



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 351 275**

51 Int. Cl.:

C12N 15/01 (2006.01)

C12P 21/00 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

C12N 15/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **99918964 .0**

96 Fecha de presentación : **07.05.1999**

97 Número de publicación de la solicitud: **1075513**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **14.02.2001**

54 Título: **Evolución *in vitro* continua.**

30 Prioridad: **08.05.1998 AU PP3445**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
02.02.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
02.02.2011

73 Titular/es: **CEPHALON AUSTRALIA (VIC) Pty. Ltd.**
Level 2, 37 Epping Road
MacQuarie Park NSW 2113, AU

72 Inventor/es: **Hudson, Peter, John;**
Iliades, Peter;
Irving, Robert, Alexander y
Coia, Gregory

74 Agente: **Justo Bailey, Mario de**

ES 2 351 275 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

Evolución *in vitro* continua.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un método para mutar y seleccionar proteínas de unión diana en un sistema de traducción; y a un constructo de polinucleótido para su uso en este método. El método de la presente invención puede aplicarse a la generación de moléculas de utilidad diagnóstica y terapéutica.

10 **Antecedentes de la invención**

La evolución *in vitro* de proteínas implica introducir mutaciones en secuencias de genes conocidas para producir una biblioteca de secuencias mutantes, traducir las secuencias para producir proteínas mutantes y entonces seleccionar proteínas mutantes con las propiedades deseadas. Este procedimiento tiene el potencial para generar proteínas con utilidades diagnósticas y terapéuticas mejoradas. Desafortunadamente, sin embargo, el potencial de este procedimiento se ha visto limitado por las deficiencias en los métodos actualmente disponibles para la mutación y la generación de bibliotecas.

Por ejemplo, ha resultado difícil la generación de grandes bibliotecas (por ejemplo, más allá de un tamaño de biblioteca de 10^{10}) de genes individuales únicos y sus proteínas codificadas con sistemas de presentación en fago debido a limitaciones en la eficiencia de transformación. Una desventaja adicional es que los métodos que utilizan los sistemas de presentación en fago (figura 1) requieren varias etapas secuenciales de mutación, amplificación, selección y mutación adicional (Irving *et al.*, 1996; Krebber *et al.*, 1995; Stemmer, 1994; Winter *et al.*, 1994).

Ejemplos de procedimientos que se han usado hasta la fecha para la maduración de la afinidad de proteínas seleccionadas, y particularmente para la maduración de la afinidad de anticuerpos, se exponen en la tabla 1. Todos estos métodos se basan en la mutación de genes seguida de la presentación y la selección de las proteínas codificadas. La mutación particular que se elige determina la diversidad en la biblioteca génica resultante. Las estrategias *in vitro* (tabla 1) se ven muy limitadas por la eficacia en la transformación de genes mutados en la formación de una biblioteca de presentación en fago. En un procedimiento cíclico *in vivo* (tabla 1 n.º 1), las células mutadoras de *E. coli* fueron el vehículo para la mutación de genes de anticuerpos recombinantes. Las células mutadoras de *E. coli* MUTD5-FIT (Irving *et al.*, 1996) que llevan un gen DNAQ mutado podrían usarse como la fuente de los extractos S-30 y por tanto permitir mutaciones introducidas en el ADN durante la replicación como resultado de errores de corrección. Sin embargo, las tasas de mutación son bajas en comparación con la tasa requerida. Por ejemplo, mutar 20 residuos con la permutación completa de 20 aminoácidos requiere un tamaño de biblioteca de 1×10^{26} , una tarea extremadamente difícil con la metodología de presentación en fago actualmente disponible.

TABLA 1

Estrategias de maduración de la afinidad

	<i>In vivo</i>	Mecanismo
45	1 Células mutadoras	Mutaciones puntuales al azar
	2 SIP-SAP	Coselección e infección con pares de anticuerpo-antígeno
50	<i>In vitro</i>	
	3 Intercambio de ADN/PCR sexual	Recombinación de secuencia recursiva mediante homología de ADN
55	4 Mutagénesis dirigida al sitio sobre regiones seleccionadas (CDR)	Mutaciones codificadas con oligonucleótidos
60	5 Transposiciones de cadena	Reemplazo secuencial de dominios de cadena pesada o ligera usando bibliotecas de fagos
	6 PCR propensa a error	Errores de replicación de la polimerasa

65 1) Irving *et al.* (1996); 2a) Krebber *et al.* (1995); 2b) Duenas y Borrebaeck (1994); 3) Stemmer (1994), Stemmer *et al.* (1995); 4) Yang *et al.* (1995); 5a) Barbas *et al.* (1994); 5b) Winter *et al.* (1994); 6) Gram *et al.* (1992).

ES 2 351 275 T3

Un método de selección que permite la producción *in vitro* de bibliotecas complejas de mutantes que están evolucionando (mutando) continuamente y a partir de las cuales puede seleccionarse el gen deseado, proporcionaría por tanto un medio mejorado de maduración (aumento) de la afinidad de proteínas.

5 *Sistemas de transcripción y traducción acopladas in vitro*

Se conoce bien que un plásmido de ADN que contiene un gen de interés puede actuar como molde para la transcripción cuando se controla mediante un elemento de control tal como el promotor T7. También se conoce que pueden usarse sistemas libres de células acoplados para transcribir ARNm y traducir el ARNm en péptidos simultáneamente (Baranov *et al.* 1993; Kudilicki *et al.* 1992; Kolosov *et al.* 1992; Morozov *et al.* 1993; Ryabova *et al.* 1989, 1994; Spirin 1990; documento US 5556769; documento US5643768; He y Taussig 1997). La fuente de sistemas libres de células generalmente ha sido extractos S-30 de *E. coli* (Mattheakis 1994; Zubay 1973) para procariotas y lisados de reticulocitos de conejo para eucariotas. También se han notificado sistemas acoplados de transcripción/traducción (documento US 5492817; documento US 5665563; documento US 5324637) que implican extractos libres de células procariotas (Mattheakis *et al.* 1994) y extractos libres de células eucariotas (documento US 5492817; documento US 5665563) que tienen diferentes requisitos para la transcripción y la traducción eficaces. Además, existen requisitos para el plegamiento correcto de las proteínas traducidas en los sistemas procariotas y eucariotas. Para procariotas, pueden requerirse disulfuro isomerasa de proteínas (PDI) y chaperonas. Generalmente en procariotas, las proteínas traducidas se pliegan tras su liberación del ribosoma; sin embargo, para el plegamiento correcto de la proteína recién traducida unida (ligada) al ribosoma también puede ser necesario un anclaje C terminal. Un anclaje es un espaciador de polipéptido que une el/los dominio(s) de proteína recién traducida al ribosoma. El anclaje puede ser un dominio de proteína completa tal como una región constante de inmunoglobulina. Completamente al contrario de esto, en los sistemas eucariotas la proteína se pliega a medida que se sintetiza y no requiere de la adición de PDI y chaperonas de procariotas. Sin embargo, un anclaje puede ser beneficioso en sistemas eucariotas para el espaciado de, y el plegamiento correcto de la proteína recién traducida unida (ligada) al ribosoma.

En la superficie de los ribosomas se han presentado polipéptidos sintetizados *de novo* en sistemas acoplados libres de células, dado que por ejemplo en ausencia de un codón de parada el polipéptido no se libera del ribosoma. Para fines de selección puede usarse el complejo de proteínas de ribosoma de ARNm. Este sistema imita el procedimiento de presentación en fago y selección y se muestra en la figura 1. Las características requeridas para la presentación óptima en ribosomas se han descrito por Hanes y Pluckthun (1997). Estas características incluyen la eliminación de codones de parada. Sin embargo, la eliminación de codones de parada da como resultado la adición de sitios sensibles a proteasa en el extremo C terminal de la proteína recién traducida codificada por una estructura de tipo ARNt de *ssrA*. Esto puede evitarse mediante la inclusión de oligonucleótidos de *ssrA* antisentido (Keiler *et al.* 1996).

35 *ARN polimerasas dirigidas por ARN*

El bacteriófago Q β es un fago de ARN con una replicasa eficaz (las ARN polimerasas dependientes de ARN se denominan replicasas o sintetisas) para replicar el genoma monocatenario de colifago Q β . La Q β replicasa es propensa a error e introduce mutaciones en el ARN calculadas *in vivo* en 10³-10⁴ bases. La fidelidad de la Q β replicasa es baja y está fuertemente sesgada para replicar su molde (Rohde *et al.* 1995). Estas enseñanzas indican que la replicación durante un periodo prolongado conduce a la acumulación de cadenas mutadas no adecuadas para la síntesis de una proteína deseada. Tanto las cadenas + como - sirven como moldes para la replicasa; sin embargo, para el genoma viral la cadena + se une mediante la Q β replicasa y se usa como el molde para la cadena complementaria (-). Con el fin que se produzca la replicación del ARN, la replicasa requiere elementos estructurales/secuencia de ARN específicos que se han definido bien (Brown y Gold 1995; Brown y Gold 1996). Una reacción que contiene 0,14 femtogramos de ARN recombinante produce 129 nanogramos en 30 minutos (Lizardi *et al.* 1988).

Se conoce que las ARN polimerasas dirigidas por ARN replican ARN de manera exponencial en moldes compatibles. Los moldes compatibles son moléculas de ARN con estructura secundaria tal como la observada en ARN MDV-1 (Nishihara, T., *et al.* 1983). Con respecto a esto, se ha descrito un vector para construir ARNm amplificables ya que éste tiene las secuencias y la estructura secundaria (ARN MDV-1) requeridas para la replicación y se replica *in vitro* de la misma manera que el ARN genómico de Q β . La secuencia de ARN MDV-1 (un molde que se produce de manera natural para la Q β replicasa) es uno de varios moldes naturales compatibles con la amplificación del ARN mediante la Q β replicasa (documento US-4786600); tiene estructuras de tipo ARNt en su extremo terminal que son similares a las estructuras que aparecen en los extremos de la mayoría de los ARN de fago que aumentan la estabilidad de las secuencias de ARNm incrustadas. La linealización del plásmido le permite actuar como un molde para la síntesis de más ARN MDV-1 recombinante. (Lizardi *et al.* 1988). Las enseñanzas en la técnica muestran que la replicación prolongada con Q β replicasa de un gen foráneo requiere que éste se incruste como ARN dentro de uno de los moldes que se producen de manera natural tales como ARN MDV-1.

Sumario de la invención

Los presentes inventores han encontrado ahora que las ARN polimerasas dirigidas por ARN introducen mutaciones en moléculas de ARNm sintetizadas durante la replicación de tal manera que se crea una biblioteca de moléculas de ARNm en evolución (mutadas). Estas moléculas de ARNm mutadas varían en tamaño debido a inserciones y deleciones así como a mutaciones puntuales y pueden traducirse *in vitro* de manera que se presentan las proteínas correspondientes, por ejemplo, en un complejo ternario que comprende ribosoma, ARNm, y proteína sintetizada *de*

ES 2 351 275 T3

5 *novo* codificada por el ARNm. Los presentes inventores también han identificado las condiciones en las que una gran proporción de proteínas generadas mediante el procedimiento de presentación en ribosoma están en una forma funcional, correctamente plegada. Además, los presentes inventores han identificado condiciones en las que la replicasa de fago Q β puede funcionar en sistemas de transcripción/traducción acopladas eucariotas para amplificar moldes de ARN, incorporando mutaciones en el ARNm.

10 Las moléculas de ARNm en el sistema de transcripción/traducción preferido de la presente invención están en un procedimiento cíclico continuo de replicación/mutación/traducción que conduce a un procedimiento de evolución *in vitro* continua (CIVE).

10 Este procedimiento de CIVE proporciona un método novedoso para la evolución *in vitro* de proteínas que evita la limitación de números, tamaño de biblioteca y etapas que requieren mucho tiempo inherentes en los procedimientos de maduración de la afinidad anteriores.

15 Por consiguiente, en un primer aspecto la presente invención proporciona un método para la mutación, síntesis y selección de una proteína que se une a una molécula diana, comprendiendo el método:

20 (a) incubar una molécula de ARNm replicable que codifica para la proteína con los precursores de ribonucleósido trifosfato de ARN y una ARN polimerasa dirigida por ARN, en el que la ARN polimerasa dirigida por ARN replica la molécula de ARNm pero introduce mutaciones generando de ese modo una población de moléculas de ARNm mutante;

25 (b) incubar las moléculas de ARNm mutante de la etapa (a) con un sistema de traducción en condiciones que den como resultado la síntesis de una población de proteínas mutantes de manera que tras la traducción, las proteínas mutantes se unan a sus moléculas de ARN codificantes formando de ese modo una población de complejos de ARNm/proteína mutante;

30 (c) seleccionar uno o más complejo(s) de ARNm/proteína mutante exponiendo la población de complejos de ARNm/proteína mutante de la etapa (b) a la molécula diana y recuperando el/los complejo(s) de ARNm/proteína mutante unido(s) a la misma; y

(d) liberar opcionalmente las moléculas de ARNm del/de los complejo(s).

35 En un segundo aspecto la presente invención proporciona un método para la mutación, síntesis y selección de una proteína que se une a una molécula diana que incluye:

40 (b) incubar las moléculas de ARNm mutante de la etapa (a) con un sistema de traducción en condiciones que dan como resultado la síntesis de una población de proteínas mutantes de manera que tras la traducción, las proteínas mutantes se unen a sus moléculas de ARNm codificantes formando de ese modo una población de complejos de ARNm/proteína mutante;

(c) seleccionar uno o más complejo(s) de ARNm/proteína mutante exponiendo la población de complejos de ARNm/proteína mutante de la etapa (b) a la molécula diana;

45 (d) repetir las etapas (a) a (c) una o más veces, en el que la molécula de ARNm usada en la etapa (a) es el ARNm obtenido de complejo(s) seleccionado(s) en la etapa (c);

(e) recuperar complejos de proteína mutante unidos a la(s) molécula(s) diana; y

50 (f) liberar o recuperar opcionalmente las moléculas de ARNm del/de los complejo(s).

El ARNm de la etapa (d) puede reciclarse a través de las etapas (a) a (c) sin purificación o aislamiento del sistema de traducción.

55 En una realización, el ARNm de la etapa (d) se recicla mediante la etapa (a) mientras que se une el ARNm al/a los complejo(s) obtenido(s) en la etapa (c). En otra realización, se libera el ARNm del/de los complejo(s) obtenido(s) en la etapa (c) antes de reciclar. Puede liberarse el ARNm de los complejos mediante cualquier mecanismo adecuado. El mecanismo puede incluir elevar la temperatura de la incubación, o cambiar la concentración de los compuestos usados para mantener los complejos intactos.

60 En el contexto de la presente invención, puede reciclarse el ARNm a través de las etapas (a) a (c) mediante etapas manuales, secuenciales. Sin embargo, en una realización preferida, se llevan a cabo las etapas (a), (b), (c) y (d) simultáneamente en un recipiente de reacción de una sola cámara o de múltiples cámaras y el reciclado se produce de manera automática dentro del recipiente.

65 En el contexto de la presente invención, puede reciclarse el ARNm a través de las etapas (a) a (c) mediante etapas manuales, secuenciales. Sin embargo, en una realización preferida, las etapas (a), (b), (c) y (d) se llevan a cabo simultáneamente en un sólo recipiente de reacción y el reciclado se produce automáticamente dentro del recipiente.

ES 2 351 275 T3

En otra realización del segundo aspecto, se aísla el ARNm de la etapa (d). El ARNm aislado puede transcribirse en ADNc. El ADNc resultante puede clonarse en un vector adecuado para la expresión de la proteína codificada.

5 Los expertos en la técnica apreciarán que puede usarse cualquier complejo adecuado para unir las proteínas traducidas a sus ARNm codificantes. Por ejemplo, el complejo puede ser una mitocondria u otro orgánulo celular adecuado para la presentación de proteínas. En una realización preferida, el complejo es un complejo ribosómico ternario intacto. El complejo ribosómico preferiblemente comprende al menos un ribosoma, al menos una molécula de ARNm y al menos un polipéptido traducido. Este complejo permite la “presentación en ribosoma” de la proteína traducida. Se conocen condiciones que son adecuadas para mantener los complejos ribosómicos ternarios intactos tras la traducción. Por ejemplo, la delección u omisión del codón de parada de la traducción del extremo 3' de la secuencia codificante da como resultado el mantenimiento de un complejo ribosómico ternario intacto. Puede añadirse esparsomicina o compuestos similares para evitar la disociación del complejo ribosómico. El mantenimiento de las concentraciones específicas de las sales de magnesio y la disminución de los niveles de GTP también pueden contribuir al mantenimiento del complejo ribosómico intacto.

Los expertos en la técnica apreciarán que realizaciones preferidas de la presente invención implican la replicación-traducción-selección acopladas en un procedimiento discontinuo de reciclado, y preferiblemente, en un procedimiento de flujo continuo (véase, por ejemplo, la figura 4). En la técnica se conocen el equipo y procedimientos de flujo continuo para traducción o transcripción-traducción y pueden adaptarse a los métodos de esta invención cambiando la composición de los materiales o condiciones tales como la temperatura en el reactor. Varios sistemas y sus métodos de funcionamiento se revisan en Spirin, A. S. (1991). Publicaciones pertinentes adicionales incluyen Spirin *et al.* (1988); Rattat *et al.* (1990); Baranov *et al.* (1989); Ryabova *et al.*, (1989); y Kigawa *et al.* (1991).

25 “Sistema de traducción” se refiere a una mezcla que comprende ribosomas, enzimas solubles, ARN de transferencia, y un sistema que regenera energía que puede sintetizar proteínas codificadas por moléculas de ARNm exógeno.

En una realización preferida, el sistema de traducción es un sistema de traducción libre de células. La traducción según esta realización no se limita a ningún sistema de traducción libre de células particular. El sistema puede derivarse de un eucariota, procariota o una combinación de los mismos. Puede usarse un extracto bruto, un extracto parcialmente purificado o un extracto altamente purificado. Pueden sustituirse componentes sintéticos por componentes naturales. Están disponibles numerosas alternativas y se describen en la bibliografía. Véase por ejemplo, Spirin (1990b). Los sistemas de traducción libres de células también están comercialmente disponibles. En una realización de la presente invención, el sistema de traducción libre de células utiliza un extracto S-30 de *Escherichia coli*. En otra realización, el sistema de traducción libre de células utiliza un lisado de reticulocitos, preferiblemente un lisado de reticulocitos de conejo.

El sistema de traducción también puede comprender compuestos que mejoran el plegamiento de proteínas. Para este fin, los presentes inventores han identificado las condiciones en las que se genera un aumento de la proporción de proteínas producidas mediante el procedimiento de presentación en ribosoma de una forma plegada, funcional. Estas condiciones incluyen la adición de glutatión reducido y/u oxidado al sistema de traducción a una concentración de entre 0,1 mM y 10 mM. Preferiblemente, el sistema de traducción comprende glutatión oxidado a una concentración de entre 2 mM y 5 mM. Preferiblemente, el sistema de traducción comprende glutatión oxidado a una concentración de aproximadamente 2 mM y glutatión reducido a una concentración de entre 0,5 mM y 5 mM.

En otra realización de la presente invención el sistema de traducción consiste en o comprende una célula o compartimento dentro de una célula. La célula puede derivarse de un eucariota o un procariota.

Se han aislado varias ARN polimerasas dirigidas por ARN (conocidas de otro modo como replicasas o ARN sintetasas) conocidas en la técnica y son adecuadas para su uso en el método de la presente invención. Ejemplos de éstas incluyen ARN polimerasas de bacteriófago, ARN polimerasas de virus de plantas y ARN polimerasas de virus de animales. En una realización preferida de la presente invención, la ARN polimerasa dirigida por ARN introduce mutaciones en la molécula de ARN replicada a una frecuencia relativamente alta, preferiblemente a una frecuencia de al menos una mutación en 10^4 bases, más preferiblemente una mutación en 10^3 bases. En una realización más preferida, la ARN polimerasa dirigida por ARN se selecciona del grupo que consisten en $Q\beta$ replicasa, RdRp de Hepatitis C, RdRp de virus de estomatitis vesicular, replicasa del virus del mosaico amarillo del nabo (Deiman *et al.* (1997) y ARN dependiente de ARN de bacteriófago phi 6 de ARN (Ojala y Bamford (1995)). De la manera más preferible, la ARN polimerasa dirigida por ARN es $Q\beta$ replicasa.

Puede incluirse la ARN polimerasa dirigida por ARN en el sistema de transcripción/traducción como una proteína purificada. Alternativamente, puede incluirse la ARN polimerasa dirigida por ARN en forma de un molde génico que se expresa simultáneamente con la etapa (a), o simultáneamente con las etapas (a), (b) y (c) de los métodos de los aspectos primero o segundo de la presente invención.

En una realización preferida adicional, la ARN polimerasa dirigida por ARN puede fusionarse con o asociarse con la molécula diana. Sin querer restringirse a la teoría, se prevé que en algunos casos, la afinidad de unión de la proteína traducida puede ser mayor que la afinidad de la replicasa por la molécula de ARNm. La unión del complejo de ARNm/proteína mutante a una constructo de fusión de molécula diana/ARN polimerasa dirigida por ARN llevaría el

ES 2 351 275 T3

ARNm hacia las proximidades de la ARN polimerasa dirigida por ARN. Esto puede dar como resultado la replicación y la mutación adicional preferencial de las moléculas de ARNm de interés.

5 En la técnica se conocen moldes de ARN que se replican por diversas ARN polimerasas dependientes de ARN y pueden servir como vectores para producir ARNm replicables adecuados para su uso en la presente invención. Los moldes conocidos para Q β replicasa incluyen ARN RQ135, ARN MDV-1, ARN microvariante, ARN nanovariantes, CT-ARN y ARN RQ120. No se prefiere el ARN Q β , que también se replica por la Q β replicasa, porque tiene cistrones, y además porque los productos de estos cistrones regulan la síntesis de proteínas. Los vectores preferidos incluyen ARN MDV-1 y ARN RQ135. Están publicadas las secuencias de los dos. Véase Kramer *et al.* (1978) (ARN MDV-1) y Munishkin *et al.* (1991) J (RQ135), en el presente documento. Pueden prepararse en forma de ADN mediante técnicas de síntesis de ADN bien conocidas.

15 En una realización preferida del primer aspecto de la presente invención, el método incluye además la etapa de transcribir un constructo de ADN para producir ARNm replicable. El ADN que codifica para el ARNm recombinante puede estar, pero no es necesario que esté, en forma de un plásmido. Es preferible usar un plásmido y una endonucleasa que escinda el plásmido en o cerca del extremo de la secuencia que codifica el ARN replicable en el que se incrusta la secuencia génica. Puede realizarse la linealización por separado o puede acoplarse con la transcripción-replicación-traducción. Sin embargo, preferiblemente, se genera ADN lineal mediante una cualquiera de las muchas reacciones de replicación de ADN disponibles y de la manera más preferible mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para algunos sistemas, pueden preferirse plásmidos no linealizados sin endonucleasa. Pueden prepararse plásmidos adecuados, por ejemplo, siguiendo las enseñanzas de Melton *et al.* (1984a, b) en cuanto a procedimientos para generar ARN mediante transcripción *in vitro* de plásmidos recombinantes mediante ARN polimerasas de bacteriófago, tales como ARN polimerasa de T7 o ARN polimerasa de SP6. Véase, por ejemplo, Melton *et al.* (1984a) y Melton (1984b). Se prefiere que la transcripción comience con el primer nucleótido de la secuencia que codifica para el ARN replicable.

25 En una realización preferida adicional, la transcripción se lleva a cabo simultáneamente en un recipiente de reacción de una sola cámara o de múltiples cámaras, o reactor, con las etapas (a), (b), (c) del método según los aspectos primero o segundo de la presente invención.

30 La molécula diana puede ser cualquier compuesto de interés (o una parte del mismo) tal como una molécula de ADN, una proteína, un receptor, una molécula de superficie celular, un metabolito, un anticuerpo, una hormona, una bacteria o un virus.

35 En una realización preferida, la molécula diana se une a una matriz y se añade a la mezcla de reacción que comprende el complejo (que presenta proteínas traducidas). La molécula diana puede recubrirse, por ejemplo, en una matriz tal como perlas magnéticas. Las perlas magnéticas pueden ser Dynabeads. Se apreciará que las proteínas traducidas se unirán de manera competitiva a la molécula diana. Las proteínas con mayor afinidad preferiblemente desplazarán a las moléculas de menor afinidad. Por tanto, el método de la presente invención permite seleccionar proteínas mutantes que muestran afinidades de unión mejoradas por una molécula diana de interés.

40 Los presentes inventores también han realizado los hallazgos sorprendentes de que las secuencias mínimas derivadas de los moldes de replicasa que se producen de manera natural, tales como el molde de MDV-1, son suficientes para la unión de la Q β replicasa. Basándose en este hallazgo, se ha desarrollado un constructo novedoso adecuado para la transcripción de ARNm replicable.

45 Por consiguiente, en una realización preferida de los aspectos primero o segundo de la presente invención, el método incluye además transcribir un constructo de ADN para producir una molécula de ARNm replicable, en la que el constructo de ADN comprende:

50 (i) una región no traducida que comprende un elemento de control que promueve la transcripción del ADN en ARNm y un sitio de unión a ribosoma;

55 (ii) un marco de lectura abierto que codifica para la proteína que se une a la molécula diana; y

(iii) una estructura de horquilla en el sentido de 5' del marco de lectura abierto.

En un tercer aspecto, la presente invención proporciona un constructo de ADN que comprende:

60 (i) una región no traducida que comprende un elemento de control que promueve la transcripción del ADN en ARNm y un sitio de unión a ribosoma;

(ii) un sitio de clonación ubicado en el sentido de 3' de la región no traducida; y

65 (iii) una secuencia de unión a replicasa ubicada en el sentido de 5' del sitio de clonación.

Cuando se usa en el presente documento la frase "secuencia de unión a replicasa" se refiere a una secuencia de polinucleótido que es una estructura secundaria de "tipo bucle" que se reconoce por una replicasa (en particular, una

ES 2 351 275 T3

holoenzima replicasa). Preferiblemente, la secuencia de unión a replicasa no incluye un molde de ARN de longitud completa para una molécula de replicasa. Por ejemplo, preferiblemente la frase “secuencia de unión a replicasa” no incluye moldes de ARN MDV-1 o de ARN RQ135 de longitud completa.

5 En una realización preferida, la secuencia de unión a replicasa tiene una longitud de entre 15 y 50 nucleótidos, más preferiblemente una longitud de entre 20 y 40 nucleótidos. Preferiblemente, la secuencia de unión a replicasa se reconoce por la Q β replicasa.

10 En una realización preferida adicional, la secuencia de la secuencia de unión a replicasa comprende o consiste en la secuencia:

GGGACACGAAAGCCCCAGGAACCUUUCG

15 En una realización preferida adicional, se incluye una segunda secuencia de unión a replicasa en el sentido de 3' del sitio de clonación.

20 Puede usarse cualquier sitio de unión a ribosoma adecuado en el constructo de la presente invención. Pueden incorporarse secuencias de unión a ribosoma procariontas y eucariotas dependiendo de si se están usando sistemas procariontas o eucariotas. Un sitio de unión a ribosoma procarionta preferido es el del virus MS2.

En una realización preferida adicional, el constructo de ADN incluye una secuencia de iniciación de la traducción. Preferiblemente, la secuencia de iniciación de la traducción es ATG.

25 Será evidente para los expertos en la técnica que puede insertarse cualquier gen de interés en el sitio de clonación en el constructo de ADN. En una realización preferida, el/los gen(es) de interés es/son una secuencia de nucleótidos que codifica para (i) una biblioteca de proteínas de unión diana o (ii) una única proteína de unión diana, en la que la diana puede incluir cualquiera de proteína, ADN, moléculas de superficie celular, receptores, anticuerpos, hormonas, virus u otras moléculas o complejos o derivados de los mismos.

30 Una secuencia de nucleótidos que codifica para un dominio de anclaje puede fusionarse en 3' en marco con el gen de interés. El dominio de anclaje puede ser cualquier secuencia de polipéptido que sea suficientemente larga para separar la proteína traducida del gen de interés una distancia suficiente del ribosoma para permitir el plegamiento correcto de la molécula y la accesibilidad a su componente de unión afín. Preferiblemente, el polipéptido tiene una estructura secundaria de ARN correspondiente que imita la de un molde de replicasa. En una realización preferida, el polipéptido es un dominio constante de inmunoglobulina. Preferiblemente, el polipéptido es un dominio ligero constante. El dominio ligero constante puede ser la primera región ligera constante del anticuerpo de ratón 1C3. Preferiblemente, el dominio constante se codifica por la secuencia mostrada en la figura 5a. Alternativamente, el polipéptido puede ser el dominio constante de IgM humana. En otra realización, el anclaje puede seleccionarse del grupo que consiste en: el epítipo “FLAG” octapeptídico, DYKDDDDK o una etiqueta de polihistidina β seguida opcionalmente de una secuencia de nucleótidos de terminación (parada) de la traducción. La secuencia de nucleótidos de terminación (parada) de la traducción puede ser TAA o TAG. En algunos constructos de la presente invención, no están presentes codones de parada de modo que se evita el reconocimiento por factores de liberación y posterior liberación de proteínas. En estos constructos, puede añadirse la secuencia de oligonucleótidos ssrA antisentido para evitar la adición de un sitio de proteasa C terminal en la región no traducida en 3' que sigue.

45 En un cuarto aspecto, la presente invención proporciona un kit para generar un transcrito de ARNm replicable que incluye un constructo de ADN según el segundo aspecto de la presente invención.

50 En una realización preferida, el kit incluye al menos otro componente adicional seleccionado de

(i) una ARN polimerasa dirigida por ARN, preferiblemente Q β replicasa, o un molde de ADN o ARN para una ARN polimerasa dirigida por ARN;

55 (ii) un sistema de traducción libre de células;

(iii) una ARN polimerasa dirigida por ADN, preferiblemente una polimerasa de bacteriófago;

60 (iv) ribonucleósidos trifosfato; y

(v) enzimas de restricción.

65 A lo largo de esta memoria descriptiva, a menos que el contexto requiera lo contrario, se entenderá que la palabra “comprender” o variaciones tales como “comprende” o “que comprende”, implican la inclusión de un elemento o número entero o grupo de elementos o números enteros indicados pero no la exclusión de ningún otro elemento o número entero o grupo de elementos o números enteros.

Breve descripción de las figuras

Figura 1: Ciclo de maduración de la afinidad para a) presentación en fago y b) presentación en ribosoma en el procedimiento de evolución *in vitro* continua (CIVE).

Figura 2: Representación esquemática de una unidad de expresión que contiene un gen de interés (secuencia de nucleótidos) para CIVE. La unidad de expresión comprende un gen de interés con sitio de unión a ribosoma en el sentido de 5' (RBS) y sitio de iniciación de la traducción (ATG) junto con una secuencia de iniciación de la transcripción (promotor T7). El constructo también comprende una secuencia espaciadora en el sentido de 3'.

Figura 3: Representación esquemática del método de CIVE que muestra la naturaleza de ciclado continuo de la maduración de la afinidad *in vitro*. El método permite la producción *in vitro* de bibliotecas complejas de mutantes que están evolucionando (mutando) continuamente y de las que puede seleccionarse un gen deseado: las moléculas de ARNm en el sistema de transcripción/traducción preferido de la presente invención están en un proceso cíclico continuo de replicación/mutación/traducción que conduce a la evolución *in vitro* continua (CIVE).

Figura 4: Representación de un recipiente de reacción adecuado para el procedimiento de CIVE.

Figura 5: Secuencias de nucleótidos de: a) la primera región ligera constante del anticuerpo monoclonal de ratón 1C3; b) la tercera región pesada constante del anticuerpo IgM humano; c) el scFv anti-glicoforina (1C3); d) el scFv anti-antígeno de superficie de hepatitis B (4C2).

Figura 6: Secuencia de ADN del plásmido pBRT7Qbeta que contiene una copia de ADNc del genoma del bacteriófago Q β .

Figura 7: Representación esquemática de los plásmidos (a) pGC038CL (que contiene el scFv anti-glicoforina (1C3) y la región ligera constante de ratón) y (b) pGC_CH (que contiene la región pesada constante humana), que se usaron para la síntesis por PCR del molde usado para la transcripción y traducción *in vitro*. Se usaron estos plásmidos para suministrar secuencias espaciadoras en el sentido de 3'. En la mayoría de los casos, se clonaron los genes de interés en los sitios *Sfi*I y *Not*I de pGC_CH.

Figura 8: Secuencias de fragmentos de ARN que forman estructuras de horquilla.

Figura 9: Vector de expresión eucariota pcDNA3.1 para la expresión de la Q β replicasa o la ARN polimerasa dependiente de ARN del virus de la hepatitis C en el sistema de transcripción/traducción acopladas de reticulocitos de conejo.

Figura 10: Secuencia de ADN de la ARN polimerasa dependiente de ARN del virus de la hepatitis C.

Figura 11: Secuencias de ADN de oligonucleótidos usados como cebadores en reacciones de PCR para generar ADN molde para las reacciones de transcripción/traducción acopladas *in vitro*. Secuencias de nucleótidos de oligonucleótidos usados tanto para la generación de moldes como para la recuperación de productos tras la inmunoselección. Las secuencias se enumeran y se escriben de 5' a 3'.

Figura 12: Expresión de la Q β replicasa en el sistema de transcripción/traducción acopladas de reticulocitos de conejo.

Figura 13: Efecto de la Q β replicasa sobre la transcripción/traducción acoplada de la síntesis de proteína anti-GlyA 1C3.

Figura 14: Efecto de incluir Q β replicasa en la traducción y transcripción acopladas; tabla de mutaciones en las secuencias de mutantes seleccionados. Esta figura muestra las posiciones y el tipo de mutaciones encontrados en 280 nucleótidos de la secuencia de 6 clones al azar. Estos se ha recuperado de inmunoselecciones del scFv anti-GlyA frente a las Dynabeads recubiertas con GlyA tras la transcripción y traducción o bien en ausencia de Q β replicasa, en presencia de Q β replicasa purificada o bien en presencia de pCDNAQ β . En la columna "mutación encontrada"; "ninguna" significa que no se encontraron mutaciones; las mutaciones se muestran en la forma de Ax β B en la que A es el nucleótido de tipo natural, x es el número de posición dentro de la secuencia (tal como se muestra en la figura 5c) y B es el nucleótido mutado observado.

Figura 15: Replicación de transcritos de scFv anti-glicoforina mediante Q β replicasa en el sistema de reticulocitos de conejo de transcripción/traducción acopladas: exploración con densitómetro.

Figura 16: Análisis de secuencia de ADN de replicación y mutación de scFv anti-glicoforina y scFv anti-hepatitis B mediante Q β replicasa de transcritos de T7 polimerasa.

Figura 17: Vector que contiene la ARN polimerasa dependiente de ARN de hepatitis C.

Figura 18: Efecto de ARN polimerasa dependiente de ARN de hepatitis C expresada en el sistema de transcripción/traducción acopladas sobre la replicación de ARN de scFv anti-GlyA 1C3, electroforesis en gel de agarosa de los productos de RT-PCR teñidos con bromuro de etidio y explorados.

5 Descripción detallada de realizaciones preferidas de la invención

En un aspecto preferido de la presente invención, el sistema para la evolución de una etapa continua de proteínas comprende los siguientes componentes:

10 *La unidad de expresión*

Una unidad de expresión preferida para su uso en la presente invención se representa en la figura 2. Esta unidad de expresión comprende regiones no traducidas en 3' y 5' con un elemento de control en la región no traducida en 5' tal como el promotor T7 o SP6 para promover la transcripción del ADN en ARNm. Las secuencias de ADN consenso son específicas de sus polimerasas; la secuencia de promotor T7 para las ARN polimerasa de T7 es: TAATACGACT CACTATAGGGAGA. La secuencia de promotor T7 puede actuar como una secuencia de unión a ARN polimerasa dependiente de ARN (es decir, puede actuar como una secuencia de unión para Q β replicasa). Preferiblemente, sin embargo, el constructo incluye una estructura de horquilla para la unión de la Q β replicasa, ubicada en la región no traducida en 5', en el sentido de 3' con respecto al sitio promotor. Preferiblemente, se incluye una segunda estructura de horquilla en el sentido de 3' de la secuencia codificante, preferiblemente aproximadamente 1 kb en el sentido de 3' del sitio de terminación de la traducción de la unidad de expresión. La secuencia preferida de la estructura de horquilla es: GGGACACGAAAGCCCCAGGAACCUUCG.

El sitio de unión a ribosoma es la siguiente región en el sentido de 3' del promotor. Cualquiera de varias uniones a ribosoma se usa en esta posición. Pueden incorporarse secuencias de unión a ribosoma procariota y eucariota dependiendo de si se está usando un sistema acoplado eucariota o procariota. Un sitio de unión procariota preferido es el del virus MS2. Preferiblemente se usa la secuencia de iniciación de la traducción ATG y codifica para el aminoácido metionina; es decir el inicio de la traducción *in vitro*.

30 *El gen (secuencia de nucleótidos) de interés*

Será evidente para los expertos en la técnica que el gen de interés puede unirse a las regiones no traducidas mediante cualquiera de las técnicas genéticas convencionales. El gen de interés puede incluir cualquier secuencia de nucleótidos con un marco de lectura abierto (sin codones de parada) hasta el extremo 3' del gen y para los fines de esta invención el extremo de la secuencia de anclaje (de espaciado).

En una realización preferida, el/los gen(es) de interés es una secuencia de nucleótidos que codifica para i) una biblioteca de proteínas de unión diana o ii) una única proteína de unión diana, en la que la diana puede incluir cualquiera de proteína, ADN, moléculas de superficie celular, receptores, anticuerpos, hormonas, virus, u otras moléculas o complejos o derivados de los mismos. Una secuencia de nucleótidos que codifica para un dominio de anclaje puede fusionarse en 3' y en marco con el gen de interés. El dominio de anclaje puede ser cualquiera de una serie de secuencias de polipéptidos suficientemente largas para separar la proteína traducida del gen de interés, una distancia suficiente del ribosoma para permitir el plegamiento correcto de la molécula y la accesibilidad de su componente de unión afín. En una realización preferida, el anclaje es la secuencia que codifica para el epítipo "FLAG" octapeptídico: DYKDDDDK o cualquiera de los dominios constantes de anticuerpo humano o murino. Preferiblemente, el anclaje es el dominio constante de un anticuerpo monoclonal de ratón, tal como el dominio constante 1C3 (véase la figura 5a). Un anclaje preferido adicional es la región constante de un anticuerpo IgM humano (véase la figura 5b).

La secuencia de anclaje puede ir seguida de una secuencia de nucleótidos de terminación (parada) de la traducción por ejemplo TAA o TAG. Sin embargo, en algunas construcciones se podría prever que no deberían estar presentes codones de parada para evitar el reconocimiento por factores de liberación y posterior liberación de la proteína. En éstas, se añade la secuencia de oligonucleótido ssrA antisentido para evitar la adición de un sitio de proteasa C terminal en la región no traducida en 3' que sigue. La adición de esparsomicina, otros compuestos similares o una reducción en la temperatura también evita la liberación del ribosoma del ARNm y la proteína sintetizada *de novo*.

55 *El sistema de expresión*

Puede lograrse la transcripción/replicación/mutación para la unidad de expresión mediante el uso de un sistema de lisado de reticulocitos de conejo (He y Taussig, 1997) o una mezcla de transcripción-traducción de S-30 de *E. coli* (Mattheakis *et al.*, 1994; Zubay, 1973). Por ejemplo, una unidad de expresión de ADN (detallado anteriormente) con un promotor T7 se trata con ARN polimerasa de T7 según las instrucciones del fabricante. La biblioteca de ARN resultante refleja la diversidad de los genes codificados. Para la replicación o mutación pueden suministrarse ARN polimerasas dependientes de ARN o bien como enzima purificada o bien alternativamente codificadas como una unidad de expresión distinta en un plásmido bajo el control de un promotor tal como T7 o SP6. La enzima preferida es Q β replicasa aunque puede usarse cualquier enzima con características similares. Esta etapa proporciona el aumento en complejidad de la biblioteca mediante mutación mediante la Q β replicasa. Para la síntesis de ARNm en células eucariotas, preferiblemente se ocupan los extremos del ARNm lo que se consigue añadiendo un exceso de diguanosina trifosfato; sin embargo, el sistema de reticulocitos de conejo de los proveedores comerciales Pro-

mega y Novagen tiene componentes en el sistema que hacen innecesaria la adición de compuestos de ocupación de extremos. Puede extraerse la mezcla de transcripción/traducción o sistema acoplado de cualquier célula, las más comúnmente usadas son germen de trigo, células de mamífero tales como células HeLa, *E. coli* y reticulocitos de conejo. Puede extraerse el sistema de transcripción-traducción acopladas de células mutadoras de *E. coli* MUTD5-FIT (Irving *et al.*, 1996) que llevan un gen DNAQ mutado y por tanto permiten mutaciones al azar adicionales introducidas en el ADN durante la replicación como resultado de errores de corrección. Una mezcla de transcripción/traducción preferida es el lisado de reticulocitos de conejo. La adición de GSSG al sistema acoplado mejora el plegamiento correcto de las proteínas presentadas y por tanto mejora la unión y selección posteriores a los contrarceptores o antígenos.

10 *Mutación mediante Q β replicasa*

En el sistema se incluye la Q β replicasa para la replicación y producción de altos niveles de ARNm que incorpora mutaciones al azar (véase la figura 3). Múltiples copias de un molde de ARN monocatenario se replican con mutaciones, mediante la Q β replicasa, en su complemento monocatenario; sin embargo, ambas cadenas son igualmente eficaces como molde en condiciones isotérmicas.

Las enseñanzas en la técnica indican que las estructuras secundaria y terciaria complejas y estables presentes en el ARN de longitud completa de fagos tales como Q β , limitan el acceso de los ribosomas a los sitios de iniciación de la proteína. Sin embargo, se ha encontrado que secuencias de ARN más pequeñas son adecuadas para la unión de replicasas y por tanto pueden usarse en vez de moldes de longitud completa. Las secuencias preferidas son secuencias de ARN sintéticas pequeñas conocidas como pseudonudos (Brown y Gold 1995; 1996) que son compatibles con la amplificación mediante Q β replicasa. En el contexto de la presente invención, el uso de pseudonudos puede vencer los problemas de acceso de los ribosomas a los sitios de iniciación de la proteína mientras que se mantienen los sitios de unión necesarios y suficientes para la amplificación mediante Q β replicasa del ARN y las secuencias fusionadas al mismo.

Traducción y presentación en ribosoma

Se conocen varios métodos de traducción *in vitro* que pueden ser o bien eucariotas tales como lisado de reticulocitos de conejo y germen de trigo, o bien procariota tales como *E. coli*. Éstos están comercialmente disponibles o pueden generarse mediante métodos publicados bien conocidos. La traducción de los ARNm mutados produce una biblioteca de moléculas de proteína, preferiblemente unidas al ribosoma en un complejo de ribosoma ternario que incluye el ARNm específico codificante para la proteína sintetizada *de novo* (Mattheakis *et al.*, 1994). Se conocen varios métodos para evitar la disociación del ARNm de la proteína y el ribosoma. Por ejemplo, pueden añadirse espar-somicina o compuestos similares; la espar-somicina inhibe la peptidil transferasa en todos los organismos estudiados y puede actuar mediante la formación de un complejo inerte con el ribosoma (Ghee *et al.*, 1996). El mantenimiento de altas concentraciones de sales de magnesio y la disminución de los niveles de GTP también puede contribuir al mantenimiento del complejo ribosoma/ARNm/proteína; en conjunto con la estructura de la unidad de expresión detallada anteriormente. Un medio preferido para mantener el complejo de ribosoma ternario es la omisión del codón de parada de la traducción en el extremo de la secuencia codificante.

Además, existen requisitos preferidos para el plegamiento correcto de las moléculas en los dos sistemas. Para procariotas, puede usarse disulfuro isomerasa de proteínas (PDI) y chaperonas así como un dominio de anclaje C terminal para garantizar el plegamiento correcto. El último se requiere a medida que proteínas procariotas se liberan de los ribosomas antes del plegamiento (Ryabova *et al.*, 1997) y por tanto en situaciones en las que se ancla el péptido al ribosoma toda la proteína necesita separarse del ribosoma. A diferencia de esto, en los sistemas eucariotas la proteína se pliega a medida que se sintetiza y no requiere que se añada el PDI y las chaperonas de procariotas; sin embargo, se ha encontrado que la adición de un intervalo específico de concentraciones de GSSG es beneficioso para la selección de la biblioteca mediante la presentación mejorada de las proteínas plegadas correctamente en los complejos de ribosoma ternarios.

Selección y unión competitiva

Rondas sucesivas de replicación de ARN producen bibliotecas de moléculas de ARN cuya traducción producen bibliotecas de proteínas. Puede añadirse una matriz unida a la molécula diana (por ejemplo Dynabeads recubiertas de antígeno) a la reacción para capturar complejos de ribosoma ternarios. Los miembros individuales en la biblioteca compiten por el antígeno inmovilizado en la matriz (Dynabeads). Las moléculas con una mayor afinidad desplazarán las moléculas con menor afinidad. A la finalización del procedimiento, pueden recuperarse los complejos [ARNm/ribosomas/proteína] unidos a la matriz (Dynabeads), puede sintetizarse ADNc a partir de ARNm en el complejo y clonarse en un vector adecuado para la expresión de alto nivel de la secuencia génica codificada.

Puede aplicarse un sistema de flujo de reciclado (Spirin *et al.*, 1988) a este sistema de evolución *in vitro* continua (CIVE) usando una cámara con termostato para garantizar el suministro de sustratos (incluyendo ribosomas) y reactivos y la eliminación de productos no esenciales. Todos los procedimientos de CIVE pueden tener lugar dentro de esta cámara incluyendo: transcripción y traducción acopladas, replicación mutante, presentación de la proteína sintetizada *de novo* en la superficie del complejos de ribosoma ternario y unión competitiva de las proteínas presentadas en el

complejo de ribosoma ternario al antígeno para seleccionarlos con la mayor unión de afinidad (figura 4). Se eliminan mediante lavado los reactivos, los productos y las proteínas presentadas no unidos con tampón de lavado y se disocian los complejos de ribosoma ternarios unidos aumentando la temperatura y omitiendo el magnesio del tampón. Esto va seguido de la adición de todos los reactivos necesarios para llevar a cabo todas las etapas anteriores excepto las etapas con tampón de lavado. Están disponibles métodos para evitar la disociación del ARNm de la proteína y el ribosoma tales como la adición de esparsomicina o compuestos similares, el mantenimiento de concentraciones específicas de sales de magnesio y la disminución de los niveles de GTP también pueden contribuir al mantenimiento del complejo ribosoma/ARNm/proteína así como la reducción de la temperatura de reacción u la omisión de los codones de parada de la traducción. Usando recipientes, cuyas temperaturas se controlan, combinados con una capacidad de flujo continua, los ARNm de ribosomas seleccionados pueden disociarse de los ribosomas y además replicarse, mutarse y traducirse a medida que se varía la concentración de reactivos importantes para el mantenimiento del complejo ribosoma/ARNm/proteína tales como esparsomicina, Mg, etc. La figura 4 representa el diseño de un dispositivo de este tipo.

La presente invención se describirá ahora más detalladamente con referencia a los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplo 1

Q β replicasa recombinante: Expresión y purificación

Clonación y expresión

Se amplificó la secuencia codificante de *Q β replicasa* mediante PCR del plásmido pBRT7*Q β* , una construcción basada en pBR322 (descrita de manera resumida en Barrera *et al.*, 1993) que se diseñó para permitir la preparación de ARN infeccioso mediante transcripción usando ARN polimerasa de T7 *in vitro*; siendo una copia de ADNc del genoma de ARN del fago *Q β* . En la figura 6 se muestra la secuencia de pBRT7*Q β* . El nucleótido n.º 1 es el primer nucleótido de la cadena codificante de *Q β replicasa*. En la figura 11 se muestran los oligonucleótidos usados como cebadores para amplificar los sitios codificados de *Q β replicasa* para la digestión con enzimas de restricción con las enzimas *EcoRI* y *NotI* y las secuencias.

Se purificaron los productos de PCR usando uno cualquiera de los productos comerciales disponibles para este fin (por ejemplo Bresatec). Se clonó el ADN purificado en los sitios *EcoRI* y *NotI* del vector pGC (figura 7a) usando técnicas de biología molecular convencionales. En la bibliografía se han descrito el vector pGC y la expresión de proteína recombinante a partir del mismo (Coia *et al.*, 1996). Los expertos en la técnica conocerán el procedimiento de la amplificación por PCR y la clonación del gen de *Q β replicasa* en vectores y la transformación en *E. coli* para la expresión de la enzima al igual que la expresión del gen de *Q β replicasa* en pGC que se indujo añadiendo isopropiltiogalactósido (IPTG) 1 mM al medio de cultivo.

Se realizó la expresión y la purificación del gen de *Q β replicasa* en el vector basado en pBR322 con el promotor PL tal como se detalla a continuación. Se suministró la cepa repl4 Billeter por Christof Biebricher, Max Planck, Gottingen. Se hizo crecer la cepa de *E. coli* en un fermentador de 20 l en caldo nutritivo al 2%, extracto de levadura al 1,5%, NaCl al 0,5%, glicerol al 0,4%, ampicilina 100 mg/l con buena aireación a 30°C hasta una densidad óptica de 2 (660 nM). Tras elevar la temperatura a 37°C, se continuó la aireación durante 5 h. Se enfriaron las células en hielo y se recogieron mediante centrifugación (proporcionando aproximadamente 180 g de masa celular húmeda).

Purificación de Q β replicasa

Tampón A: tampón Tris.HCl 0,05 M (pH 7,8), mercaptoetanol 1 mM, glicerol al 20% v/v, ampicilina 100 mg/l.

Tampón B: tampón HEPES.Na 0,05 M (pH 7,0), mercaptoetanol 1 mM, glicerol al 20% v/v.

Se homogeneizaron 50 g de *E. coli* recogida con 100 ml de tampón Tris.HCl 0,05 M (pH 8,7), mercaptoetanol 1 mM, en una mezcladora de alta velocidad. Se añadieron lisozima y EDTA hasta concentraciones finales de 100 μ g/ml y 0,5 mM, respectivamente, y se agitó suavemente la disolución a 0°C durante 30 min. Se añadieron 12 ml de desoxicolato de Na al 8%, 0,24 ml de fluoruro de fenilsulfonilo (20 mg/ml en 2-propanol), 0,15 ml de bacitracina (10 mg/ml), 0,15 ml de benzamidina 0,1 M, 3,3 ml de Triton X-100 al 10% y se ajustó la disolución con MgCl₂ hasta una concentración final de 10 mM. Se redujo la alta viscosidad mezclando a alta velocidad. Se añadió NaCl sólido hasta una concentración final de 0,5 M y se añadieron 4,8 ml de polietilenimina al 0,3% (pH 8) con agitación. Tras agitar durante 20 min. a 0°C se centrifugó la suspensión durante 30 min. a 10.000 rpm (rotor GSA). Tras diluir el sobrenadante con 5 volúmenes de tampón Tris-HCl (pH 8,7), mercaptoetanol 1 mM se añadieron 100 ml de suspensión de DEAE-celulosa (Whatman DE52, equilibrado con tampón A) y se agitaron lentamente a 0°C durante 20 min. Tras 40 min. de incubación sin agitación, se decantó el sobrenadante del sedimento y se desechó. Se suspendió el sedimento en tampón A, se vertió en una columna de vidrio de 1 cm de diámetro, se lavó con 400 ml de tampón Tris.HCl (pH 8,7), mercaptoetanol 1 mM y se eluyó con 250 ml de tampón A + NaCl 180 mM; se recogieron las fracciones. Se sometieron a ensayo las fracciones para determinar la presencia de *Q β replicasa* usando el siguiente ensayo de unión.

ES 2 351 275 T3

Ensayo de ubicación de enzimas: unión de ARN biotinilado a Q β replicasa

Éste es un ensayo no radiactivo desarrollado para detectar enzimas de replicación que se basa en ARN marcado con biotina unido a la enzima que se retiene en membranas cargadas positivamente; mientras que, no se retiene en la membrana el ARN marcado con biotina libre en las mismas condiciones. Se marcaron ADN y ARN con psoraleno-biotina (Ambion) según las instrucciones del fabricante. Entonces se añadió el ARN marcado al eluato de la columna (fracciones de la muestra) tal como se indica en el ensayo a continuación para detectar la ubicación de la Q β replicasa.

Se mezcló lo siguiente en un tubo Eppendorff:

- 10 μ l de fracciones de eluato de la columna
- 15 μ l de Tris HCl 0,5 M (pH 7,4) conteniendo MgCl₂ 120 mM
- μ l de ATP 2 mM
- 20 μ l de ATP 5 mM
- μ l ~ 100 ng/ml de ARN de sonda marcado con psoraleno-biotina
- 25 μ l de agua

Se incubó la mezcla de reacción a 37°C durante 1 min.

Se sometieron las mezclas de reacción a transferencia puntual sobre membrana de nailon, por ejemplo hybond N, (sólo se retendrá en la membrana el ADN o ARN unido a la enzima Q β replicasa), se lavaron con Tris HCl 50 mM pH 7,4 conteniendo MgCl₂ 12 mM, se reticularon con UV sobre la membrana de nailon en el aparato Stratalinker en el ajuste automático. Se usó el kit BrightStar Biodetect para la detección del ácido nucleico biotinilado unido a la membrana de nailon. La figura 12 muestra el ensayo de las fracciones eluidas de la columna DE52.

Se reunieron las fracciones activas, se diluyeron con un volumen de tampón A y se aplicaron a una columna de 35 ml de DEAE-Sephadex FF, se equilibraron con respecto a tampón A + NaCl 0,1 M. Se eluyó la enzima con un gradiente lineal de NaCl 0,1-0,4 M en tampón A. Se reunieron las fracciones activas, se precipitó la enzima mediante la adición de (NH₄)₂SO₄ sólido (39 g/100 ml de disolución), se recogió mediante centrifugación y se disolvió en 4 ml de tampón B.

Se diluyó la enzima hasta que la conductividad fue menor que la del tampón B + NaCl 0,2 M y se aplicó a una columna de 100 ml de Fractogel EMD SO3 equilibrada con tampón B, y se eluyó con un gradiente lineal (2 veces 500 ml) de NaCl 0,2-0,8 M en tampón B. Se reunieron los picos activos, eluyendo a aproximadamente NaCl 0,65 mM, se precipitaron con (NH₄)₂SO₄ sólido (39 g/100 ml de disolución), se recogieron mediante centrifugación, y se disolvieron en 10 ml de tampón A + glicerol al 50%. Se almacenó la disolución a -80°C.

Se realizaron las siguientes etapas a pequeña escala según Sumper & Luce (1975). Se aplicaron 4 mg Q β replicasa a una columna de 1,6 x 14,5 cm de QAE-Sephadex-A-25 equilibrada con tampón A (diluida o dializada para eliminar la sal), y se eluyeron con un gradiente de 2 x 200 ml de NaCl 0,05-0,25 M en tampón A. Se reunieron los dos picos claramente separados de núcleo y holoenzima, se diluyeron 1:1 con tampón A y se aplicaron a las columnas de QAE-Sephadex, 2 ml para el núcleo, 6 ml para la holorreplicasa, respectivamente, se lavaron con tampón A + glicerol al 50%, y se eluyó la replicasa en forma concentrada con tampón A + glicerol al 50% + (NH₄)₂SO₄ 0,2 M. Se almacenaron las fracciones activas a -80°C. Se tuvo cuidado de evitar la contaminación del equipo con ARN.

Ejemplo 2

Clonación de Q β replicasa en el vector de expresión eucariota pCDNA3.1

Se clonó la secuencia codificante de Q β replicasa en el vector de expresión eucariota pCDNA 3.1 (figura 9) para producir el vector denominado pCDNAQB. Se usó este vector para la expresión de Q β replicasa *in situ* en el sistema de transcripción/traducción acopladas y replicación/mutación concomitante del ARN diana. La secuencia de los oligonucleótidos usados como cebadores en la amplificación por PCR de Q β replicasa para la clonación en los sitios de restricción *EcoRI* y *NotI* en el vector de expresión eucariota pCDNA3.1 fueron:

- 65 n.º 5352 5'TCTGCAGAATTCCGCCACCATGTCTAAGACAGCATCTTCG
- n.º 5350 5'TTTATAATCTGCGGCCGCTTACGCCTCGTGTAGAGACGC

ES 2 351 275 T3

Se clonó la secuencia codificante para la subunidad b de Q β replicasa en el pCDNA3.1 mediante técnicas de biología molecular convencionales (Sambrook *et al.*, 1989). Se confirmó la secuencia clonada mediante el análisis de secuencia de ADN. La expresión de la Q β replicasa en el sistema de transcripción/traducción acopladas de reticulocitos de conejo fue seguida por la detección de lisina biotilada (TRANSCEND, Promega) incorporada en la Q β replicasa sintetizada *de novo* en la reacción de transcripción/traducción convencional tal como sugirieron los proveedores comerciales de los kits de transcripción-traducción acopladas (Promega y Novagen) y el proveedor de Transcend (Promega). Al finalizar la etapa de incubación de la reacción acoplada, se calentaron 20 μ l de la reacción hasta 90°C con 2 ml de tampón de muestra SDS 10X y se sometieron las muestras a electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE). Esto fue seguido por inmunotransferencia de tipo Western y se detectaron las bandas de Q β replicasa biotilada sintetizada *de novo* con los reactivos de detección del kit TRANSCEND. Los resultados de esta expresión se muestran en las exploraciones del gel de la figura 12 en la que puede observarse que se ha sintetizado la Q β replicasa mostrándose por la banda biotilada al tamaño correcto en el gel.

Entonces, se llevaron a cabo las reacciones de transcripción/traducción acopladas con el molde de 1C3 (ejemplo 3) pero que también expresaba la Q β replicasa a partir de pCDNA3.1 en la misma reacción. La Q β replicasa sintetizada *in situ* a partir del vector de expresión pCDNAQ β dio como resultado la síntesis aumentada del scFv de 1C3 en el sistema acoplado en presencia de cloruro de manganeso 0,5 mM; medido mediante la incorporación de lisina biotilada (figura 12b) tal como se describió anteriormente. Se ha demostrado anteriormente que la presencia del cloruro de manganeso relaja la dependencia de la actividad de replicación de Q β de los factores de transcripción/traducción.

Ejemplo 3

Construcción mediante PCR de moldes de ADN para la transcripción

Se amplificaron secuencias de ADN mediante técnicas convencionales y bien descritas (reacción en cadena de la polimerasa [PCR] con cebadores de oligonucleótido específicamente diseñados, extensión por solapamiento de corte y empalme, digestos de enzimas de restricción, etc.) usando o bien *Taq*, *Tth*, *Tfl*, *Pwo* o bien *Pfu* polimerasa según las instrucciones del proveedor usando o bien un secuenciador térmico FTS-1 (Corbett Research), un aparato PE2400 (PerkinElmer) o bien un aparato Robocycler gradient 96 (Stratagene). En la figura 11 se facilita una lista de cebadores de oligonucleótido usados. Se purificaron en gel los productos usando BresaClean (Bresa) o se usaron directamente en las reacciones de transcripción y traducción acopladas.

Se amplificaron secuencias de ADN a partir de los moldes de partida que se habían clonado o bien en el vector pGC038CL (figura 7a) o bien en el vector pGC_CH (figura 7b) que proporcionaron una extensión hasta el extremo terminal en el sentido de 3' del constructo. Esta extensión fue o bien una región constante de un anticuerpo monoclonal de ratón (1C3; secuencia de la figura 5a) o bien una región constante de un anticuerpo IgM humano (secuencia de la figura 5b). Los cebadores directos (sentido) (N5266 para el scFv anti-GlyA; N5517 o N5384, N5344 y N5343 para el scFv anti-HepB) usados para la amplificación proporcionaron un sitio de iniciación de la transcripción así como un sitio de iniciación de la traducción y un sitio de unión a ribosoma. Los cebadores inversos (antisentido) (N5267 para la región constante de ratón; N5385 para la región constante humana) no contenían codones de parada lo que permite que el complejo ARNm-ribosoma-proteína permanezca asociado. Tanto los cebadores directos como inversos proporcionaron sitios de enzimas de restricción (específicamente *Sfi*I y *Not*I, respectivamente) que permitieron clonar fragmentos generados.

Puede usarse cualquiera de varias secuencias promotoras para ARN polimerasa dependiente de ADN para dirigir la transcripción; sin embargo, las siguientes secuencias fueron las dos preferidas (éstas incluyen las secuencias de iniciación de la traducción; véase a continuación):

a) GCGCGAATACGACTCACTATAGAGGGACAAACCGCCATGGCC

b) GCAGCTAATACGACTCACTATAGGAACAGACCACCATGGCC

Estas secuencias han dirigido la transcripción de ARN polimerasa dependiente de ADN de T7 para producir transcritos de ARN en dos formatos alternativos de sistemas de transcripción/traducción acopladas.

Se conocen secuencias que codifican para sitios de unión a ribosoma y se han incluido en el molde en el sentido de 5' de una cualquiera de las secuencias de las moléculas de interés para la presentación en ribosoma que codifican o bien para el scFv de unión a glicoforina (1C3; figura 5c) o bien para el scFv de unión a antígeno de superficie de hepatitis B (4C2; figura 5d). Se han incluido las mismas secuencias en el molde en el sentido de 5' de cualquier otra secuencia de interés para la presentación en ribosomas (por ejemplo, secuencias de bibliotecas basadas en CTLA-4).

Ejemplo 4

Transcripción/traducción acopladas y presentación en ribosoma en el sistema libre de células de lisado de reticulocitos de conejo

Se llevó a cabo la transcripción y la traducción en tubos de 0,5 ml libres de ARNasa siliconizados (Ambion) usando el sistema de transcripción/traducción acopladas TNT T7 (Promega) conteniendo acetato de magnesio 0,5 mM,

ES 2 351 275 T3

metionina 0,02 mM y glutatión oxidado (GSSG) 3 mM (véase el ejemplo 6, a continuación) y se incubó la mezcla a 60°C durante 90 min. En algunas reacciones también se añadió glutatión reducido hasta 10 mM. En reacciones que contenían Q β polimerasa, la mezcla también contenía cloruro de manganeso hasta una concentración final de 0,5 mM. Tras la transcripción y la traducción, se diluyó la mezcla con PBS y se trató con ADNsa I para eliminar cualquier molde de ADN de partida restante. Esto se logró con la adición de Tris 40 mM (pH 7,5), MgCl₂ 6 mM, NaCl 10 mM y ADNsa I (Promega), seguido de incubación a 30°C durante 20 min. adicionales.

Ejemplo 5

Selección de proteínas presentadas en complejo ternario de ribosoma frente a antígenos usando Dynabeads

Se acoplaron perlas magnéticas tosilactivadas (Dynal) a glicoforina A (GlyA; Sigma), antígeno de superficie de hepatitis B (HepB SA; BiosPacifc, Emeryville, CA EE.UU.) o albúmina de suero bovino (BSA; Sigma) según las instrucciones del fabricante. Cuando se usaron perlas magnéticas de estreptavidina, éstas se acoplaron (según las instrucciones del fabricante) a antígenos (tal como se mostró anteriormente) que se habían biotinilado usando EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin (Pierce) según las instrucciones del fabricante.

Con el fin de seleccionar específicamente complejos de ARNm-ribosoma-proteína de unión, se añadieron 2-3 μ l de perlas magnéticas (tosilactivadas o recubiertas con estreptavidina) acopladas a antígeno a una mezcla de traducción final y se colocaron en un agitador de placas (Raytek Instruments) a temperatura ambiente durante 90 min. con agitación suave para evitar la sedimentación de las perlas. Se recuperaron las perlas usando un concentrador de partículas magnéticas (Dynal) y éstas se lavaron tres veces con solución salina tamponada con fosfato fría (PBS) pH 7,4 que contenía Tween al 1% y acetato de magnesio 5 mM. Entonces se lavaron las perlas una vez con agua estéril fría y finalmente se resuspendieron en 10 μ l de agua estéril.

Para la síntesis de ADNc a partir de los complejos seleccionados, se usaron 2 μ l de la suspensión de perlas final en una reacción de RT-PCR usando o bien el sistema de RT-PCR Access (Promega) o bien el sistema de RT-PCR Titan One-tube (Boehringer Mannheim) según las instrucciones del fabricante. Los cebadores usados para esta reacción incluyeron el cebador directo (sentido) original (usado para generar los cebadores de ADN molde de partida; N5266 para el scFv anti-GlyA; N5517 o N5384, N5344 y N5343 para el scFv anti-HepB) y un cebador negativo (antisentido) que se encontraba en el sentido de 5' del cebador original (N5268 y N5269 para constructos de región constante de ratón; N5386 y N5387 para constructos de región constante humana). En algunos casos, se usaron cebadores más cortos (N5941 y N5942 para el constructo de scFv de anti-GlyA-región ligera constante) para recuperar los moldes de ARN inmunoseleccionados.

Para ciclos de selección adicionales, este ADN se purificó en gel (en algunos casos, simplemente se diluyó) y se incorporó en una PCR adicional usando los cebadores directos e inversos que habían estado presentes en la PCR original para generar el molde de ADN de partida. Este nuevo molde podría usarse entonces en selecciones adicionales tal como se describió anteriormente, dado que contenía los sitios de iniciación apropiados y es de la misma longitud que el molde en la primera selección.

Con el fin de demostrar que el método descrito anteriormente puede usarse para seleccionar moléculas específicas, se amplificó un Fv de cadena simple (scFv) fusionado a una región de cadena ligera constante de ratón que específicamente se une a GlyA usando cebadores que permitirían la adición de un sitio de iniciación de la transcripción de T7 y un sitio de unión a ribosoma. Se usó este molde (T7-scFv) en una reacción de transcripción/traducción acopladas tal como se describió anteriormente y entonces se dividió en tres y se mezcló con perlas magnéticas acopladas o bien a HepB SA, GlyA o bien a BSA. Se lavaron las perlas (tal como se describió anteriormente) y se usaron complejos de ARNm-ribosoma-proteína recuperados para sintetizar ADNc. Los resultados de este experimento mostraron la presencia de un producto del tamaño correcto en cada carril. La unión no específica observada en los carriles de HepB SA y BSA probablemente se debe a la agregación de productos sintetizados durante la traducción. Otros han observado que sólo una proporción de productos sintetizados usando el lisado de reticulocitos están en una forma activa y plegada de manera apropiada. Este problema se trató en el ejemplo 6 a continuación.

Se purificó en gel el producto específico de GlyA de este experimento y se reamplificó mediante PCR con el fin de sintetizar más moldes para una ronda de selección adicional. Una segunda ronda de inmunoselección mostró predominantemente un producto específico en la muestra estudiada con sonda con perlas magnéticas acopladas a GlyA. Esto demostró que mediante la segunda ronda de selección, los productos recuperados eran específicos para GlyA.

Ejemplo 6

Efecto de la adición de glutatión oxidado y/o reducido

En un intento de inducir una mayor proporción de productos correctamente plegados durante la transcripción y traducción *in vitro*, se añadieron diversas concentraciones de glutatión o bien oxidado o bien reducido a la mezcla de reacción. El molde usado para estas reacciones fue T7-scFv anti-GlyA (tal como se describió anteriormente) y se realizaron selecciones usando perlas magnéticas acopladas a GlyA. Este experimento demostró que la cantidad de

ES 2 351 275 T3

producto recuperado aumentaba con el aumento de las concentraciones de glutatión oxidado hasta 5 mM. Un aumento adicional hasta 10 mM tuvo un efecto perjudicial sobre el rendimiento del producto recuperado. En la mayoría de transcripciones y traducciones se incluyó una concentración de glutatión oxidado de aproximadamente de 2 mM.

5 Resultados posteriores revelaron que una adición adicional de glutatión reducido 5 mM y 10 mM a la reacción que ya contenía glutatión oxidado 2 mM demostró que la adición de glutatión 5 mM pareció permitir un mejor plegamiento del scFv anti-GlyA presentado conduciendo a un aumento de la cantidad de producto recuperado a partir de la inmunoselección de GlyA con respecto a las inmunoselecciones control. La disminución adicional de la concentración de glutatión reducido hasta 0,5 mM mostró efectos similares.

10

Ejemplo 7

Presentación de biblioteca de dominio v (CTLA-4) con mutación en ribosomas

15

Con el fin de mostrar que puede usarse la presentación en ribosoma para seleccionar elementos de unión de una biblioteca de polipéptidos, se ligó una biblioteca de mutantes de CTLA-4 en el plásmido pGC_CH (figura 7b) lo que permitió la adición de un dominio pesado constante y entonces se amplificó esta biblioteca mediante PCR usando los cebadores N5659 y N5385 (figura 11). Se usó el cebador N5659 para añadir las secuencias de iniciación de la transcripción y la traducción en el sentido de 5' necesarias. Entonces, se usó este ADN de PCR como molde para la transcripción y la traducción en un sistema de traducción libre de células acoplado usando los métodos descritos en el ejemplo 4. Para demostrar la unión de los complejos de ribosomas - CTLA mutante, se realizó la inmunoselección usando Dynabeads recubiertas con antígeno de superficie de hepatitis B (HBSA), glicoforina A (GlyA) y albúmina de suero bovino (BSA). Entonces se recuperó el ARN unido a los complejos unidos mediante RT-PCR. Los métodos usados para la inmunoselección, selección y recuperación fueron tal como se describió anteriormente (ejemplo 5).

25

Se recuperaron los productos correspondientes aproximadamente al tamaño de los mutantes basados en CTLA4 y mostraron que la biblioteca de CTLA4 contenía proteínas que codificaban para ADN que se unen específicamente a HBSA, GlyA y BSA. Se clonaron estos productos en el vector pGC_CH (figura 7b) para secuenciar el ADN y expresar los productos solubles. La secuenciación usando métodos convencionales (BigDye Terminator Cycle Sequencing; PE Applied Biosystems CA) mostró que estaban presentes insertos específicos basados en CTLA4. Además, los análisis de expresión usando ELISA mostraron que se estaban expresando proteínas específicamente reactivas por los cultivos recombinantes. En estos ensayos, los recombinantes que se habían aislado mediante inmunoselección usando Dynabeads recubiertas con Gly-A y seleccionado mediante ELISA usando placas recubiertas con GlyA, dieron señales más fuertes que los recombinantes sometidos a prueba de manera similar que se habían aislado mediante inmunoselección usando Dynabeads recubiertas con BSA.

30

35

Ejemplo 8

40

Efecto de la inclusión de Q β replicasa en la transcripción y traducción acopladas

En un intento tanto de aumentar el rendimiento de los productos, como de aumentar la tasa de mutagénesis en los productos durante la traducción *in vitro*, se añadió Q β replicasa (en cualquiera de las dos formas) a la mezcla de reacción. Se incluyó la replicasa o bien como una proteína de Q β replicasa purificada o bien como un molde génico bajo el control de un promotor transcripcional T7 (pCDNAQ β) que podría sintetizarse simultáneamente durante la reacción de transcripción/traducción acopladas. El molde usado para esta reacción fue de nuevo el T7-scFv anti-GlyA (tal como se describió anteriormente) y se realizaron selecciones usando perlas magnéticas acopladas a GlyA. Estos experimentos mostraron que la cantidad de producto reactivo de GlyA recuperado aumentó (con respecto al control sin Q β replicasa) con la adición de Q β replicasa purificada y, en un menor grado, con la adición del molde genómico que codifica para Q β replicasa (pCDNAQ β).

45

50

Con el fin de determinar si se han insertado mutaciones en la secuencia de scFv, se aisló en gel y se purificó el producto principal de cada carril. Se digirió el ADN con *SfiI* y *NotI* y se ligó en un vector pGC digerido de manera similar y se transformó en *E. coli* usando protocolos convencionales. Se aisló el ADN de los recombinantes de cada serie y se sometieron a secuenciación de ADN seis clones al azar usando métodos convencionales (BigDye Terminator Cycle Sequencing; PE Applied Biosystems CA). Se secuenciaron aproximadamente 280 bases de cada clon y la figura 14 muestra el número y la posición de las mutaciones en estas secuencias. Este experimento mostró la introducción de un aumento del número de mutaciones tras la transcripción y la traducción en presencia de Q β replicasa (en cualquiera de las formas usadas).

55

60

Ejemplo 9

Adición de secuencias de Q β artificiales

En un intento de aumentar la eficacia de la actividad Q β replicasa, se añadieron sitios de unión a Q β específicos a los extremos tanto en sentido de 5' como en sentido de 3' del molde de T7-scFv anti-GlyA mediante PCR.

ES 2 351 275 T3

Se usó este nuevo molde (amplificado con los cebadores N5904 y N5910 [sentido] y N5909 [antisentido] (figura 11) en una reacción de transcripción/traducción acopladas que incluía Q β replicasa como o bien una proteína de Q β replicasa purificada o bien como un molde génico bajo el control de un promotor transcripcional T7 que podía sintetizarse simultáneamente durante la reacción de transcripción/traducción acopladas. Se realizaron selecciones usando perlas magnéticas acopladas a HepB, GlyA o BSA y se recuperaron los productos tras RT-PCR. La presencia de secuencias de horquilla de Q β artificiales (i) no tuvo un efecto adverso sobre la transcripción, traducción y selección acopladas y (ii) en la mayoría de casos aumentó la cantidad de productos recuperados mediante RT-PCR tras la selección.

Ejemplo 10

Replicación de transcritos de scFv anti-glicoforina mediante Q β replicasa en el sistema de reticulocitos de conejo de transcripción/traducción acopladas

Se construyeron los moldes de scFv de T7-1C3 y T7-4C2 para su presentación en ribosoma tal como se describió en el ejemplo 3 y se sometieron a transcripción/traducción acopladas, en las siguientes condiciones. Se modificaron las reacciones de transcripción/traducción acopladas convencionales mediante la adición de Q β replicasa (purificada tal como se detalló en el ejemplo 1). En una reacción de 20 μ l convencional, se añadió 1 ml de enzima 20 μ g/ml. Previamente, se ha comparado el efecto de la concentración de Q β replicasa sobre la replicación de scFv anti-GlyA 1C3 y scFv de anti-Hepb 4C2 en el sistema acoplado y se ha observado que 1 ml de esta muestra proporcionaba la replicación óptima. Se añadió cloruro de manganeso hasta una concentración final de 0,5 mM puesto que se ha demostrado en informes publicados que disminuye el requisito de factores de transcripción/traducción. Se dejaron continuar las reacciones durante 2 h a 37°C. Se analizaron los transcritos replicados mediante RT-PCR tras eliminar el molde de ADN mediante digestión con ADNasa I en Tris-HCl 40 mM pH 7,5, MgCl₂ 6 mM, NaCl 10 mM a 30°C durante 20 min. Se usó extracción con fenol convencional para eliminar la ADNasa I y otras proteínas. Se precipitaron con etanol las muestras y se disolvió el precipitado de ARN en agua libre de ARNasa. Se sometió a ensayo el ARN mediante RT-PCR usando cebadores específicos para cada molde, véase el ejemplo 3, y se compararon los productos de PCR (ADN) mediante electroforesis en gel de agarosa. Se visualizaron las bandas de ADN mediante tinción con bromuro de etidio. Se sometió el gel de agarosa a densitometría explorando la imagen digitalizada con el software comercial Gel-Pro Analyzer. La figura 13 muestra los perfiles densitométricos del gel de agarosa a partir de los que puede observarse que en la muestra que contenía la Q β replicasa purificada existe un aumento en la cantidad de molde producido.

Ejemplo 11

Replicación y mutación de scFv anti-glicoforina y scFv anti-hepatitis B mediante Q β replicasa a partir de transcritos de polimerasa de T7; Q β replicasa muta transcritos durante la replicación de ARN dependiente de ARN

Se complementaron las reacciones de transcripción/traducción acopladas tal como se detalló en ejemplos anteriores con enzima purificada Q β replicasa para replicar y mutar el ARN de scFv anti-GlyA 1C3 transcrito por ARN polimerasa dependiente de ADN de T7.

Tras la incubación para la transcripción/replicación/mutación/traducción, se trató la muestra con ADNasa I y se eliminó esta enzima tal como se detalló en el ejemplo 10. Entonces se usó el ARN purificado como el molde para las reacciones de RT-PCR con cebadores específicos para scFv anti-GlyA 1C3 en la reacción tal como se detalló en el ejemplo 3. Las polimerasas termoestables usadas en estas reacciones fueron una de las enzimas *vent*, *pfu* polimerasa de alta fidelidad usadas según las instrucciones del fabricante. Se purificaron los productos de reacción de PCR con uno de los kits comercialmente disponibles tal como se observó anteriormente y se ligó el ADN purificado en el plásmido pCRscript comercialmente disponible y se transformó en células XL1Blue de *E. coli* competentes usando técnicas de biología molecular convencionales. Se colocaron en placas las reacciones de transformación sobre placas con agar YT que contenían X-gal. Tras incubación durante la noche, se recogieron colonias blancas (*E. coli* con plásmidos que contenían insertos de ADN en el sitio de clonación múltiple) y se cultivaron durante la noche a 37°C en 5 ml de caldo YT que contenía ampicilina 100 μ g/ml. Se extrajo el ADN de cada uno de los cultivos con el kit comercial (Quiagen) según las instrucciones del fabricante. Se analizó el ADN purificado mediante secuenciación de ADN: los resultados de la secuenciación se muestran en la figura 16. Esta tabla muestra mutaciones en una muestra al azar de secuencias que representa un muestreo mínimo de las mutaciones y la variación de secuencias en las reacciones de replicación/mutación por Q β replicasa completas.

Ejemplo 12

Estructura secundaria predicha de ARN molde

Se han notificado las estructuras secundarias putativas y secuencias de ARN preferidas por la Q β replicasa para sus moldes de ARN (Zamora *et al.*, 1995). Para determinar si éstas o estructuras preferenciales relacionadas existen en los moldes para la evolución *in vitro* continua, se analizaron las secuencias no traducidas en el sentido de 5'; secuencias

ES 2 351 275 T3

promotoras T7, las secuencias que codificaban para el gen de 1C3, el gen de la región de anclaje ligera constante, el gen de scFv anti-Hepb 4C2 y el gen de la región de anclaje pesada constante humana de IgM con el programa Mfold (Zucker *et al.*, 1991) y se compararon con las estructuras preferidas por Q β replicasa (tal como se muestra en la figura 8). A partir de esta comparación puede observarse que se ha identificado que el scFv 1C3 tiene una estructura secundaria de ARN interna que imita la estructura del sitio M de la Q β replicasa, tal como lo hace la región de anclaje CL y muestra una similitud con la secuencia sintética preferida notificada por Zamora *et al.*, 1995. Esto puede explicar la replicación preferida del molde de CL de scFv anti-GlyA 1C3 con respecto a la de scFvCH3 anti-Hepb 4C2 por la Q β replicasa (véase el ejemplo 3). Por tanto, se propone el gen de la región CL como región de anclaje para moléculas presentadas para su presentación a la transcripción/traducción acopladas y cualquier mutagénesis puesto que el ARN que codifica para esta región promueve y aumenta la replicación y mutación asociada por Q β replicasa de esta región y sus fusiones genéticas.

Ejemplo 13

Protocolo de expresión para pLysN-NS5B (83 kDa, pI ~ 9,05)

pLysN-NS5B es un vector de expresión bacteriano (citoplasmático) con un promotor T7. NS5B es la ARN polimerasa dependiente de ARN de HepC no estructural. NS5B está fusionada a un resto de LysN en su extremo N terminal que están separados por un conector de Gly-Ser-Gly-Ser-Gly, 10 residuos de His y seguidos por un conector de Asp-Asp-Asp-Lys (GSGSGH10D4K).

Se transformó este plásmido en la cepa de *E. coli* HMS174 (DE3)pLysS y se hizo crecer en placas con agar 1YT/amp_{100 μ g/ml}/cloranfenicol_{34 μ g/ml} a 37°C. Se seleccionó una sola colonia y se cultivó en un caldo durante la noche (1YT/amp_{100 μ g/ml}/cloranfenicol_{34 μ g/ml}) a 37°C. Para la expresión, se subcultivó el cultivo iniciador durante la noche mediante dilución hasta una A600 = 0,1 en 1YT/amp_{100 μ g/ml}/cloranfenicol_{34 μ g/ml} a 37°C en matraces agitadores de 2 l a 120 rpm. Se hizo crecer el cultivo hasta que la A600 alcanzó 0,8-1,0 y entonces se indujo con IPTG 1 mM, se complementó con amp 100 μ g/ml y se dejó que procediera la expresión a 37°C durante 4-5 horas.

Se recogió el cultivo y se centrifugó a 5000 g en un rotor enfriado previamente a 4°C. Se midió el peso húmedo del cultivo recogido y se congeló el sedimento celular a -80°C. Se produjeron aproximadamente 3-4 gramos (peso húmedo) por litro de cultivo celular.

Protocolo de lisis y purificación

Se consiguió la extracción de la RdRp de HepC (NS5B) lisando las células seguido de técnicas de química de proteínas convencionales.

Se añadieron al sedimento celular congelado 5 ml de tampón C (recién preparado) a 4°C por gramo de sedimento celular. Se agitó la mezcla a 4°C usando una perla magnética hasta que se resuspendió completamente el cultivo. Entonces se sonicó el cultivo con 11 explosiones cada una de 10 segundos con una pausa de 1 minuto entre cada explosión mientras se agitaba continuamente con una perla magnética durante todo el proceso de sonicación. Se centrifugaron las células sonicadas a 75000 g a 4°C durante 20 minutos y se recuperó el sobrenadante (lisado).

Se añadió una saturación al 30% de AmSO₄ al lisado y entonces se centrifugó a 10000 g durante 15 minutos. Esto sirvió para eliminar algunas proteínas bacterianas. Se desechó el sedimento y se añadió al sobrenadante una saturación al 50% de AmSO₄ y se centrifugó y de nuevo a 10000 g durante 15 minutos. Esto sirvió para precipitar la NS5B de una gran proporción de proteínas de *E. coli*. Se desechó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en la mitad del volumen original con tampón C. Se dializó esto en tampón C a 4°C durante la noche.

Se analizó una alícuota de cada etapa en SDS-PAGE para confirmar la purificación parcial de la banda de RdRp de HepC de ~90 kDa.

Se cargó el extracto dializado sobre una columna de intercambio catiónico con resina "S" Hyper D equilibrada previamente con tampón C. Entonces se lavó la columna con tampón C hasta que se consiguió un punto de referencia estable. Se realizó la elución con un gradiente escalonado de tampón C con NaCl 1 M. Se encontró que NS5B eluía a una razón de NaCl al 50% que correspondía a una concentración de NaCl 600 mM.

Se analizaron las fracciones eluidas en un SDS-PAGE al 10% para confirmar la purificación. Se purificó la NS5B mediante este proceso hasta una homogeneidad de más del 90% con proteínas contaminantes de peso molecular inferior minoritarias.

Se concentró la NS5B purificada mediante saturación al 50% con AmSO₄ y resuspensión en un volumen de tampón C (con Tris pH 7,4) suficiente para volver a disolver el sedimento. Entonces se dializó esto en el mismo tampón para eliminar el AmSO₄.

ES 2 351 275 T3

Esta pureza de la NS5B era tal que no se necesitó purificación adicional mediante cromatografía de exclusión molecular en una columna Superose 12 preparativa en tampón C (Tris), aunque era opcional.

5	Tampones (sonicación/lisis, elución, diálisis)	Tampón C
	Na ₂ HPO ₄ 50 mM ***Na-PO ₄ pH 6,8	2,32 ml
	{o sustituido por Tris pH 6,8 NaH ₂ PO ₄	2,69 ml}
10	NaCl 100 mM	0,5844 g
	Glicerol al 10%	10 ml
15	b-Mercaptoetanol 10 mM	70 µl
	NaN ₃ al 0,02%	80 µl
	Sucrosa 0,25 M	8,56 g
20	Detergente (β-octil-glucopiranosido) al 0,1%	0,1 g
	Pefa-Bloc 1 mM	0,1 g
25	Comprimidos de Complete™ (sin EDTA)	2 Comprimidos
	H ₂ O	hasta 100 ml

30 La electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (acrilamida al 12,5%) y la tinción con azul de Coomassie de las proteínas de la proteína purificada mostraron una sola banda a aproximadamente 70 kD.

35 Se sometió a ensayo la RdRp de HepC (NS5B) mediante numerosos protocolos. El método más simple se basa en el kit de transcripción a gran escala de Novagen (TB069). Se han usado con éxito formas modificadas de este protocolo. Se describe brevemente este método tal como sigue.

40 Se usa un molde de ADN bicatenario que se digiere en el sentido de 5' de un promotor T7/T3/SP6 en presencia de una ARN polimerasa dependiente de ADN de T7 para preparar el molde de ARN. Entonces la RdRp de HepC (NS5B) en el mismo cóctel amplifica el ARN producido por la polimerasa de T7.

40	Molde de ADN (0,5 µg/ml)	1 µl (0,5 ng)
	ATP (20 mM)	10 µl
45	CTP (20 mM)	10 µl
	GTP (20 mM)	10 µl
50	UTP (20 mM)	10 µl
	Tampón de transcripción 5X (HEPES 400 mM pH 7,5, MgCl ₂ 60 mM, NaCl 50 mM)	20 µl
55	DTT 1 M (1 M)	1 µl
	Polimerasa de T7 (100 U/ml)	1 µl
60	RdRp de HepC (NS5B)	x µl
	Agua libre de nucleasa	y µl

65 Este método ha utilizado el molde de ADN control en el kit así como el ADN de plásmido cortado en el sentido de 5' del promotor T7 con éxito. La cantidad de ADN usada ha sido de tan sólo 0,1 ng con éxito. La cantidad de polimerasa de T7 usada ha sido de tan sólo 0,1 µl.

ES 2 351 275 T3

De manera interesante, se ha demostrado en estos experimentos que la RdRp de HepC (NS5B) tiene la capacidad de cebar ADNbc en ausencia de cebadores de oligonucleótido y amplificar el ARN.

Ejemplo 14

5

Clonación de la secuencia codificante de ARN polimerasa dependiente de ARN de hepatitis C en el vector de expresión eucariota pCDNA3.1

10 Se clonó la secuencia codificante de ARN polimerasa dependiente de ARN de hepatitis C de la figura 10 en el vector pCDNA3.1 (figura 9) para su expresión *in situ* en el sistema de transcripción/traducción acopladas y replicación/mutación concomitante del ARN diana. La secuencia de oligonucleótidos usados como cebadores en la amplificación por PCR de la ARN polimerasa dependiente de ARN de hepatitis C para su clonación en los sitios de restricción EcoRI y NotI en el vector de expresión eucariota pCDNA3.1:

15

5' GTGGTGGGAATTCGCCGCCACCTCTATGTCGACTCTTGGACC

5' GCACGGGCTTGGGCGATAATCCGCCGGCGAGCTCAGATC

20 Se clonó la ARN polimerasa dependiente de ARN de hepatitis C en el vector pCDNA3.1 (denominado pCDNAHEPC) con una estrategia similar a la descrita en el ejemplo 2 pero usando los oligonucleótidos anteriores en la amplificación por PCR de la ARN polimerasa dependiente de ARN de hepatitis C a partir del vector mostrado en la figura 17. Los métodos usados para demostrar que la ARN polimerasa dependiente de ARN de hepatitis C se estaba sintetizando *in situ* eran exactamente tal como se describieron en el ejemplo 2. Los resultados de la reacción acoplada con el molde de la ARN polimerasa dependiente de ARN de hepatitis C en pCDNAHEPC se muestran en la figura 18. Los resultados mostrados en esta figura demuestran que la ARN polimerasa dependiente de ARN de hepatitis C produce mayores cantidades de transcrito (barrido b) que la polimerasa de T7 sola. En el presente documento, la banda tiene una mayor intensidad y es más ancha que la banda sin ARN polimerasa dependiente de ARN de hepatitis C, lo que indica el efecto sobre el ARN.

30 Referencias

Baranov et al. (1989). *Gene* 84:463-466.

Baranov et al. (1993). *Methods in Enzymology* 217:123-142.

35

Barbas et al. (1994). *Ann Rev Imm* 57, 191.

Barrera et al. (1993). *J. Mol. Biol.* 232, 512-521.

40

Brown y Gold (1995a). *Biochemistry* 34, 14775-14782.

Brown y Gold (1995b). *Biochemistry* 34, 14765-14774.

Brown y Gold (1996). *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 93, 11558-11562.

45

Coia et al. (1996). *J. Immunol. Meth.* 192, 13-23.

Deiman et al (1997). *J. Virol.* 71, 5990.

50

Duenas y Borrebaeck (1994). *Bio/Technology* 12, 999-1002.

Ghee et al. (1996). *J. Mol. Biol.* 261, 222-230.

Gram et al. (1992). *PNAS* 89, 3586.

55

Hanes y Pluckthun (1997). *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 94, 4937-4942.

He y Taussig (1997). *Nucleic Acids Research* 25, 5132-5134.

60

Irving et al (1996). *Immunotechnology* 2, 127-143.

Keiler et al. (1996). *Science* 271, 990-993.

Kigawa et al, (1991). *J. Biochem.* 110, 166-168.

65

Kolosov et al. (1992). *Biotechnology and Applied Biochemistry* 16, 125-133.

Kramer et al. (1978). *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 75, 5334-5338.

ES 2 351 275 T3

- Krebber et al.** (1995). *FEBS Lett.* 377, 227-331.
- Kudlicki et al.** (1992). *Analytical Biochemistry* 206, 389-393.
- 5 **Lizardi et al.** (1988). *Bio/Technology* 6, 1197-1202.
- Mattheakis et al.** (1994). *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 91, 9022-9026.
- Melton et al.** (1984a). *Nucleic Acid Res.* 12: 7035-56.
- 10 **Melton et al.** (1984b). *Nucleic Acid Res.* 12: 7057-7070.
- Morozov et al.** (1993). *PNAS* 90, 9325-9329.
- 15 **Munishkin et al.** (1991). *J. Mol. Biol.* 221, 463-472
- Nishihara et al.** (1983). *J. Biochem. (Tokio)* 93, 669-674.
- Ojala P M y Bamford D H** (1995) *Virology*, 207, 400.
- 20 **Rattat et al.** (1990). *Tibtech* 8, 275-276.
- Rohde et al.** (1995). *J Mol Biol* 249, 754-762.
- 25 **Ryabova et al.** (1989). *Nucleic Acids Research* 17, 4412.
- Ryabova et al.** (1989). *Nucleic Acids Research* 17, 4412.
- Ryabova et al.** (1994). *Journal of Biological Chemistry* 269, 1501-1506.
- 30 **Ryabova et al.** (1997). *Nature Biotechnology*, 15, 79-84.
- Sambrook et al.** (1989). En: Nolan, C. (Ed.), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª ed. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.*
- 35 **Spirin** (1990a) Documentos US 5556769; 5643768.
- Spirin** (1990b). págs. 56-70 en *THE RIBOSOME: STRUCTURE, FUNCTION and EVOLUTION* (eds. Hill. W. E., et al.), *Amer. Soc. Microbiol., Washington, D.C.*
- 40 **Spirin et al.** (1988). *Science* 242, 1162-1164.
- Spirin, A. S.** (1991). págs. 31-43 en *FRONTIERS IN BIOPROCESSING II* (eds. Todd. P. et al.), *Amer. Chem. Soc., Washington, D.C.*
- 45 **Stemmer** (1994). *Nature* 370, 389-391.
- Stemmer et al.** (1995). *Science* 270, 1510.
- 50 **Sumper y Luce** (1975), *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 72, 162-166.
- Winter et al.** (1994). *Ann Rev Biochem* 12, 433.
- Winter et al.** (1994). *Ann. Rev. Biochem.* 12, 433.
- 55 **Yang et al** (1995). *J Mol Biol* 254, 392.
- Zamora et al.** (1995). *Biochemistry*, 34, 1261-1266.
- 60 **Zubay** (1973). *Ann. Rev. Genetics* 7, 267-287.
- Zucker** (1991) *Nucleic Acids Res* 25; 2707-14.
- 65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para la mutación de una proteína de interés, síntesis de un mutante de la proteína de interés y selección de un mutante de la proteína de interés que se une a una molécula diana que comprende:
- 10 a) incubar una molécula de ARN replicable que codifica para la proteína de interés con precursores de ribonucleósido trifosfato de ARN y una ARN polimerasa dirigida por ARN, en el que la ARN polimerasa dirigida por ARN replica la molécula de ARN pero introduce mutaciones generando de ese modo una población de moléculas de ARN mutante;
- 15 b) incubar las moléculas de ARN mutante de la etapa (a) con un sistema de traducción en condiciones que dan como resultado una síntesis de una población de proteínas mutantes de manera que tras la traducción, las proteínas mutantes se asocian con sus moléculas de ARN codificante formando de ese modo una población de complejos de ARN/proteína mutante;
- 20 c) seleccionar uno o más complejo(s) de ARN/proteína mutante exponiendo la población de complejos de ARN/proteína mutante de la etapa (b) a la molécula diana.
- 25 2. Un método según la reivindicación 1, en el que las etapas (a) a (c) se repiten una o más veces, en el que la molécula de ARN replicable usada en la etapa (a) es el ARN obtenido del/de los complejo(s) seleccionado(s) en la etapa (c).
- 30 3. Un método según la reivindicación 2, en el que las etapas (a) a (c) se repiten más de una vez, en el que la molécula de ARN replicable usada en la etapa (a) es el ARN obtenido del/de los complejo(s) seleccionado(s) en la etapa (c).
- 35 4. Un método según la reivindicación 2 o la reivindicación 3, en el que las etapas (a) a (c) se llevan a cabo simultáneamente en un recipiente o bien de una sola cámara o bien de múltiples cámaras, en el que el recipiente de múltiples cámaras permite la transferencia de fluidos entre cámaras.
- 40 5. Un método según cualquier reivindicación anterior, que comprende además la etapa de recuperar el/los complejo(s) de ARN/proteína mutante de la etapa (c) unido(s) a la molécula diana.
- 45 6. Un método según cualquier reivindicación anterior, que comprende además la etapa de liberar las moléculas de ARN del/de los complejo(s) de la etapa (c).
- 50 7. Un método según cualquier reivindicación anterior, en el que el ARN replicable es ARNm.
- 55 8. Un método según la reivindicación 7, en el que la molécula de ARNm replicable se deriva de un molde seleccionado del grupo que consiste en ARN RQ135, ARN MDV-1, ARN microvariante, ARN nanovariantes, CT-ARN y ARN RQ120.
- 60 9. Un método según la reivindicación 7, en el que la molécula de ARNm replicable se deriva de un vector que comprende un molde seleccionado de ARN MDV-1 y ARN RQ135.
- 65 10. Un método según cualquier reivindicación anterior, que comprende además la etapa de transcribir un molde de ADN para producir el ARN replicable.
- 70 11. Un método según la reivindicación 10, en el que el molde de ADN es una molécula de ADN lineal.
- 75 12. Un método según la reivindicación 10 o la reivindicación 11, en el que el molde de ADN comprende:
- 80 (i) una región no traducida que comprende un elemento de control que promueve la transcripción del ADN en ARN y un sitio de unión a ribosoma;
- 85 (ii) un marco de lectura abierto que codifica para la proteína que se une a la molécula diana; y
- 90 (iii) una estructura de horquilla situada en el sentido de 5' del marco de lectura abierto.
- 95 13. Un método según la reivindicación 12, en el que la estructura de horquilla es una secuencia de unión a replicasa.
- 100 14. Un método según la reivindicación 13, en el que la secuencia de unión a replicasa tiene una longitud de entre 15 y 50 nucleótidos.
- 105 15. Un método según la reivindicación 13, en el que la secuencia de unión a replicasa tiene una longitud de entre 20 y 40 nucleótidos.

ES 2 351 275 T3

16. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15, en el que la Q β replicasa reconoce la secuencia de unión a replicasa.
17. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 16, en el que la secuencia de unión a replicasa comprende la secuencia: GGGACACGAAAGCCCCAGGAACCUUUCG.
18. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 16, en el que una segunda estructura de horquilla se incluye en el sentido de 3' del marco de lectura abierto.
19. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 18, en el que el sitio de unión a ribosoma se deriva del virus MS2.
20. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 19, en el que una secuencia que codifica para un polipéptido se fusiona en 3' y en marco con el marco de lectura abierto.
21. Un método según la reivindicación 20, en el que el polipéptido es una región constante de inmunoglobulina.
22. Un método según la reivindicación 21, en el que el dominio constante de inmunoglobulina es un dominio ligero constante del anticuerpo de ratón 1C3.
23. Un método según cualquier reivindicación anterior, en el que las proteínas mutantes se asocian con sus moléculas de ARN codificantes por medio de complejos de ribosoma.
24. Un método según cualquier reivindicación anterior, en el que el sistema de traducción es un sistema de traducción libre de células.
25. Un método según la reivindicación 24, en el que el sistema de traducción libre de células comprende un extracto S-30 de *Escherichia coli*.
26. Un método según la reivindicación 24, en el que el sistema de traducción libre de células comprende un lisado de reticulocitos.
27. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 23, en el que el sistema de traducción comprende células completas.
28. Un método según la reivindicación 27, en el que las proteínas mutantes se asocian con sus moléculas de ARN codificante mediante asociación con o ubicación dentro de la misma célula.
29. Un método según cualquier reivindicación anterior, en el que el sistema de traducción comprende glutatión oxidado y/o reducido en una concentración total de entre 0,1 mM y 10 mM.
30. Un método según la reivindicación 29, en el que la concentración de glutatión está entre 2 mM y 7 mM.
31. Un método según la reivindicación 29, en el que el sistema de traducción comprende glutatión oxidado a una concentración de aproximadamente 2 mM y glutatión reducido a una concentración de entre 0,5 mM y 5 mM.
32. Un método según cualquier reivindicación anterior, en el que la ARN polimerasa dirigida por ARN
- (i) introduce mutaciones en la molécula de ARN replicado a una frecuencia de al menos una mutación puntual en 10⁴ bases; o
- (ii) introduce al menos una inserción o deleción a una frecuencia de 10⁻⁴.
33. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 31, en el que la ARN polimerasa dirigida por ARN
- (i) introduce mutaciones en la molécula de ARN replicado a una frecuencia de al menos una mutación puntual en 10³ bases; o
- (ii) introduce al menos una inserción o deleción a una frecuencia de 10⁻³.
34. Un método según cualquier reivindicación anterior, en el que la ARN polimerasa dirigida por ARN se selecciona del grupo que consiste en Q β replicasa, ARN polimerasa dirigida por ARN de hepatitis C, ARN polimerasa dirigida por ARN del virus de la estomatitis vesicular, replicasa del virus del mosaico amarillo del nabo y ARN dependiente de ARN de bacteriófago phi 6 de ARN.
35. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 33, en el que la ARN polimerasa dirigida por ARN es Q β replicasa.

ES 2 351 275 T3

36. Un método según cualquier reivindicación anterior, en el que la molécula diana se selecciona de una molécula de ADN, una proteína, un receptor, una molécula de superficie celular, un metabolito, un anticuerpo, una hormona, una bacteria o un virus.

5 37. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la molécula diana se une a una matriz.

38. Un método según la reivindicación 37, en el que la matriz comprende perlas magnéticas.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Maduración de la afinidad: presentación en fago y presentación en ribosoma

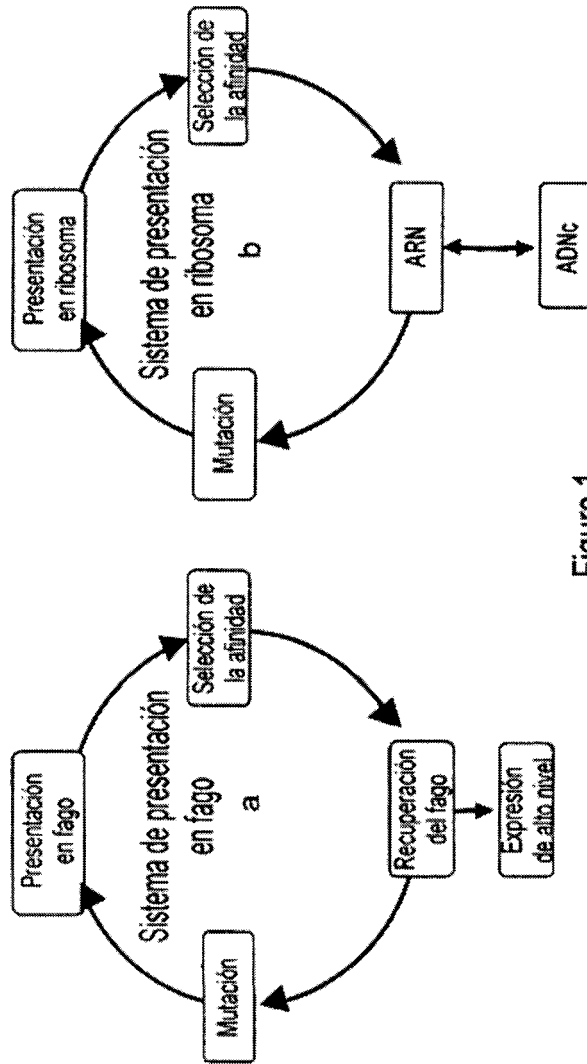


Figura 1

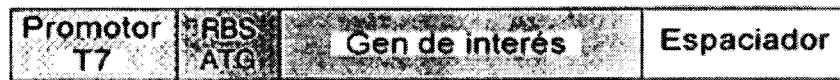
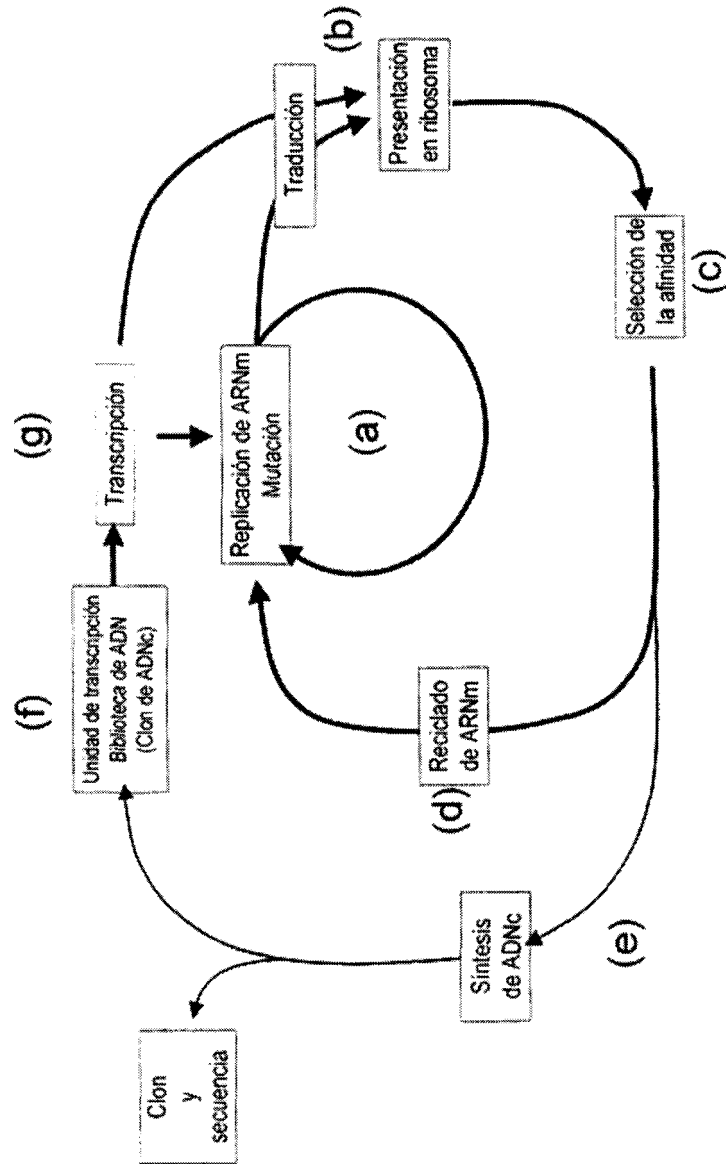


Figura 2

Figura 3: Evolución *in vitro* continua



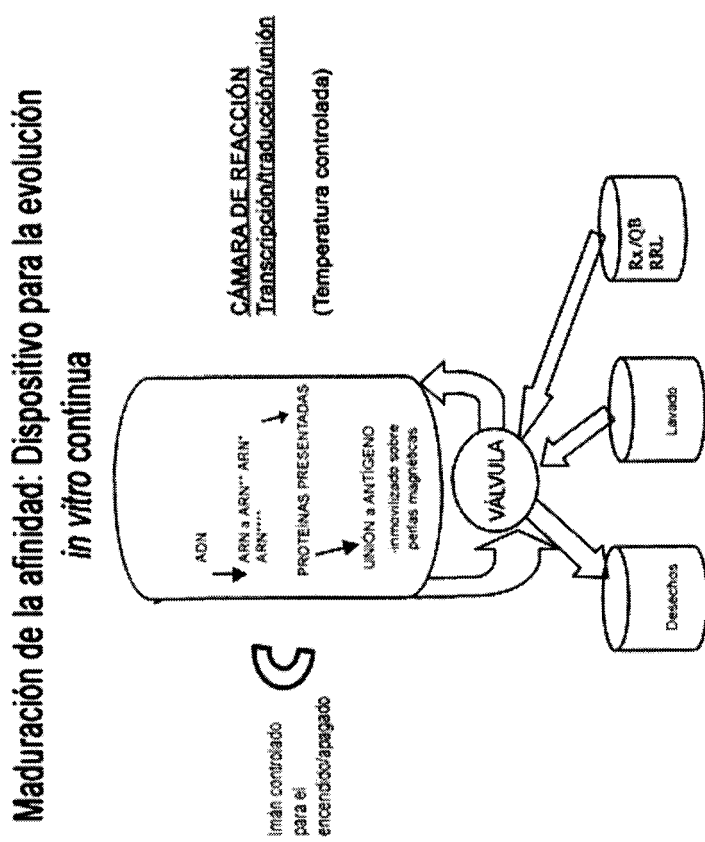


Figura 4

Figura 5

Figura 5(a) Secuencia de la región ligera constante de 1C3 monoclonal de ratón
GCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTCCCACCATCCAGTGAGCAGTTAACATCTGGA
GGTGCCTCAGTCGTGTGCTTCTTGAACAACCTTACCCCAAAGACATCAATGTCAAGTGG
AAGATTGATGGCAGTGAACGACAAAATGGCGTCCTGAACAGTTGGACTGATCAGGACAG
CAAAGACAGCACCTACAGCATGAGCAGCACCCTCACGTTGACCAAGGACGAGTATGAAC
GACATAACAGCTATACCTGTGAGGCCACTCACAAAGACATCAACTTCACCCATTGTCAAGA
GCTTCAACAGGGGAGAGTGT

Figura 5(b) Secuencia de la cadena pesada constante humana
GCAGATCAAGACACAGCCATCCGGGTCTTCGCCATCCCCCATCCTTTGCCAGCATCTTC
CTCACCAAGTCCACCAAGTTGACCTGCCTGGTCACAGACCTGACCACCTATGACAGCGT
GACCATCTCCTGGACCCGCCAGAATGGCGAAGCTGTGAAAACCCACACCAACATCTCCG
AGAGCCACCCCAATGCCACTTCAGCGCCGTGGGTGAGGCCAGCATCTGCGAGGATGA
CTGGAATTCGGGGAGAGGTTACGCTGCACCGTGACCCACACAGACCTGCCCTCGCCAC
TGAAGCAGACCATCTCCCGGCCAAAGGGC

Figura 5(c) Secuencia del scFv anti-glicoforina (1C3)
ATGGCCGAGGTGAGGCTTCTTGAGTCTGGAGGTGGCCCGGTACAACCTGGAGGATCCC
TGAAACTCTCCTGTGCAGCCTCAGGATTCGATTTTAGTAGATACTGGATGAATTGGGTCC
GGCGGGCTCCAGGGAAGGGGCTAGAGTGGATTGGAGAAATTAATCAACAAAGCAGTAC
GATAAACTATTGCGCACCTCTGAAGGATAAATTCATCATCTCCAGAGACAACGCCAAAAGT
ACGCTGTACCTGCAAATGAACAAAGTGAGATCTGAGGACACAGCCCTTTATTATTGTGCA
AGACTTTCTTACTGCGGCAGGGTTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACCGT
CGCCTCCGGTGGTGGTTCAGGAGGAGGAGGTTCCGGTGGTGGTTCGGACATC
GTCATGTCACAGTCTCCATCCTCCCTGGCTGTGTCAGTAGGAGAGAAGGTCACTATGAG
CTGCAGATCCAGTCAGAGTCTGTTCAACAGTAGAACCCGAAAGAAGTACTTGGACTTGGTA
CCAGCAGAAACCAGGGCAGTCTCCTAAACCGCTGATCTACTGGGCATCCACTAGGGAAT
CTGGGTCCCTGATCGCTTACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATC
AGCAGTGTGCAGGCTGAAGACCTGGCAGATTACTGCAAGCAATCTTATAATCTTCGG
ACGTTCCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAACGGG

Figura 5(d) Secuencia del scFv anti-antígeno de superficie de hepatitis (4C2)
CCATGGCCGATGTGAAGCTTCAGGAGTCAGGGCCTGAGCTGGTGAGGCCCGGGGTCTC
AGTGAAGATTACCTGCAAGGGTTCGGCTACACATTCAGTATTGCTATGCATTGGGT
GAAGCAGAGTCATGCCAAGAGTCTAGAGTGGATTGGACTTATTAGTAATTCCTTTGGTAA

ES 2 351 275 T3

TACAAACTACAACCAGAAGTTTGAGGCCAAGGCCACAATGACTGTAGACAAATCCTCCAA
CACAGGCTATTTGGAACCTGGCAGATTGACATCTGAGGATTCTGCCATCTATTACTGTGC
AAGAGTGATCGACTGGTCCTTCGATGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCT
CAGGTGGAGGCGGTTTCAGGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGGATCGGACATTGTGC
TGACCCAATCTCCAGCAATCATGTTCCGATCTCCAGGGGAGAAGGTCACCATGACCTGCA
GTGCCAACTCACGTGTCAGGTACGTGCACTGGTACCAACAGAAGTCAGGCACCTCCCC
AAAAGATGGATTTATGACACATCCAACTGGCTTCTGGAGTCCCTGCTCGCTTCAGTGGC
AGTGGGTCTGGGACCTCTCACTCTCTACAATCAGCAGCTTGGAGGCTGAAGATGCTGC
CACTTATTACTGCCAGCACTGGAGTAGTAACCCTCCCACGTTCCGGTGCTGGGACCAAGCT
GGAAATAAAACGGCGGGCCGCGAGATTATAAAGATGATGATGATAAAGCCGGGCCCATC
ACCACCATCACCATTAAGAATTCAGCCCGCCTAATG

Figura 5 (continuación)

Figura 6

GGGGACCCCTTTAGGGGGTCACCTCACACAGCAGTACTTCACTGAGTATAAGAGGACA
 TATGCCTAAATTACCGCGTGGTCTGCGTTTCGGAGCCGATAATGAAATTCCTAATGATTTT
 CAGGAGCTCTGGTTCCAGACCTCTTTATCGAATCTTCGACACGCATCCGTGGTACACA
 CTGAAGGGTCGTGTGTTGAACGCCACCTTGATGATCGTCTACCTAATGTAGGCGGTGCG
 CCAGGTAAGGCGCACTCCACATCGCGTCACCGTTCGGATTGCCTCTCAGGCCCTCGTC
 CGGTAACAACCGTTCAGTATGATCCCGCAGCACTATCGTTCCTATTGAACGCTCGTGTG
 ACTGGGATTTCCGTAATGGCGATAGTGCGAACCTTGTCATTAATGACTTCTGTTTCGCA
 CCTTTGCACCTAAGGAGTTTGATTTTTCGAACTCCTTAGTTCCTCGTTATACTCAGGCCCT
 CTCCGCGTTTAAATGCCAAGTATGGCACTATGATCGGCGAAGGGCTCGAGACTATAAATA
 TCTCGGGCTTTTACTGCGCAGACTGCGTGAGGGTTACCGCGCTGTTAAGCGTGGCGATT
 TACGTGCTCTTCGTAGGGTTATCCAGTCTACCATAATGGTAAGTGGAACCGGCTACTG
 CTGGTAATCTCTGGCTTGAATTTGTTATGGCCTTATGCCTCTCTTTTATGACATCAGAGA
 TGTCATGTTAGACTGGCAGAACCGTTCATGATAAGATTCAACGCCTCCTCGGTTTTCTGTT
 GGTCACGGCGAGGATTACGTTGTCGAATTCGACAATCTGTACCCTGCCGTTGCTTACTTT
 AAATGAAAGGGGAGATTACACTCGAACCGCGTCATCGTCATGGCATATCTTACGCTAAC
 CGCGAAGGATATGCTGTTTTGACAACGGTTCCTTCGGCCTGTGTCCGATTGGAAGGA
 GCTTGCCACTGCATTATCAATCCGCATGAAGTTGCTTGGGAGTAACTCCCTACAGCTT
 CGTTGTTGATTGTTCTTGAATGTTGGTGACATACTTGCTCAACAAGGTGAGCTATATCAT
 AATATCGATATTGTAGACGGCTTTGACAGACGTGACATCCGGCTCAAATCTTTCACCATAA
 AAGGTGAACGAAATGGGCGGCCTGTTAACGTTTCTGCTAGCCTGTCTGCTGCTCGATTAT
 TTTACAGCCGACTCCATACGAGCAATCTTCCGTTGCTACACTAGATCTTGATACTACCTT
 TAGTTCGTTTAAACACGTTCTTGATAGTATCTTTTTATTAACCCAACGCGTAAAGCGTTGA
 AACTTTGGGTCAATTTGATCATGGCAAAATTAGAGACTGTTACTTTAGGTAACATCGGGAA
 AGATGGAAAACAACTCTGGTCTCAATCCGCGTGGGGTAAATCCCCTAACGGCGTTG
 CCTCGCTTTCACAAGCGGGTGCAGTTCCTGCGCTGGAGAAGCGTGTACCGTTTCGGTA
 TCTCAGCCTTCTCGCAATCGTAAGAACTACAAGGTCCAGGTTAAGATCCAGAACCCGACC
 GCTTGCACTGCAAACGGTTCCTGTGACCCATCCGTTACTCGCCAGGCATATGCTGACGTG
 ACCTTTTCGTTACCGCAGTATAGTACCGATGAGGAACGAGCTTTTGTTCGTACAGAGCTT
 GCTGCTCTGCTCGCTAGTCTCTGCTGATCGATGCTATTGATCAGCTGAACCCAGCGTAT
 TGAACACTGCTCATTGCCGGTGGTGGCTCAGGGTCAAAACCCGATCCGGTTATTCCGGA
 TCCACCGATTGATCCGCCGCCAGGGACAGGTAAGTATACCTGTCCCTTCGCAATTTGGTC
 CCTAGAGGAGGTTTACGAGCCTCCTACTAAGAACCAGCGTGGCCTATCTATAATGCTGT
 TGAACCTCAGCCTCGCGAATTTGATGTTGCCCTCAAAGATCTTTTGGCAATACAAAGTG
 GCGTGATTGGGATTCTCGGCTTAGTTATACCAGTTCGCGGTTGCCGTTGGCAATGGTT
 ATATTGACCTTGATGCGACTTATCTTGCTACTGATCAGGCTATGCGTGATCAGAAGTATGA

TATTCGCGAGGGCAAGAAACCTGGTGCTTTCGGTAAACATTGAGCGATTCAATTTATCTTAA
 GTCGATAAATGCTTATTGCTCTCTTAGCGATATTGCGGCCATCACGCCGATGGCGTGAT
 AGTTGGCTTTTGGCGCGATCCATCCAGTGGTGGTGCCATACCGTTTGACTTCACTAAGTT
 TGATAAGACTAAATGTCCTATTCAAGCCGTGATAGTCGTTCCCTCGTGCTTAGTAACTAAGG
 ATGAAATGCATGTCTAAGACAGCATCTTCGCGTAACTCTCTCAGCGCACAAATTCGCGCGA
 GCCGCGAACACAAGAATTGAGGTTGAAGGTAACCTCGCACTTCCATTGCCAACGATTTA
 CTGTTGGCCTATGGTCAGTCGCCATTTAACTCTGAGGCTGAGTGTATTTCAATTCAGCCCG
 AGATTCGACGGGACCCCGGATGACTTTAGGATAAATTATCTTAAAGCCGAGATCATGTCCG
 AAGTATGACGACTTCAGCCTAGGTATTGATACCGAAGCTGTTGCCTGGGAGAAGTTCCCTG
 GCAGCAGAGGCTGAATGTGCTTTAACGAACGCTCGTCTATAGGCCTGACTACAGTGA
 GGATTTCAATTTCTCACTGGGCGAGTCATGTATACACATGGCTCGTAGAAAAATAGCCAA
 GCTAATAGGAGATGTTCCGTCCGTTGAGGGTATGTTGCGTCACTGCCGATTTTCTGGCG
 GTGCTACAACAACGAATAACCGTTCGTACGGTCATCCGTCCCTCAAGTTTGGCGTCCCGC
 AAGCGTGACGCCCTCGGGCTTTGAAGTATGTTTTAGCTCTCAGAGCTTCTACACATTTCCG
 ATATCAGAATTTCTGATATTAGCCCTTTAATAAAGCAGTTACTGTACCTAAGAACAGTAA
 GACAGATCGTTGATTGCTATCGAACCTGGTTGAATATGTTTTCCAACCTGGGTATCCG
 TGCCATTCTACGCGATCGGTTGCGTTGCTGGGGTATCGATCTGAATGATCAGACGATAAA
 TCAGCGCCCGGCTCACGAAGGCTCCGTTACTAATAACTTAGCAACGGTTGATCTCTCAGC
 GGCAAGCGATTCTATATCTCTTGCCTCTGTGAGCTCTTATTGCCCCAGGCTGGTTTGA
 GGTCTTATGGACCTCAGATCACCTAAGGGGGCATTGCCTGACGGTAGTGTGTTACCTA
 CGAGAAGATTTCTTCTATGGGTAACGGTTACACATTGAGCTCGAGTCGCTTATTTTTGCT
 TCTCTCGCTCGTTCCGTTTGTGAGATACTGGACTTAGACTCGTCTGAGGTCACTGTTTAC
 GGAGACGATATTTTACCCTGTGTCAGTCCCTGCCCTCCGGGAAGTTTTTAAAGTAT
 GTTGGTTTTACGACCAATACTAAAAAGACTTTTTCCGAGGGGCCGTTTACAGAGTCTGTC
 GGCAAGCACTACTATTCTGGCGTAGATGTTACTCCCTTTTACATACGTCACCGTATAGTGA
 GTCCTGCCGATTTAATACTGGTTTTGAATAACCTATATCGGTGGGCCACAATTGACGGCG
 TATGGGATCCTAGGGCCATTCTGTGTACCTCAAGTATCGTAAGTTGCTGCCTAACAGC
 TGCAACGTAATACTATACCTGATGGTTACGGTGATGGTGCCCTCGTCGGATCGGTCTTAA
 TCAATCCTTTCGCGAAAAACCGCGGGTGGATCCGGTACGTACCGGTGATTACGGACCAT
 ACAAGGGACCGAGAGCGCGCTGAGTTGGGGTGTATCTCTACGACCTTCTCTCGCGTTG
 TCTCTCGGAAAGTAACGATGGGTTGCCTCTTAGGGTCCATCGGGTTGCGATTCTGCGG
 ATCTATTTGCCATCGATCAGCTTATCTGTAGGAGTAATCCTACGAAGATAAGCAGGTCTAC
 CGGCAAAATTCGATATACAGTATATCGCGTGCAGTAGCCGTGTTCTGGCACCCCTACGGG
 TCTTCCAGGGCACGAAGGTTGCGTCTCTACACGAGGCGTAACCTGGGAGGGCGCCAATA
 TGGCGCCTAATTGTGAATAAATTATCACAATACTCTTACGAGTGAGAGGGGGATCTGCT
 TTGCCCTCTCTCTCCCGGGGATCCACTAGTTCTAGGTACTCGGGCAGCGTTGGGTCC
 TGGCCACGGGTGCGCATGATCGTGCTCCTGTGCTTGGAGACCCGGCTAGGCTGGCGGG
 GTTGCCCTTACTGGTTAGCAGAATGAATCACCGATACGCGAGCGAACGTGAAGCGACTGC

Figura 6 (continuación)

TGCTGCAAAACGCTGCGACCTGAGCAACAACATGAATGGTCTTCGGTTTCCGGTGTTCG
 TAAAGTCTGGAAACGCGGAAGTCAGCGCCCTGCACCATTATGTTCCGGATCTGCATCGC
 AGGATGCTGCTGGCTACCCCTGTGGAACACCTACATCTGTATTAACGAAGCGCTGGCATTG
 ACCCTGAGTGATTTTTCTCTGGTCCC GCCCATCCATACCGCCAGTTGTTTACCCTCACA
 ACGTTCCAGTAACCGGGCATGTTTCATCATCAGTAACCCGTATCGTGAGCATCCTCTCTCG
 TTTTCATCGGTATCATTACCCCCATGAACAGAAATCCCCCTTACACGGAGGCATCAAGTG
 ACCAAACAGGAAAAAACCGCCCTTAACATGGCCCGCTTTATCAGAAGCCAGACATTAACG
 CTTCTGGAGAACTCAACGAGCTGGACGCGGATGAACAGGCAGACATCTGTGAATCGCT
 TCACGACCACGCTGATGAGCTTACCGCAGCTGCCTCGCGCTTTCGGTGATGACGGTG
 AAAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTCACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCC
 GGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTGGCGGGTGTGGGGCGCA
 GCCATGACCCAGTCACGTAGCGATAGCGGAGTGATACTGGCTTAACTATGCGGCATCA
 GAGCAGATTGTAAGTGCAGAGTGCACCATATGCGGTGTGAAATACCGCACAGATGCGTAAG
 GAGAAAATACCGCATCAGGCGCTCTTCCGCTTCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGG
 TCGTTGCGGTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACA
 GAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAA
 CCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATC
 ACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAG
 GCGTTTTCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCCTCTCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGG
 ATACCTGTCCGCTTTCTCCCTTCCGGAAGCGTGGCGCTTCTCATAGCTCAGCTGTAG
 GTATCTCAGTTCCGGTGTAGGTCGTTCCGCTCAAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCG
 TTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGAC
 ACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTA
 GCGGGTGTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGT
 ATTTGGTATCTGCGCTGTCTGAAGCCAGTTACCTTCGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTG
 ATCCGGCAAACAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGTGTTGCAAGCAGCAGATTAC
 GCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCA
 GTGGAACGAAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTAC
 CTAGATCCTTTTAAATTAATAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAACTT
 GGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTT
 GTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCGTCTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTAC
 CATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTA
 TCAGCAATAAACAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCTGCAACTTTATC
 CGCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCCGCCAGTTAA
 TAGTTTGCACAACGTTGTTGCCATTGCTGCAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCTGTTG
 GTATGGCTTCATTACGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCCATGT
 TGTGCAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCCCTCCGATCGTTGTGAGAAGTAAGTTGGCC
 GCAGTGTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTTACTGTATGCCATCCG

Figura 6 (continuación)

TAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGC
GGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAACACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGA
ACTTTAAAAGTGCTCATCATTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACCTCTCAAGGATCTTAC
CGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAAGTATCTTCAGCATCTT
TTACTTTCACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAGG
GAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCTTTTCAATATTATTGAAG
CATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAA
CAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTCTAAGAAACCATT
ATTATCATGACATTAACCTATAAAAAATAGGCGTATCACGAGGCCCTTTCGTCTTCAAGAAT
TGGCGAACGTGGCGAGAAAGGAAGGGAAGAAAGCGAAAGGAGCGGGCGCTAGGGCGC
TGGCAAGTGTAGCGGTACGCTGCGCGTAACCACCACACCCGCCGCGCTTAATGCGCC
GCTACAGGGCGCGTCCCATTCGCCATTCAGGCTACGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCG
GTGCGGGCCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAGGGGGGATGTGCTGCAAGGCGAT
TAAGTTGGTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGAA
TTGTAATACGACTCACTATA

Figura 6 (continuación)

Figura 7a

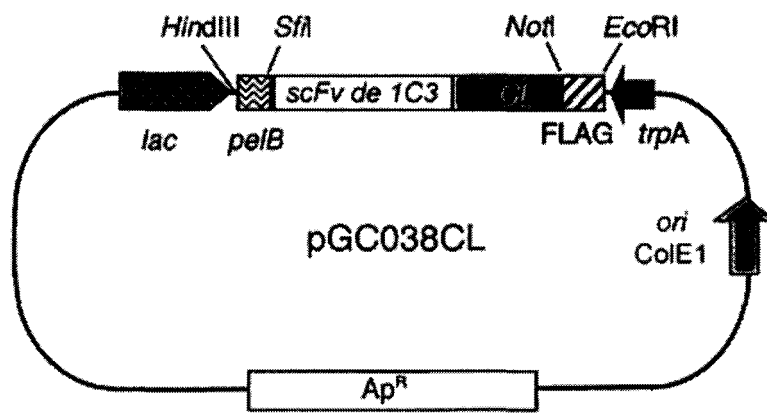
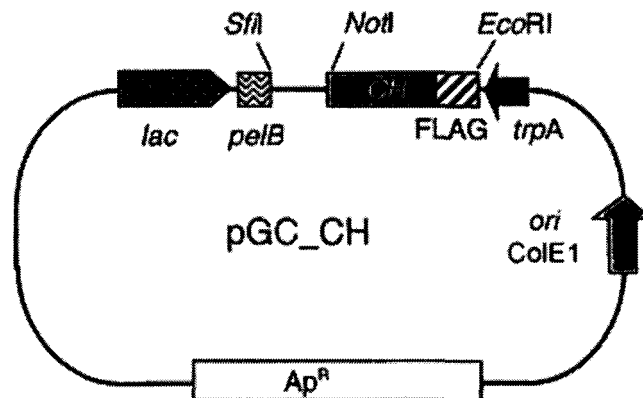


Figura 7b



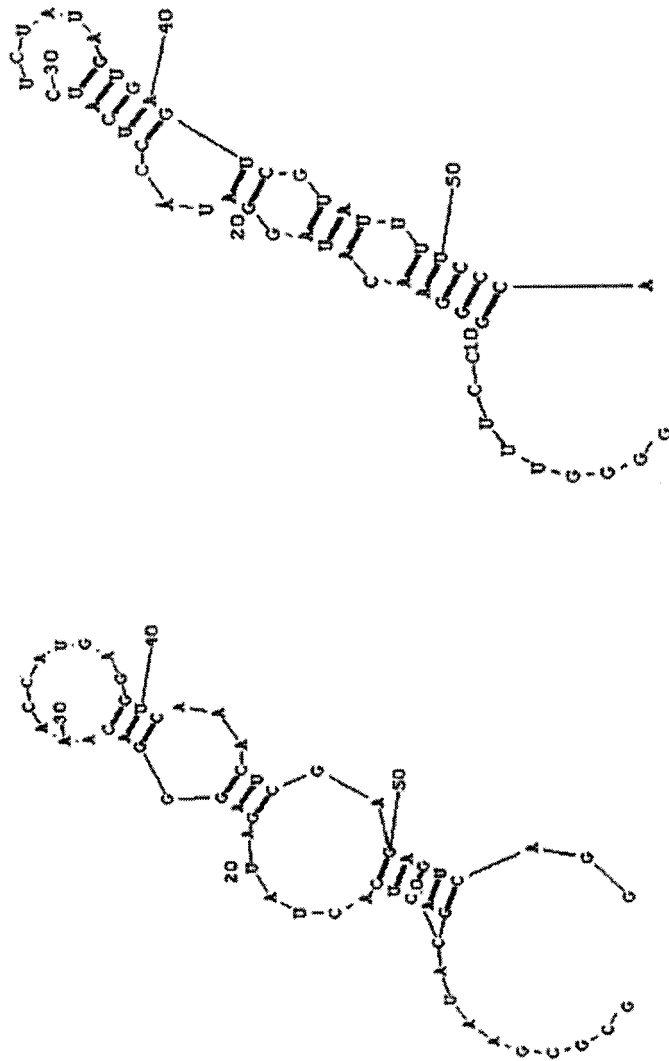


Figura 8

Figura 10

Secuencia de la NS5B (polimerasa) del VHC [1716 bases]

5'TCTATGTCGTA CTCTGGACCGGGCCCTGATAACACCGTGTAGTGT
 GAGGAGGAGAAACTGCCATCAGCCACTCAGCAACTCCTTGCTGAGAC
 ATCATAACCTAGTCTATTCAACGTCGCTAGAAGCGCTTCTCAGCGTCAG
 AGGAAGGTTACCTTCGACAGACTGCAGGTGCTCGACGACCATTACAAGA
 CTGTATTAAGGAGGTAAGGAGCGAGCGTCTAGGGTAAAGGCTCGCAT
 GCTCACCATCGAGGAAGCGTGCGCGCTCGTCCCTCCTCACTCTGCCCGG
 TCGAAATTCGGGTATAGTGCGAAGGACGTTCCGCTCCTTGTCTAGCAGG
 CCATTAACCAGATCCGCTCCGCTCTGGGAGGACTTGCTAGAAGACACCAC
 AACTCCAATTCCAACCAACCATCATGGCGAAGAACGAGGTGTTTTGTGTGG
 ACCCCGCTAAAGGGGGCCGCAAGCCCGCTCGCCTTATCGTGTACCCCTGA
 CCTGGGGGTTCTGTCTGCGAGAAAACGCGCCCTATATGACGTGATACAG
 AAGTTGGCAATTGAGACGATTGGTTCTGCTTACGGATTCCAATACTCGCC
 TCAACAGCGGGTCGAACGTCGCTCAAGATGTGGACCTCAAAGAAAACC
 CCCTTGGGGTTCTCGTATGACACCCGCTGCTTTGACTCAACTGTCACTGA
 ACAGGACATCAGGGTGAAGAGGAGATATAACCAATGCTGCAACCTTGAA
 CCGGAGGCCAGGAAAGTGATCTCCTCCCTCACGGAGCGGGCTTTACTGCG
 GGGGCCCTATGTTCAACAGCAAGGGGGCTCAGTGTGGTGACCGTCTGTG
 CCGTGCCAGTGGAGTTTTGCCTACCAGCTTTGGCAATACAATCACTTGTT
 ACATCAAAGCCACAGCGGCTGCGAACGGCGCAGGCCTCCGGGACCCGGA
 CTTTCTGTCTGCGGAGATGATCTGGTCTGGTGGCCGAGAGTGACGGC
 GTCGATGAGGATGGGGCAGCCCTGAGAGCCTTACGGAGGCTATGACCA
 GGTATTCTGCTCCACCCGAGATGCTCCACAGCCCACCTACGACCTTGA
 GTCATCACATCTTGCTCCTCCAACGTCCTCGTGACGCGGACGACAAG
 GGGAGGAGTACTATTACCTCACCCGTGATGCCACCACTCCCCTAGCCC
 GTGCGGCTTGGGAAACAGCTCGTCACTCCAGTTAACTCCTGGTTAGG
 TAACATCATATGTACGCGCTACCATCTGGGTGCGCATGGTAATGATGA
 CACACTTTTTCTCCATACTCCAATCCCAGGAGATACTTGATCGACCCCTT
 GACTTCGAAATGTACGGGGCCACTTACTCGGTACGCGCGCTGGATTTAC
 CAGCAATCATTGAAAGACTCCATGGTCTAAGCGCGTTACCGCTCCACAGT
 TACTCTCCAGTAGAGCTCAATAGGGTCGCGGGGACACTCAGGAAGCTGG
 GGTGCCCCCCTACGAGCTTGGAGACATCGGGCACGAGCAGGGCGCGC
 TAAGCTTATCGCCAGGGAGGGAAGGCCAAAATATGCGGCCTTTATCTC
 TTTAATTGGGCGGTACGCACCAAGACCAAACTCACTCCGCTGCCACGCG
 CTGGCCAGTTGGATTTATCCATCTGGTTTACGGTTGGCGTGGCGGGAA
 CGACATTTATCACAGCGTGTCCGCTGCCCGAACCCGCTATTAG 3'

ES 2 351 275 T3

Figura 11

N5266 GCG CGA ATA CGA CTC ACT ATA GAG GGA CAA ACC GCC ATG GCC GAG GTG
AGG CTT CTT GAG TCT GG

N5267 CAT CAT CAT CAT CTT TAT AAT CTG CGG CCG CAC ACT CTC CCC TGT TGA
AGC TCT TGA C

N5268 CCC CTG TTG AAG CTC TTG ACA ATG GGT GAA GTT GAT GTC TTG TGA GTG
GCC TCA CAG

N5269 CTT GTG AGT GGC CTC ACA GGT ATA GCT GTT ATG TCG TTC ATA CTC G

N5343 ACC ATG ATT ACG CCA AGC TCT AAT ACG ACT CAC TAT AGG GAA AGC TCG
CTT GTT C

N5344 AGG GAA AGC TCG CTT GTT CTT TTT GCA GAA GCT CAG AAT AAA CGC TCA
ACT TTG GCC ACC

N5353 TTT ATA ATC TGC GGC CGC CGC CTC GTG TAG AGA CGC AAC

N5354 TTA CTC GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC ATG TCT AAG ACA GCA TCT TCG

N5659 GC AGC TAA TAC GAC TCA CTA TAG GAA CAG ACC ACC ATG GAC GTG GCC
CAG CCT GCT GTG G

N5384 AAA CGC TCA ACT TTG GCC ACC ATG GAT GTG AAG CTT CAG GAG TCT GGG
CC

N5385 GCC CTT GGG CCG GGA GAT GGT CTG CTT CAG TGG CGA GGG CAG GTC
TGT GTG

N5386 CGA GGG CAG GTC TGT GTG GGT CAC GGT GCA CGT GAA CCT CTC CCC
GGA G

N5387 CGT GAA CCT CTC CCC GGA GTT CCA GTC ATC CTC GCA GAT GCT GGC CTC
ACC

N5517 GCG CGA ATA CGA CTC ACT ATA GAG GGA CAA ACC GCC ATG GCC GAT GTG
AAG CTT CAG GAG TCA GG

N5659 GC AGC TAA TAC GAC TCA CTA TAG GAA CAG ACC ACC ATG GAC GTG GCC
CAG CCT GCT GTG G

N5904 TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA AAG GGT TTC TCC GAT CCG GGA ACA TAG
GAT ACC

N5909 TGA GGT ATC CTA TGT TCC CGG ATC GGA GAA ACC CAC ACT CTC CCC TGT
TGA AGC TCT TGA C

N5910 CCG GGA ACA TAG GAT ACC TCA ACC ACC ATG GCC GAG GTG AGG CTT CTT
GAG TCT GG

Figura 12
Expresión de la Q Beta replicasa

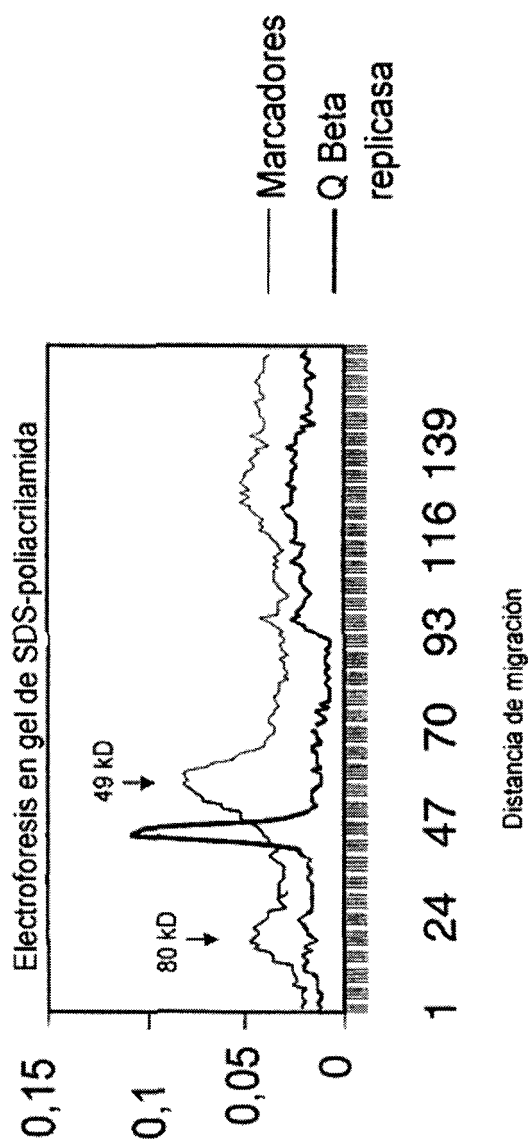


Figura 13

Traducción en sistema libre de células de reticulocitos de conejo: efecto de la Q β replicasa sobre la transcripción/traducción acopladas de 1C3

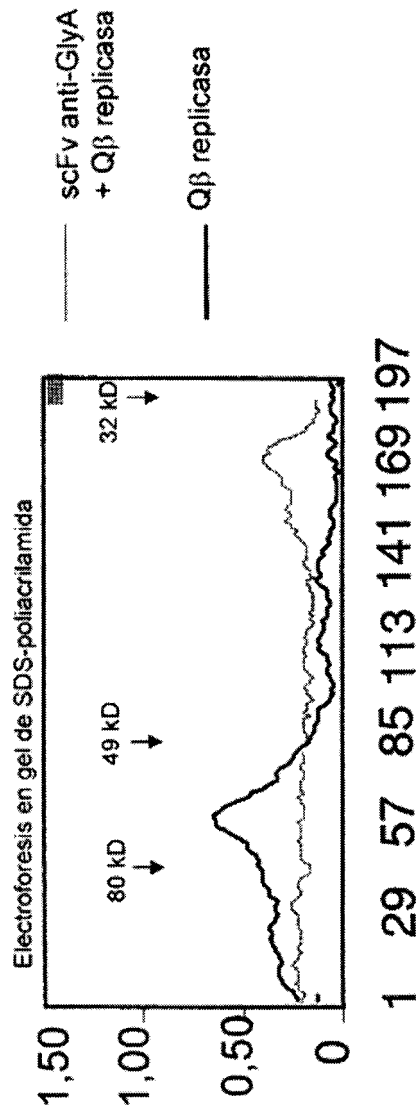


Figura 14

Nombre de la secuencia	Forma de Q β Replicasa	Mutación encontrada
A1	No se incluyó	Ninguna
A2	No se incluyó	Ninguna
A3	No se incluyó	Ninguna
A4	No se incluyó	Ninguna
A5	No se incluyó	T149C
A6	No se incluyó	Ninguna
B1	Purificada	A134G
B2	Purificada	A279G
B3	Purificada	Ninguna
B4	Purificada	Ninguna
B5	Purificada	T89C; G98C; A172C; T244C; A251C
B6	Purificada	Ninguna
C1	pCDNAQ β	T59C; A129G; A160G
C2	pCDNAQ β	Ninguna
C3	pCDNAQ β	A30C; G82A;
C4	pCDNAQ β	Ninguna
C5	pCDNAQ β	Ninguna
C6	pCDNAQ β	A257G

Figura 15

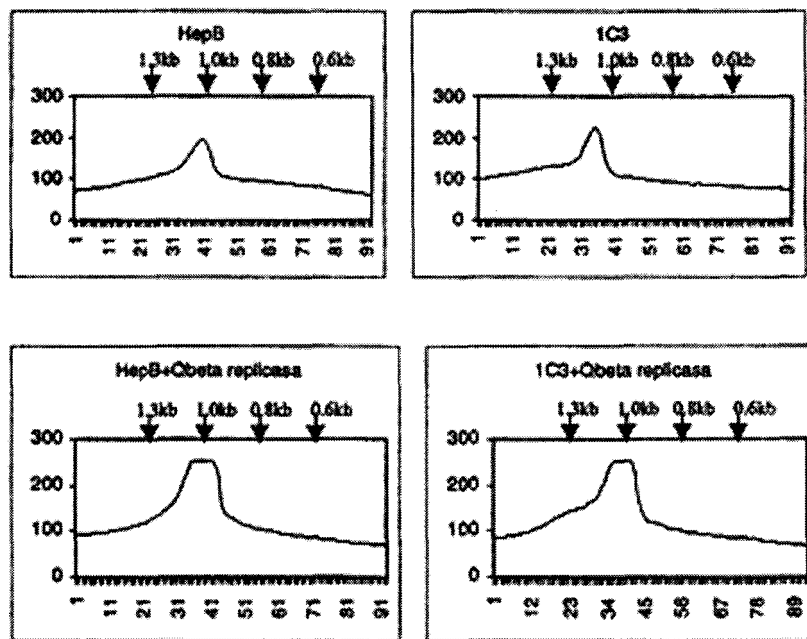


Figura 16

Mutación del ARN replicado por polimerasas dependientes de ARN: Lista de mutaciones representativas elegidas al azar

Región codificante; n.º de clon	Replicasa	Mutaciones
G1 (scFv anti-GlyA 1C3)	Ninguna	Ninguna
G2	Q β purificada	G124C, T234C, T329C, G367C, C379T, G385A
G3	Q β purificada	T507G, delección de C527, C543T, C557T
G4	Q β purificada	G136A, inserción de 141 A, -184G, G216A, delección de G330, G429A, C506T, T634C
G5	Q β purificada	C208A, G210C, -211G, C213T, G320A, C403T, C597A
G6	Q β purificada	Delección de 120-441, A440G, G605A.
G7	Q β purificada	A475T, A580C,
G8	Q β purificada	A23C, G23A, G25A, G29A, G109A, G322A, C398T
G9	Q β purificada	G151T, delección de C221, C237T, C249T,
HB1 (scFv anti-Hepb 4C2)	Ninguna	Ninguna
HB2	Q β purificada	G239C, G486T, G354C,
HB3	Q β purificada	A205C, T304G
HB4	Q β purificada	A208C, G274C, delección de T282, delección de T285, delección de G328, sustitución de secuencia irrelevante en G338-C350
HB5	Q β purificada	T397G, G398A,
HB6	Q β purificada	T561C
GC1 (scFv anti-GlyA 1C3)	pCDNAHepC	C57T, G221A, C557T
GC2	HepC purificada	Delección de 110-162
GC3	HepC purificada	Delección de 77-165
GC4	HepC purificada	C353A, C366T,

Figura 17

Mapa del vector pGE-lysN, fuente de NS5B
(secuencia de ARN polimerasa dependiente de ARN de hepatitis C)

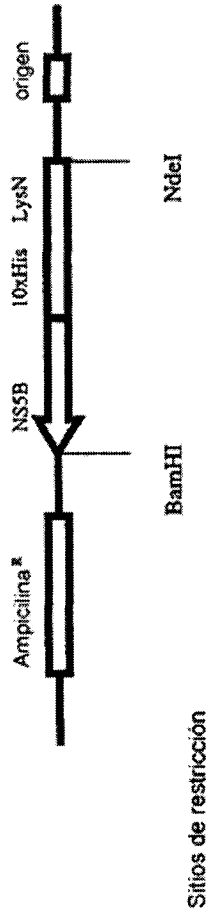
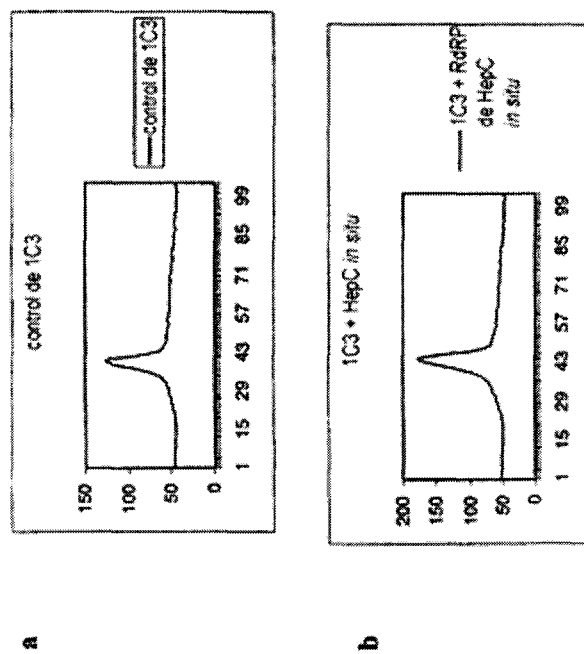


Figura 18
Efecto de RdRP de hepatitis C expresada *in situ* sobre el molde de ARN de scFv 1C3 en la reacción acoplada: RT-PCR



ES 2 351 275 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> CRC para Diagnostic Technologies
<120> Evolución *in vitro* en una etapa continua
5 <130> 91662
<140>
<141>
10 <160> 26
<170> PatentIn Ver. 2.1

SEQ ID NO: 1
15 <211> 318
<212> ADN
<213> Secuencia de inmunoglobulina de murino
<220>
20 <223> Descripción de secuencia: Región constante de anticuerpo de ratón 1C3

<400> 1

25
gotgatgctg caccactgt atccatcttc ccaccatcca gtgagcagtt aacatctgga 60
gggtgectcag tegtgtgett cttgaacaac tctacccca aagacatcaa tgtcaagtgg 120
aagattgatg gcagtgaacg acaaaatggc gtcctgaaca gttggactga tcaggacagc 180
30 aaagacagca cctacagcat gagcagcacc ctcacgttga ccaaggacga gtatgaacga 240
cataacagct atacctgtga ggccactcac aagacatcaa cttcaccatc tgtcaagagc 300
ttcaacaggg gagagtgt 318

35 SEQ ID NO: 2
<211> 2004
<212> ADN
40 <213> *Homo sapiens*
<220>
<223> Descripción de secuencia: Región constante de anticuerpo humano 1C3

45 <400> 2

50 gcagatcaag acacagccat cggggtcttc gccatccccc cctcctttgc cagcatcttc 120
ctcaccaagt ccaccaagtt gacctgectg gtcacagacc tgaccacctc tgacagcgtg 180
accatctctt ggaccgcca gaatggcga gctgtgaaaa cccacaccaa catctccgag 240
agccaccca atgcacttt cagcgccgtg ggtgaggcca gcatctgcga ggatgactgg 300
aattccgggg agaggctcac gtgcaccgtg acccacacag acctgcctc gccactgaag 360
55 cagaccatct cccggcccaa gggc

SEQ ID NO: 3
<211> 748
60 <212> ADN
<213> *Homo sapiens*
<220>
<223> Descripción de secuencia: SCFV antiglicoforina 1C3
65

ES 2 351 275 T3

<400> 3

```

atggccgagg tgagccttct tgagtctgga ggtggccgg tacaacctgg aggatccctg 60
aaactctcct gtgcagcctc aggattcgat tttagtagat actggatgaa ttgggtccgg 120
5 cgggctccag ggaaggggct agagtggatt ggagaaatta atcaacaaaag cagtacgata 180
aactattcgc cacctctgaa ggataaatc atcatctcca gagacaacgc caaaagtacg 240
ctgtacctgc aaatgaacaa agtgagatct gaggacacag cctttatta ttgtgcaaga 300
ctttctctta ctgcgacagg gtttgcttac tggggccaag ggaactctgt cacogtccgc 360
tccgggtggtg gtgggtccagg aggaggaggt tccgggtggtg gtgggttogga catogtcatg 420
10 tcacagtcctc catcctccct ggctgtgtca gtaggagaga aggtcactat gagctgcaga 480
tccagtcaga gtctcttcaa cagtagaacc cgaagaact acttgacttg gtaccagcag 540
aaaccagggc agtctcttaa accgctgac tactgggcat ccaactagga atctggggtc 600
cotgatcgt tcacagcag tggatctgg acagattca ctctaccat cagcagtg 660
caggtgaag acctgacaga ttattactgc aagcaatctt ataactctcg gacgttcgg 720
15 ggaggcacca agctgcaaat caaacggg 748

```

SEQ ID NO: 4

<211> 807

20 <212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<220>

25 <223> Descripción de secuencia: SCFV anti-antígeno de superficie de hepatitis (4C2)

<400> 4

```

ccatggccga tgtgaagctt caggagtcag ggctgagct ggtgaggcc ggggtctcag 60
tgaagattac ctgcaagggt tccggctaca cttcactga ttatgctatg cattgggtga 120
30 agcagagtca tgcacagagt ctagagtgga ttggacttat tagtaattcc tttggtaata 180
caaaactaaa ccagaagttt gaggccaagg ccacaatgac tgtagacaaa tctccaaca 240
caggctatctt ggaacttggc agattgacat ctgaggatc tgcctctat tactgtgcaa 300
gagtgatcga ctggtctctc gatgtctggg gccaaaggac cacggtcacc gtctctctcag 360
35 gtggaggcgg ttcaaggcga ggtggctctg gcgggtggcg atcggacatt gtgctgacc 420
aatctccagc aatcatgttc gcctctccag gggagaagg caccatgacc tgcagtgcca 480
actcacgtgt caggtaagtg cactggtacc aacagaagtc aggcacctcc cccaaaagat 540
ggattttatg cacatcaaaa ctggctctc gagtccctgc tcgcttcagt gccagtggt 600
ctgggacctc tcaactctc acaatcagca gcttggagc tgaagatgct gccacttatt 660
40 actgccagca ctgggtatg aacctccca cgttcggtgc tgggaccaag ctggaaataa 720
aacgggcggc cgcagattat aaagatgat atgataaagc cggggcccat caccacctc 780
accattaaga attcagcccg cctaatt 807

```

SEQ ID NO: 5

45 <211> 7489

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

50 <223> Descripción de secuencia artificial: Plásmido artificial pERT7Q beta

<400> 5

```

ggggacccc tttaggggtt cactcacac agcagtaett cactgagtat aagaggacat 60
atgcctaaat taccgtgtgg tctgcgttct ggagccgata atgaaattct taatgatttt 120
caggagctct ggtctccaga cctctttatc gaattctccg acacgcctcc gtggtaaca 180
ctgaagggtc gtgctctgaa cgcaccaact gatgatctgc taactaatgt aggcggctgc 240
caggaaaagg gcaactcaca tccgctcacc gttccgattg cctcttcagg ccttgcctcc 300
60 gtaacaaccg ttcagtatga tcccgacga ctatcgttct tattgaaagc tctgtgtgac 360
tgggatttcg gtaactggca tagtgcaaac cttgtcatta atgactttct gtttcgcacc 420
tttgcaacta aggagtttga tttttcgaac tcttagtctc ctctgttata tcaggccttc 480
tccgcgttta atgctaagta tggcactatg atcggcgaag ggctcagac tataaataat 540
65 ctccggcttt tactgacag actgcgtgag ggttacccgc ctgttaagcg tggcgattta 600

```

ES 2 351 275 T3

5
 10
 15
 20
 25
 30
 35
 40
 45
 50
 55
 60
 65

```

cgtgctcttc gtagggttat ccagtcctac cataatggta agtggaacc ggctactgct 660
ggtaatccct gcttgaatt tcgttatggc cttatgcctc tctttatga catcagagat 720
gtcatgtagt actggcagaa ccgtcatgat aagattcaac gcctccttcg gttttctggt 780
ggtcacggcg aggattacgt tgtcgaattc gacaatctgt accctgccgt tgcctacttt 840
aaactgaaag gggagattac actcgaacgc cgtcatcgtc atggcataatc ttacgctaac 900
cgcgaaggat atgctgtttt cgacaacggf tcccttcggc ctgtgtccga ttggaaggag 960
cttgccaactg cttcatcaa tccgcatgaa gttgcttggg agttaactcc ctacagcttc 1020
gttgttgatt ggttcttga tttgttgtag atacttgcct aacaaggcca gctatatcat 1080
aatatcgata ttgtagacgg ctttgacaga cgtgacatcc ggctcaaatc tttcaccata 1140
aaagggtgaac gaaatgggcy gectgttaac gtttctgcta gcctgtctgc tgtogattta 1200
ttttacagcc gactccatac gagcaatctt ccgttcgcta cactagatct tgatactacc 1260
tttagttcgt ttaaacacgt tcttgatagt atctttttat taaccacaag cgtaaagcgt 1320
tgaanctttg ggtcaatttg atcatggcaa aattagagac tgttacttta ggtaacatcg 1380
ggaaagatgg aaaacaaact ctggtcctca atccgcgtgg ggtaaatccc actaacggcg 1440
ttgcctcgtt ttccaacggc ggtgcagttc ctgctgtgga gaagcgtgtt accgtttcgg 1500
tatctcagcc tctcgcgat cgtaaagaat acaaggcca ggtaagatc cagaaccccg 1560
ccgcttgccac tgcaaacggf tcttgtgacc catcggttac tgcctagcca tatgctgacg 1620
tgaccttttc gttcagcag tatagtaacc atgaggaacg agcttttgtt cgtacagagc 1680
ttgctgctct gctcgttagt cctctgctga tccgatctat tgatcagctg aaccacggct 1740
attgaacact gctccttgcg ggtggtggct cagggtcaaa acccgatccg gttattccgg 1800
atccaccgat tgatccggcg ccagggacag gtaagtatac ctgtcccttc gcaatttggf 1860
ccctagagga ggttaccgag cctcctacta agaaccgacc gtggcctatc tataatgctg 1920
ttgaaactcca gectcgcaaa tttgatggtt cctcaaaaga tcttttgggc aatacaaaat 1980
ggcgtgattg ggattctcgg cttagttata ccacgttccg cggttgcggt ggcaatggtt 2040
atattgacct tgattcagct tatcttgcta ctgacagcc tatgctgatc cagaagtatg 2100
atattcgcga gggcaagaaa cctgggtcct tcggtaacat tgagcagatc atttatctta 2160
agtcgataaa tgctcattgc tctcttagcg atattgcggc ctatcagccc gatggcgtga 2220
tagttggcct ttggcgcgat ccatccagtg gttggtgccat accgtttgac ttcactaaat 2280
ttgataagac taaatgtcct attcaagccg tgatagtcgt tccctcgtct tagtaactaa 2340
ggatgaaatg catgcttaag acagcatctt cggcgttaact tctcagcgra caattgcgcc 2400
gagccgcgaa cacaaqaatt gaggttgaag gtaacctcgc actttccatt gcccaacgat 2460
tactgtttgc ctatggtcag tgccattta actctgagge tgaagtatc tccattagcc 2520
cgagattcgc cyggaacccc gatgacttta ggataaatta tcttaaagcc gagatcatgt 2580
cgaagtatga cgaactcagc ctaggfatty ataccgaagc tgttgcctgg gagaagttcc 2640
tgccagcaga ggtgfaatgt gcttfaacga acgctcgtct ctataggcct gactacagtg 2700
aggatttcaa tttctcactg ggcgagtcac gtatacacat ggctcgtaga aaaatagcca 2760
agctaatagg agatgctccg tccgttgagg gtatggttgc tcaactgccga ttttctggcg 2820
gtgctacaac aacgaataac cgttcgtaag gtcatacgtc ctcaagttt gcgcctccgc 2880
aagcgtgtac gectgggct ttgaagtatg ttttagctct cagagcttct acacattctg 2940
atattcgaat ttctgataat agccctttta ataaagcagt tactgtacct aagaacagta 3000
agacagatcg ttgtattgct atcgaacctg gttggaatat gtttttccaa ctgggtatcg 3060
gtggcattct acgcyatcgg ttgctgtgct ggggtatcga tctgaatgat cagacgataa 3120
atcagcgcgg cgtcaccgaa ggetccgtta ctaataactt agcaacggtt gatctctcag 3180
cggcaagcga ttctatatct ctbgccctct gtagctctt attgccccca ggtggtttg 3240
aggttcttat ggacctcaga tcacctaaag ggogattgoc tgacggtagt gttgttacct 3300
acgagaagat tctctctatg ggtaacgggt acacattcga gctcagatcg ctlatttttg 3360
cttctctcgc tctgtccggt tgtgagatac tggacttaga ctcgtctgag gtcactgttt 3420
acggagacga tattatttta ccgtcctgtg cagtcctcgc cctccgggaa gtttttaagt 3480
atgttgggtt tacgaccaat actaaaaaga ctttttccga ggggcccgtc agagagtcgt 3540
ggcgcaagca ctactattct ggcgtagatg ttactccctt ttacatacgt caccgtatag 3600
tgagtcctgc cgatttaata ctggttttga ataacctata tccgtgggcc ncaattgacg 3660
gcgtatggga tccatgggccc cttctctgtt acctcaagta tccgaagttg ctgcctaaac 3720
agctgcaacg taatactata cctgatgggt acgggtgatg tgcctcgtc ggtcggctcc 3780
taatcaatcc tttcgcgaaa aaccgcgggt ggatccggta cgtaccggtg attacggacc 3840
atacaaggga ccgagagcgc cctgagttgg ggtcgtatct ctacgacctc tctcgcgctt 3900
gtctctcgga aagtaacgat gggttgcctc ttagggttcc atcgggttgc gattctgcgg 3960
atctatttgc catcyatcag cttatctgta ggagtaatcc tacgaagata agcaggtcta 4020
ccggcaaatc cgatatacag tatatcgcgt gcagtagccg tgttctggca cctacgggg 4080
tottccaggg caccaaggtt gctctctac acgagggcta acctgggag ggcgcaatat 4140
ggcgcctaat tgtgaataaa ttatcacaat tactcttacc agtgagaggg ggtctgctt 4200
tgcctctctc cctccgggg gatccactag ttctaggtac tccggcagcg ttgggtctcg 4260
  
```

ES 2 351 275 T3

```

gccacgggtg cgcatgatcg tgcctcctgt gttgaggacc cggctaggct ggagggggtg 4320
ccttaactggt tagcagaatg aatcaccgat acgcgagcga acgtgaagcg actgctgctg 4380
caaaacgctt cgcacctgag caacaacatg aatggctctt cggttccctg tttcgtaaag 4440
tctggaaaacg cggaaagtac cgccttcac cttatgttc cggatctgca tcgcaggatg 4500
5 ctgctggcta cctcgggaa cacctacatc tgtattaacg aagcgcctggc attgacctg 4560
agtgatcttt ctctgggtccc gccgcateca taccgccagt tgtttacctt cacaacgttc 4620
cagtaaccgg gcatcttcat catcagtaac ccgtatcgtg agcatcctct ctcgtttcat 4680
cggtatcatt acccccattg acagaaatcc ccccttacac ggaggcatca aytgaccaa 4740
10 caggaaaaaa ccgcccttaa catggcccgc tttatcagaa gccagacatt aacgctctctg 4800
gagaaactca acgagctgga cgcggatgaa caggcagaca tctgtgaatc gcttcacgac 4860
cacgctgatg agctctaccg cagctgcctc gcgcgttttc gtgatgacgg tgaaaacctc 4920
tgacacatgc agctcccgga gacggtcaca gcttgtctgt aagcggatgc cgggagcaga 4980
caagcccgtc agggcgcgtc agcgggtgtt ggcgggtgtc ggggcgcagc catgacctag 5040
15 tcacgtagcg atagcggagt gtatactggc ttaactatgc gccatcagag cagattgtac 5100
tgagagtgca ccatacggcg tgtgaaatac cgcacagatg cgtaaaggaga aatcaccgca 5160
tcaggcgcctc ttcctcttcc tcgctcactg actcgcctgc ctcggctggtt cggctgcggc 5220
gagcggctac agctcactca aaggcggtaa tacggttatc cacagaatca ggggataact 5280
caggaaagaa acgagctgga aaaggccag aaaaaggcag gaaccgtaaa aaggcctcgt 5340
20 tgcggcgctt tttccatagg ctccgcccc ctagcagca tcacaaaaat cgcgctcaa 5400
gtcagagggtg gcgaaacccg acaggactat aaagatacca ggcgtttccc cctggaagct 5460
ccctcgtgcg ctctctgttt ccgacctgc cgtttaccgg ataactgtcc gctttctctc 5520
cttcgggaag cgtggcgctt tctcatagct cacgctgtag gtatctcagt tcgggttagg 5580
tcgttcgctc caagtcgggc tgtgtgcacg aacccccctg tcagcccagc cgtcgcctct 5640
25 tatccggtaa ctatcgtctt gagtccaacc cggtaagaca cgaactatcg ccactggcag 5700
cagccactgg taacaggatt agcagagcga ggtatgtagg cggtyctaca gattcttga 5760
agtgttgccc taactacggc tcaactagaa ggacgtatt tggtatctgc gctctgctga 5820
agccaqctac cttcggaaaa agagttggtg gctctgtatc cggcaaaaca accaccgctg 5880
gtagcgggtg tttttctgtt tgcaagcagc agattacgcg cagaaaaaaa ggatctcaag 5940
30 aagatccttt gatctctctt acggggctct acgctcagtg gaacgaaaac tcacgttaag 6000
ggattttggt catgagatta tcaaaaagga tcttcaccta gatcctttta aattaaaaat 6060
gaagttttaa atcaatctaa agtatatatg agtaaacctg gtctgacagt taccaatgct 6120
taactcagtga ggcacctatc tcagcgatct gtctatttcg ttcacctata gttgctgac 6180
tccccgcctg tagataaact acgatacggg agggcttacc atctggcccc agtctgctca 6240
35 tgataccgcg agaccacgc tcaccggctc cagatttacc agcaataaac cagccagccg 6300
gaagggccga gcgcagaagt ggtcctgcaa ctctatccgc ctccatccag tctattaatt 6360
gttgccggga agctagagta agtagttcgc cagttaatag tttgcgcaac gttgttgcca 6420
ttgctgcagg catcctgggtg tcacgctcgt cgtttgggat ggcctcattc agctccgggt 6480
40 cccaacgatc aaggcgagtt acatgatccc ccattgtgtg caaaaaagcg gttagctcct 6540
tcggctctcc gatcgttctc agaagtaagt tggccgcagt gttatcactc atggttatgg 6600
cagcactgca taattctctt actgtcatgc catccgtaag atgctttctt gtgactggtg 6660
agtactcaac caagtcattc tgagaatagt gtatgcggcg accgagttgc tcttgcccgg 6720
cgtcaacacg ggataatacc gcgccacata gcagaacctt aaaagtgtct atcattggaa 6780
45 aacgttcttc ggggcgaaaa ctctcaagga tcttaccgct gttgagatcc agttcgatgt 6840
aaccccactc tgcaaccaac tgatcttcag catcttttac tttcaaccag gtttctgggt 6900
gagcaaaaac aggaaggcaa aatgccgcaa aaaagggaat aagggcgaca cggaaatggt 6960
gaatactcat actcttctct tttcaatatt attgaagcat ttatcagggt tattgtctca 7020
tgagcggata cataattgaa tgtattttaga aaaataaaca aataggggtt ccgcgcacat 7080
50 tccccgaaa agtgcacctc cagctctaag aaaccattat tatcatgaca ttaacctata 7140
aaaaataggcg tatcacgagg cctttctgtc ttcaagaatt ggcgaacgtg gcgagaaagg 7200
aagggaagaa agcgaaggga gcgggcgcta gggcgtggc aagtgtagcg gtcacgctgc 7260
gcgtaaccac cacatccgcc gcgcttaatg cgcgcctaca gggcgcgtcc cattegccat 7320
tcaggctacg caactgcttg gaaggcgat cggctcgggc ctctctcgta ttaocccagc 7380
55 tggcgaaggg gggatctgct gcaaggcgat taagttgggt aacgccaggg ttttcccagt 7440
cacgacgttg taaaacgacg gccagtgaat tgaatacga ctcaactata 7489

```

SEQ ID NO: 6

60 <211> 1716

<212> ADN

<213> Virus de la hepatitis C

<220>

65 <223> Descripción de secuencia: NS5B del virus VHC

ES 2 351 275 T3

<400> 6

```

tctatgtcgt actcttggac cggcgccctg ataacaccgt gtagtgtcga ggaggagaaa 60
ctgcccatac gcccaaccag caactccttg ctgagacatc ataaccctagt ctattcaacg 120
5 tgcgtctagaa gcgctctctca gcgtcagagg aaggttacct tcgacagact gcagggtgctc 180
gacgaccatt acaagactgt attaaaggag gtaaaggagc gacgctctag ggtaaaggct 240
cgcatgctca ccattcaggga agcgtgcgag ctgctccctc ctcaactctgc ccggtcgaaa 300
ttcgggtata gtgcgaagga cgttcgctcc ttgtctagca gggccattaa ccagatccgc 360
tcgctctggg aggacttggc agaagacacc acaactccaa ttccaaccac catcatggcg 420
10 aagaacgagg tgtttctgtg ggaccccgct aaagggggcc gcaagccgac tcgccttacc 480
gtgtaccctg acctgggggc tcgtgtctgc gagaaacgag ccctatatga cgtgatacag 540
aagttggcaa ttgagccgat tggttctgct tacggattcc aatactcgcc tcaacagcgg 600
gtcgaaacgt tgctcaagat gtggaacctc aagaaaaccc ccttggggtt ctcgtatgac 660
acctcctgct ttgactcaac tgtcaactgaa caggacatca ggggtggaaga ggagatatac 720
15 caatgctgca accttgaacc ggaggccagg aaagtgatct cctccctcac ggagcggctt 780
tactgcgggg gccctatggt caacagcaag ggggctcagt gtggtgaccg tcgttgccgt 840
gccagtgagg ttttgcctac cagctttggc aatacaatca cttgtttacat caaagccaca 900
gcggctgcga acggcgcagg cctccgggac cggacttctc ttgtctgagg agatgatctg 960
gtcgtggtgg ccgagsgtga cggcgtogat gaggatgggg cagccctgag agccttcacg 1020
20 gaggetatga ccaggctatc tgcctcaccg ggagatgctc cacagcccac ctacgacctt 1080
gagctcatca catctctgct ctccaacgct ccgctggcac gggacgacaa ggggaggagg 1140
tactattacc tcacctgta tgccaccact cccctagccc gtgcggcttg ggaaacagct 1200
cgtcacactc cagtttaact ctggttaggt aacatcatca tgtacgcgcc taccatctgg 1260
25 gtgcgcattg taatgatgac acaacttttc tccatactcc aatcccagga gatacttgat 1320
cgaccccttg acttcgaaat gtacggggcc acttactcgg tcacgcctgt ggatttacca 1380
gcaatcattg aaagatccca tggctcgaag gcgttcacgc tcacagtta ctctccagta 1440
gagctcaata gggtcgcggg gacactcagg aagctggggg gccccccct acgagcttgg 1500
agacatcggg caccgpcagg gcgcgctaag cttatcgccc agggagggaa ggccaaaata 1560
30 tcggcccttt atctctctaa ttgggcggta cgcaccaaga ccaaaactcac tcgctgcca 1620
cgcctyggc agttcgatct atccatctgg tttacggtg gcgtcggcgg gaacgacatt 1680
taccacagcg tgtccgctgc ccgaacccgc tatttag 1716

```

SEQ ID NO: 7

```

35 <211> 65
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
40 <223> Descripción de secuencia artificial: Cebador artificial

```

<400> 7

```

45 gcgcgaatac gactcactat agagggacaa accgccatgg ccgaggtgag gcttcttgag 60
tctgg 65

```

SEQ ID NO: 8

```

50 <211> 58
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
55 <223> Descripción de secuencia artificial: Cebador artificial

```

<400> 8

```

60 calcatcacc atctctctaa tctgnggccc cacactctcc cctggtgaag ctcttgac 58

```

SEQ ID NO: 9

```

65 <211> 57
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

```

ES 2 351 275 T3

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Cebador artificial

5 <400> 9

ccctgttga agctcttgac aatgggtgaa gttgatgtct tgtgagtggc ctcacag 57

10 SEQ ID NO: 10

<211> 46

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Cebador artificial

20 <400> 10

cttgtgagtg gcctcspagg tatagctgtt atgtcgttca tactcg 46

25 SEQ ID NO: 11

<211> 55

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

30 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Cebador artificial

<400> 11

35

accatgatta cgccaagctc taatagcact cactataggg aaagctcgct tgbtc 55

40 SEQ ID NO: 12

<211> 60

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

45 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Cebador artificial

<400> 12

50

agggaaagct cgcttctct tttgcagaa gtcagaata aacgctcaac tttggccacc 60

55 SEQ ID NO: 13

<211> 39

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

60 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Cebador artificial

<400> 13

65

tttataatct ggggagccg cctcgtgtag agaagcaac 39

ES 2 351 275 T3

- SEQ ID NO: 14
<211> 48
<212> ADN
5 <213> Secuencia artificial
<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Cebador artificial
10 <400> 14

ttactcgggg cccagccggc catggccatg tctaagacag catcttcg 48
- 15 SEQ ID NO: 15
<211> 60
<212> ADN
20 <213> Secuencia artificial
<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Cebador artificial
25 <400> 15

gcagctaata cgactcacta taggaacaga ccaccatgga cgtggcccag cctgctgtgg 60
- 30 SEQ ID NO: 16
<211> 50
<212> ADN
35 <213> Secuencia artificial
<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Cebador artificial
40 <400> 16

aaacgctcaa ctttgccac catggatgtg aagcttcagg agtctgggcc 50
- 45 SEQ ID NO: 17
<211> 51
<212> ADN
50 <213> Secuencia artificial
<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Cebador artificial
55 <400> 17

gcccttgggc cgggagatgg tctgcttcag tggcgagggc aggtctgtgt g 51
- 60 SEQ ID NO: 18
<211> 49
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
65 <220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Cebador artificial

ES 2 351 275 T3

<400> 18

cgagggcagg tctgtgtggg tcacgggtgca cgtgaaacctc tccccggag 49

5

SEQ ID NO: 19

<211> 51

<212> ADN

10

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Cebador artificial

15

<400> 19

cgtgaaacctc tccccggagt tccagtcctc ctgcgagatg ctggcctcac c 51

20

SEQ ID NO: 20

<211> 65

<212> ADN

25

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Cebador artificial

30

<400> 20

gcgcgaatac gactcactat agagggacaa accgccatgg ccgatgtgaa gcttcaggag 60
tcagg 65

35

SEQ ID NO: 21

<211> 60

40

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Cebador artificial

45

<400> 21

gcagctaata cgactcacta taggaacaga ccaccatgga cgtggcccag cctgctgtgg 60

50

SEQ ID NO: 22

<211> 54

<212> ADN

55

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Cebador artificial

60

<400> 22

taatacgact cactataggg aaagggtttc tccgatccgg gaacatagga tacc 54

65

SEQ ID NO: 23

<211> 61

ES 2 351 275 T3

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Descripción de secuencia artificial: Cebador artificial

<400> 23

10 **tgaggatacc tatgttcccg gatcggagaa acccacactc tcccctgttg aagctcttga 60**
c 61

SEQ ID NO: 24

15 <211> 56

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Descripción de secuencia artificial: Cebador artificial

<400> 24

25 **ccgggaacat aggataccctc aaccaccatg gccgaggtga ggcttcttga gtctgg 56**

SEQ ID NO: 25

30 <211> 23

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

35 <223> Descripción de secuencia artificial: Cebador artificial

<400> 25

40 **gaggtgaggc ttcttgagtc tgg 23**

SEQ ID NO: 26

45 <211> 22

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

50 <223> Descripción de secuencia artificial: Cebador artificial

<400> 26

55 **gctgttatgt cgttcaact cg 22**

60

65