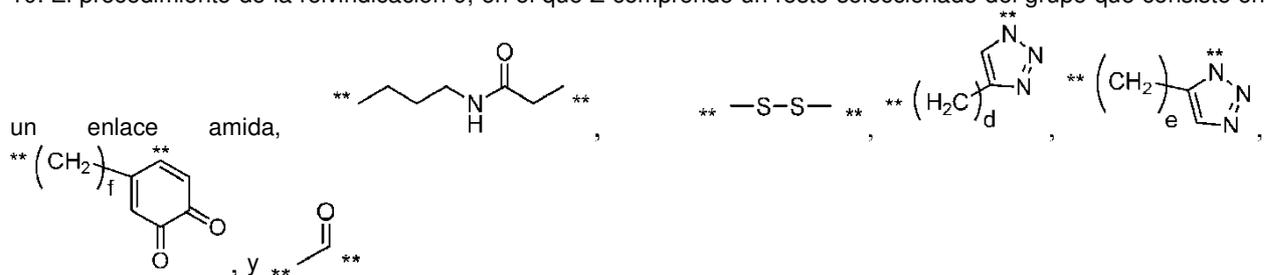
15 d) identificar uno o más de los péptidos cíclicos que demuestran una fuerte unión a la molécula diana, con lo que se determina una secuencia de unión al núcleo madurada;

e) realizar al menos una de la extensión N terminal y C terminal de la secuencia de unión al núcleo madurada determinada en la etapa d para proporcionar una secuencia de unión al núcleo extendida y madurada en una segunda micromatriz de péptidos;

20 f) exponer la molécula diana a la segunda micromatriz de péptidos que comprende una población de péptidos de la secuencia de unión al núcleo extendida y madurada generados en la etapa e en la que la población de péptidos de la secuencia de unión al núcleo extendida y madurada comprende péptidos cíclicos formados como en la etapa b; e

g) identificar un péptido cíclico extendido y madurado con una fuerte unión a la molécula diana.

25 10. El procedimiento de la reivindicación 9, en el que Z comprende un resto seleccionado del grupo que consiste en

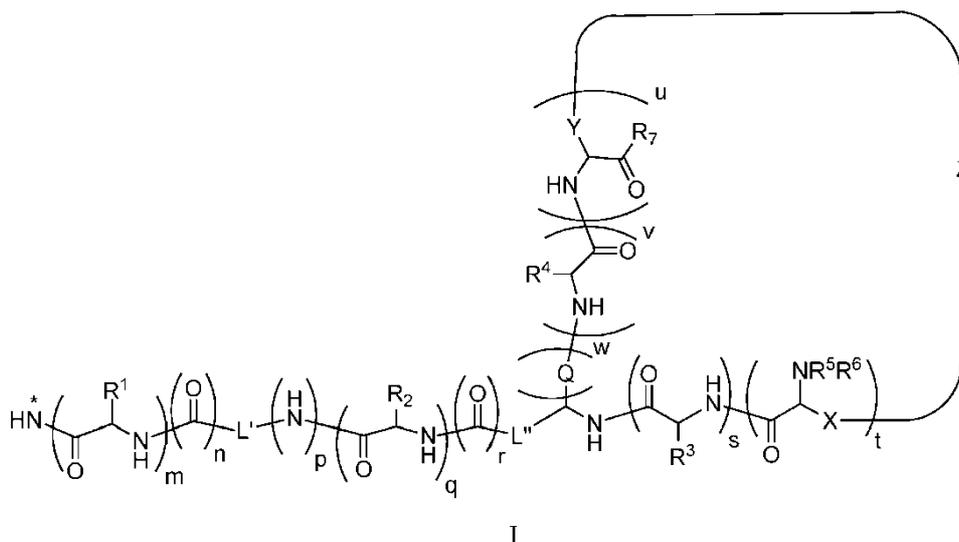


30 en el que d es un número entero de 0 a 6, e es un número entero de 0 a 6 y f es un número entero de 0 a 6, y ** es un punto de conexión con el resto del péptido cíclico.

11. El procedimiento de la reivindicación 10, que comprende además las etapas de:

35 a) sintetizar el péptido de interés, o derivados del mismo, en una primera micromatriz de péptidos, en el que los derivados del péptido de interés incluyen al menos una alteración en la secuencia del péptido de interés seleccionada de una única sustitución aminoacídica, una doble sustitución aminoacídica, una delección de uno o más aminoácidos, y una inserción de uno o más aminoácidos, con lo que se generan péptidos funcionalizados en la primera micromatriz de péptidos;

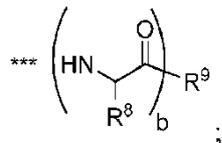
40 b) formar a partir de los péptidos funcionalizados, en los que los péptidos funcionalizados están en forma lineal, péptidos cíclicos de fórmula I



en la que cada R^1 , R^2 , R^3 y R^4 es independientemente una cadena lateral de aminoácido natural o una cadena lateral de aminoácido no natural;

5 cada R^5 y R^6 se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, un grupo de caperuza N terminal y un grupo protector N terminal;

R^7 se selecciona del grupo que consiste en $-OH$, un grupo de caperuza C terminal, un grupo protector C terminal, y



cada R^8 es independientemente una cadena lateral de aminoácido natural o una cadena lateral de aminoácido no natural;

15 R^9 se selecciona del grupo que consiste en $-OH$, un grupo de caperuza C terminal y un grupo protector C terminal;

Q se selecciona del grupo que consiste en un enlace, un carbonilo, una cadena lateral de aminoácido natural y una cadena lateral de aminoácido no natural;

20 cada X e Y se selecciona independientemente del grupo que consiste en un enlace, una cadena lateral de aminoácido natural unida covalentemente a Z y una cadena lateral de aminoácido no natural unida covalentemente a Z;

Z es un grupo que comprende un resto seleccionado del grupo que consiste en un enlace amida, un enlace disulfuro, un enlace isopeptídico, un 1,2,3-triazol y una 1,2-quinona opcionalmente sustituida;

25 cada L' y L'' es independientemente un grupo de unión bivalente opcional o un enlace;

b es un número entero de 0 a 50;

30 m es un número entero de 0 a 6;

n es 0 o 1;

p es 0 o 1;

35 q es un número entero de 0 a 6;

r es 0 o 1;

40 s es un número entero de 0 a 100;

t es 0 o 1;

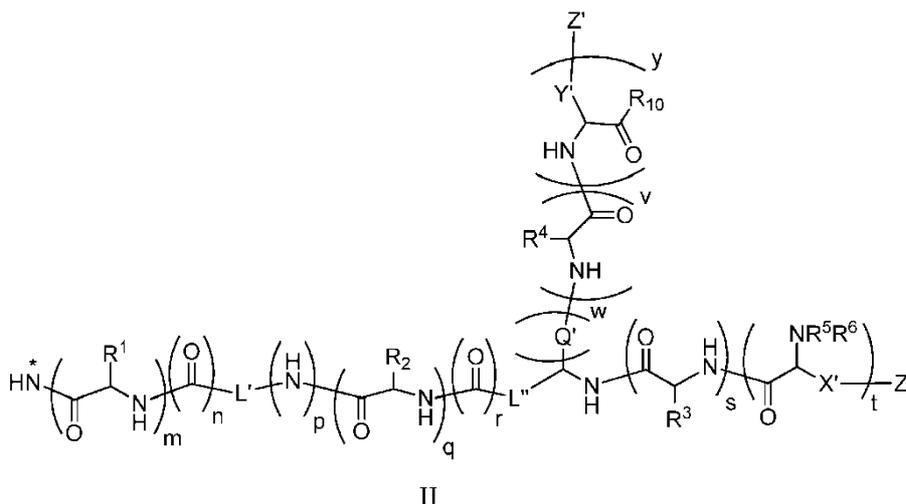
u es 0 o 1;

v es un número entero de 0 a 100;

5 w es 0 o 1; y * es un punto de conexión que conecta el péptido cíclico a un soporte de matriz que tiene una superficie reactiva; y *** es un punto de conexión con el resto del péptido funcionalizado;

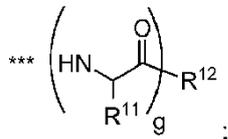
comprendiendo el procedimiento la etapa de hacer reaccionar un péptido funcionalizado de fórmula II en condiciones que hacen que se forme Z

10



en la que R¹, R², R³, R⁴, R⁵, R⁶, m, n, p, q, r, s, t, v, w, L', L'', * y *** son como se define para la fórmula I;

15 R¹⁰ se selecciona del grupo que consiste en -OH, un grupo de caperuza C terminal, un grupo protector C terminal, y



cada R¹¹ es independientemente una cadena lateral de aminoácido natural o una cadena lateral de aminoácido no natural;

20

R¹² se selecciona del grupo que consiste en -OH, un grupo de caperuza C terminal y un grupo protector C terminal;

Q' se selecciona del grupo que consiste en un enlace, un carbonilo, una cadena lateral de aminoácido natural unida covalentemente a Z'' y una cadena lateral de aminoácido no natural unida covalentemente a Z'';

25

X' se selecciona del grupo que consiste en un enlace, una cadena lateral de aminoácido natural unida covalentemente a Z'' y una cadena lateral de aminoácido no natural unida covalentemente a Z'';

30

Y' se selecciona del grupo que consiste en un enlace, una cadena lateral de aminoácido natural unida covalentemente a Z' y una cadena lateral de aminoácido no natural unida covalentemente a Z';

35

cada Z' y Z'' se selecciona independientemente del grupo que consiste en un enlace, -OH, hidrógeno, un tiol, una amina, un ácido carboxílico, una amida, un alquino, una acida, un aminofenol opcionalmente sustituido, una cadena lateral de aminoácido natural, una cadena lateral de aminoácido no natural, un grupo protector N terminal y un grupo protector C terminal, siempre que Z' y Z'' sean grupos complementarios que se combinen para formar Z;

g es un número entero de 0 a 50; e

40

y es 0 o 1;

en el que los péptidos funcionalizados y los péptidos cíclicos se inmovilizan en la superficie reactiva;

c) exponer los péptidos cíclicos a la molécula diana, con lo que la molécula diana se une a al menos un péptido cíclico;

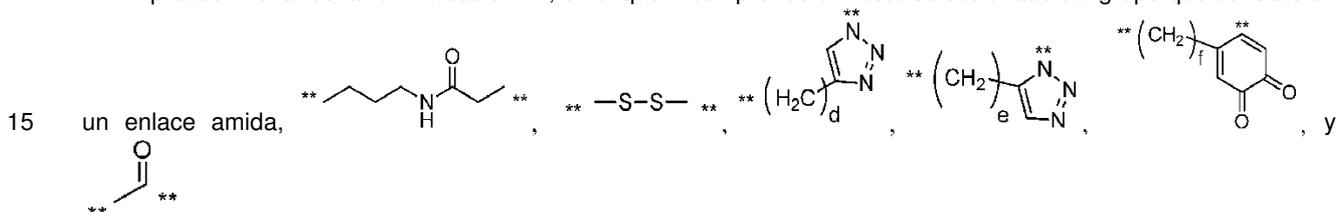
d) identificar uno o más de los péptidos cíclicos que demuestran una fuerte unión a la molécula diana, con lo que se determina una secuencia de unión al núcleo madurada;

5 e) realizar al menos una de la extensión N terminal y C terminal de la secuencia de unión al núcleo madurada determinada en la etapa d para proporcionar una secuencia de unión al núcleo extendida y madurada en una segunda micromatriz de péptidos;

10 f) exponer la molécula diana a la segunda micromatriz de péptidos que comprende una población de péptidos de la secuencia de unión al núcleo extendida y madurada generados en la etapa e en la que la población de péptidos de la secuencia de unión al núcleo extendida y madurada comprende péptidos cíclicos formados como en la etapa b; e

g) identificar un péptido cíclico extendido y madurado con una fuerte unión a la molécula diana.

12. El procedimiento de la reivindicación 11, en el que Z comprende un resto seleccionado del grupo que consiste en



20 en el que d es un número entero de 0 a 6, e es un número entero de 0 a 6 y f es un número entero de 0 a 6, y ** es un punto de conexión con el resto del péptido cíclico.

25 13. Un polipéptido de andamio de anticuerpo de vaca presentado en ARNm que comprende un péptido de interés, en el que el polipéptido de andamio de anticuerpo de vaca presentado en ARNm que comprende la secuencia **MGCTSVHQETKKYQS(X*)_cSYTYNYEHVDVWGC GSADYKDDDDK** (SEQ ID NO: 3) en la que (X*)_c es una secuencia de aminoácidos aleatoria, y en la que X* es una secuencia de aminoácidos y c es el número de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos aleatoria.

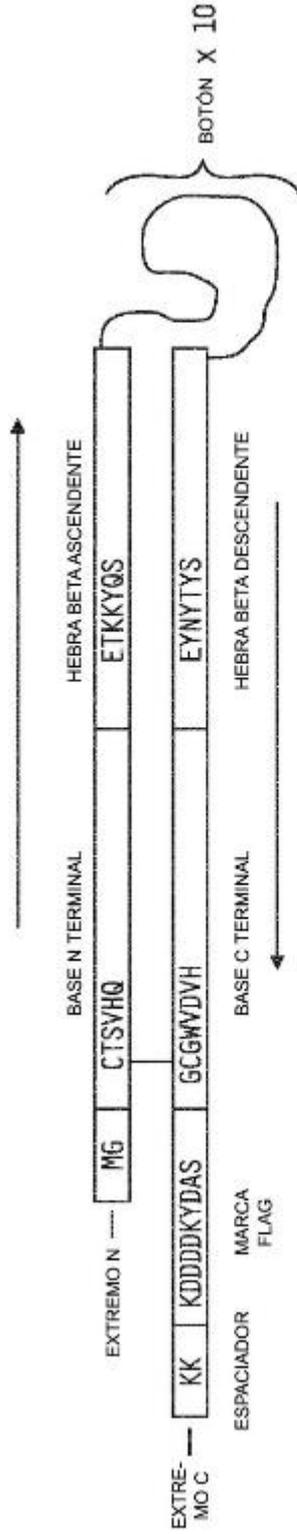


FIG. 1

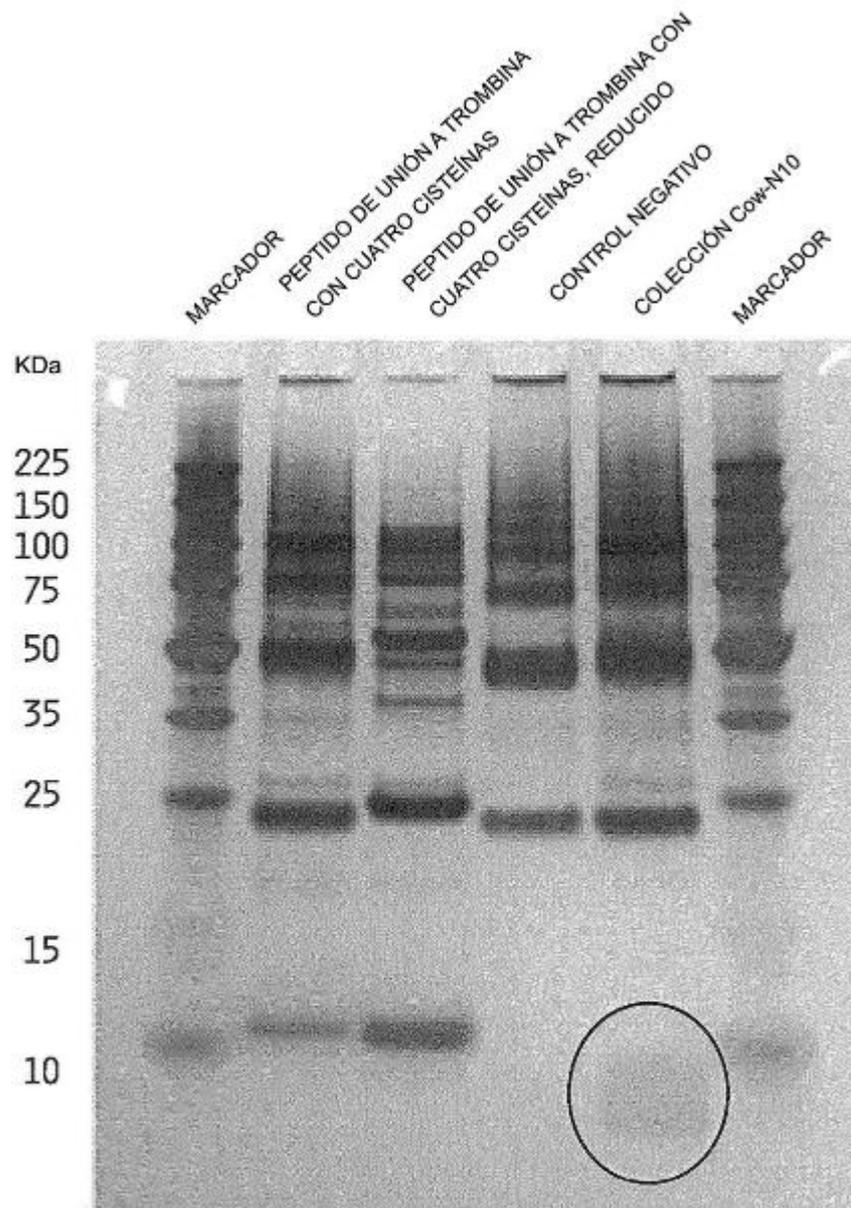
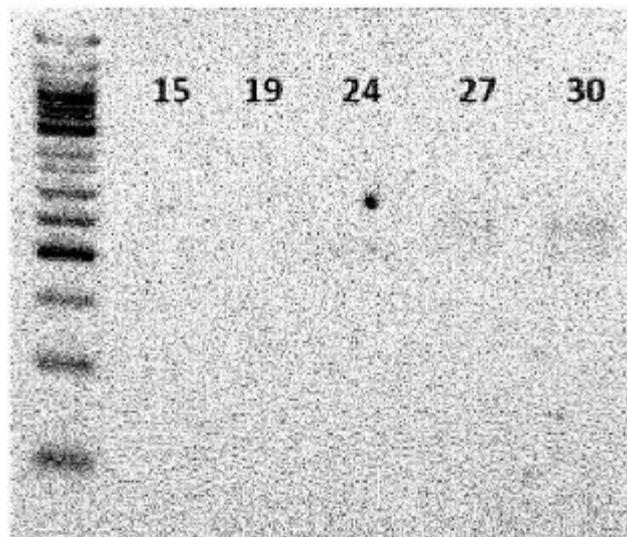


FIG. 2



TROMBINA_FLAG_cow_N10

FIG. 3

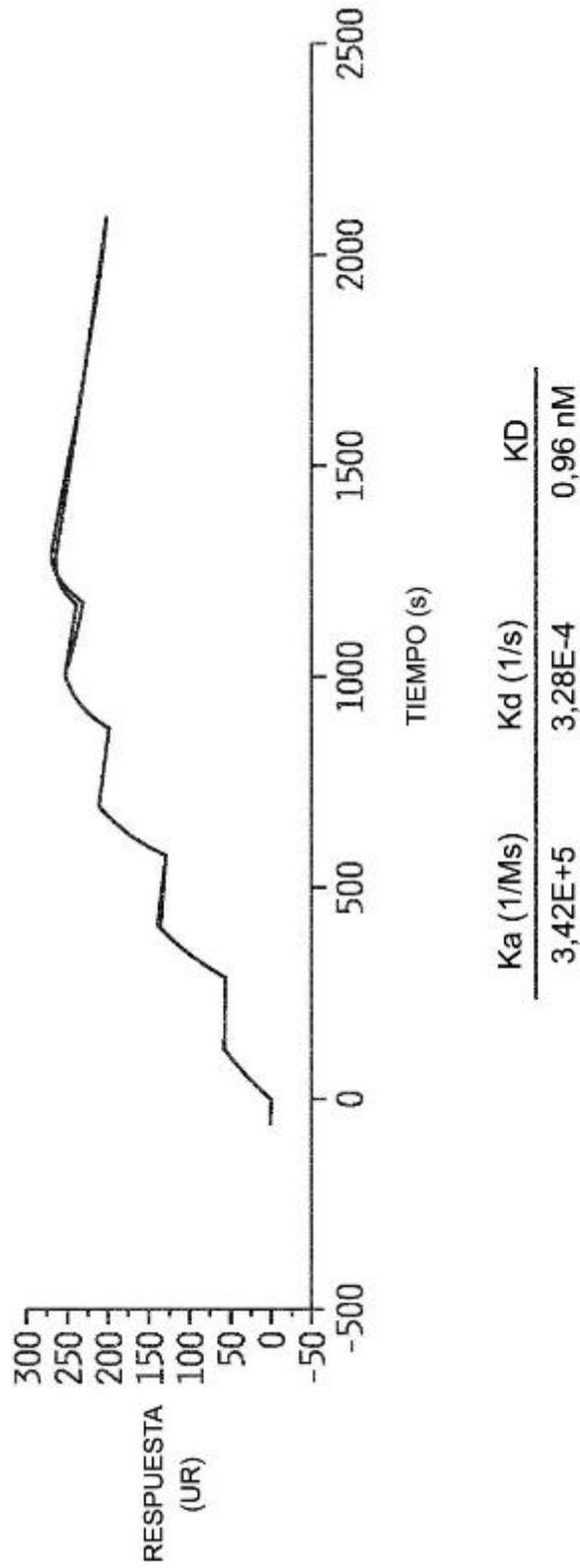


FIG. 4

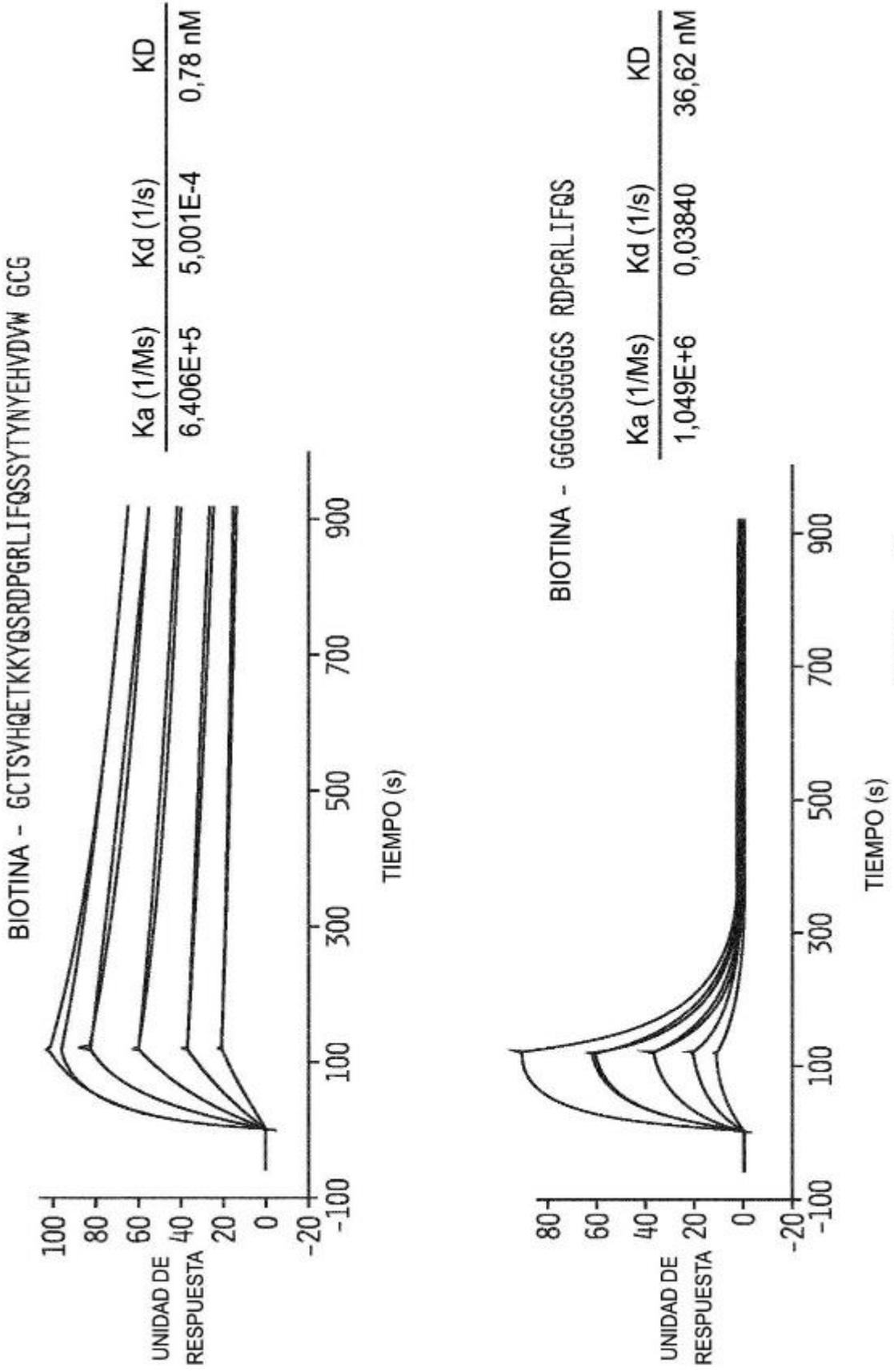


FIG. 5

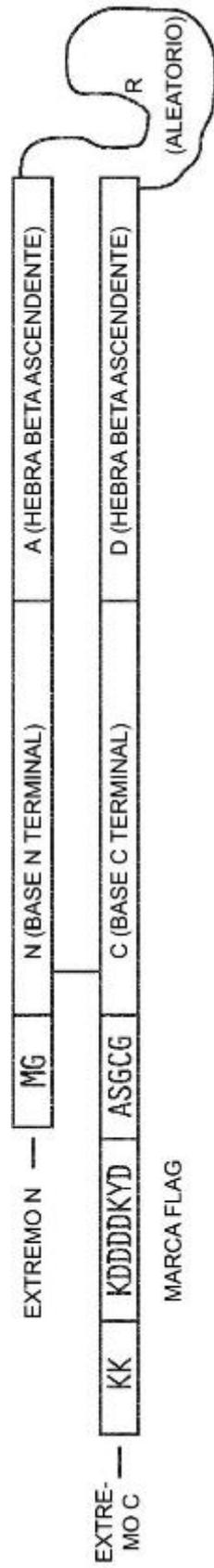


FIG. 6