

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 403 904**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/10** (2006.01)

**C40B 40/08** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.08.2008 E 08787375 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.11.2012 EP 2190987**

54 Título: **Métodos para la formación de enlaces disulfuro**

30 Prioridad:

**21.08.2007 US 957027 P**

**19.11.2007 US 989035 P**

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

**22.05.2013**

73 Titular/es:

**MORPHOSYS AG (100.0%)  
LENA-CHRIST-STRASSE 48  
82152 PLANEGG-MARTINSRIED, DE**

72 Inventor/es:

**PRASSLER, JOSEF y  
STARK, YVONNE**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 403 904 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

Métodos para la formación de enlaces disulfuro

5 Antecedentes de la Invención

10 En 1985, Smith demostró por primera vez que los fagos filamentosos toleran fragmentos de proteína extraños insertados en su proteína del gen III (pIII), y pudo demostrar que los fragmentos de proteína se presentan en la superficie del fago (Smith, 1985). Ladner extendió este concepto al cribado de repertorios de (poli)péptidos y/o proteínas presentados en la superficie de partículas de fago (WO 88/06630; WO 90/02809). Desde entonces, la presentación de fago ha experimentado un progreso espectacular y ha dado como resultado logros sustanciales.

15 Se han desarrollado diversos formatos para construir y cribar bibliotecas de presentación de fago (poli)péptido/proteína, y un gran número de artículos de revista y monografías abarcan y resumen estos avances (v.g., Kay et al., 1996; Dunn, 1996; McGregor, 1996). En la mayor parte de los casos, se han utilizado sistemas basados en fagos filamentosos.

20 Propuesto inicialmente como presentación de fragmentos monocatenarios Fv (scFv) (WO 88/06630; véase también WO 92/01047), el método se ha expandido rápidamente a la presentación de otros (poli)péptidos/proteínas, tales como el inhibidor de la tripsina pancreática bovina (BPTI) (WO 90/02809), bibliotecas de péptidos (WO 91/19818), hormona del crecimiento humano (WO 92/09690), y diversas otras proteínas, con inclusión de la presentación de proteínas multímeras tales como fragmentos Fab (WO 91/17271; WO 92/01047).

25 Para anclar los (poli)péptidos/proteínas a la superficie del bacteriófago filamentosos, se emplean en la mayoría de los casos fusiones genéticas a las proteínas de la cubierta del fago. Se prefieren fusiones a la proteína del gen III (Parnley & Smith, 1988) o fragmentos de la misma (Bass et al., 1990), y la proteína del gen VIII (Greenwood et al., 1991). En un caso, se ha utilizado en gen VI (Jespers et al., 01995), y en un caso, se ha utilizado una combinación de gen VII y gen IX para la presentación de fragmentos Fv (Gao et al., 1999).

30 Adicionalmente, se ha logrado también la presentación de fago en fago lambda. En este caso, se han utilizado la proteína del gen V (Maruyama et al., 1994), la proteína del gen J, y la proteína del gen D (Sternberg & Hoess, 1995; Mikawa et al., 1996).

35 Además de la utilización de fusiones genéticas, se han unido péptidos o proteínas extraños a superficies de fago por la vía de dominios de asociación. En WO 91/17271, se sugirió utilizar un identificador presentado en fago y un ligando de fijación de identificador fusionado al (poli)péptido/proteína a presentar para conseguir una presentación no covalente.

40 Un concepto similar fue aplicado para la presentación de bibliotecas de cDNA (Crameri & Suter, 1993). En este caso se utilizó la interacción jun/fos para mediar la presentación de fragmentos de cDNA. En su constructo, residuos cisteína adicionales flanqueantes de ambos extremos de jun y de fos estabilizaban adicionalmente la interacción por formación de dos enlaces disulfuro.

45 Un problema era habitualmente el modo de recuperar mejor los fagos que se han unido a la diana deseada. Normalmente, esto se consigue por elución con tampones apropiados, sea por utilización de un gradiente de pH o de sal, o por elución específica utilizando una diana soluble. Sin embargo, los ligantes más interesantes que se fijan con afinidad alta a la diana podrían perderse por dicho enfoque. Se han descrito varios métodos alternativos que intentan resolver dicho problema, sea proporcionando una señal de escisión entre el (poli)péptido/proteína a presentar y su pareja de fusión, o entre la diana de interés y su portador que ancla la diana a una superficie sólida. 50 Adicionalmente, la mayoría de los enfoques a que se ha hecho referencia anteriormente en esta memoria requieren el uso de proteínas de fusión que comprenden al menos parte de una proteína de la cubierta del fago y un (poli)péptido/proteína extraño.

55 En WO 01/05950, se describe un sistema totalmente diferente que no requiere proteínas de fusión, y por tanto resuelve muchos de estos problemas. El denominado sistema "CysDisplay", descrito en WO 01/05950, está basado en la formación de un enlace disulfuro covalente entre una proteína de la cubierta del bacteriófago y una inmunoglobulina o un fragmento funcional de la misma. La inmunoglobulina, o el fragmento funcional de la misma, se presenta en la superficie de una partícula de bacteriófago. Una tecnología similar se dio a conocer posteriormente en WO 03/060065. WO 03/060065 difiere de WO 01/05950 en que el polipéptido pIII marcado con Cys se proporciona por un fago adyuvante modificado en lugar de un fagémido. Adicionalmente, WO 03/060065 menciona también otros adaptadores que podrían emplearse para presentar (poli)péptidos/proteínas en partículas de bacteriófago, tales como proteínas homomultímeras (PDGF, Max, RelA, neurotrofina) y proteínas heteromultímeras (complejos proteína-quinasa, proteínas "conating" el dominio SH2, a-Pal/Max, Hox/Pbx).

65 Aunque el sistema "CysDisplay" funciona satisfactoriamente, un sistema que exhiba cantidades mayores de los (poli)péptidos/proteínas en las partículas de bacteriófago puede ser ventajoso en ciertas situaciones; por ejemplo,

como un sistema mejorado de este tipo con tasas de presentación incrementadas, en particular una tasa de presentación funcional incrementada sería sin duda beneficioso y haría posible el aislamiento más conveniente, fiable y específico de ligantes, en particular ligantes que se fijen a su diana con afinidad alta.

- 5 Adicionalmente, Paschke et al., 2006, dieron a conocer el uso de jun/fos en un sistema de presentación de fago. Una proteína de interés y la proteína del fago pIII se fusionaban a jun o fos respectivamente. De este modo, una interacción por la vía de residuos cisteína que están presentes inherentemente en ambos, jun y fos, mediaba la interacción de la proteína de interés y la proteína del fago pIII.
- 10 Snyder et al., 1981, investigaron el entorno local de residuos cisteína reactivos de péptidos de proteínas existentes naturalmente por tratamiento con ácido 2-nitrobenzoico y observaron que los residuos cisteína rodeados por aminoácidos cargados positivamente exhibían mayor reactividad. En un estudio de continuación, Snyder et al., 1983, investigaron la cinética de la formación de disulfuro y llegaron esencialmente a las mismas conclusiones. Bulaj et al., 1998, investigaron la cinética de 16 péptidos modelo en cuanto a su capacidad para formar enlaces disulfuro con diversas moléculas no proteínicas. Observaron que la presencia de cargas netas en los péptidos y en los reactivos no proteínicos tiene influencia en la reactividad. Britto et al., 2002, investigaron el entorno electrostático de enlaces disulfuro intramoleculares en tubulina y encontraron que los residuos cisteína más reactivos estaban dentro de 6,5 Angstrom de residuos con carga positiva, promoviendo presumiblemente la disociación del tiol al anión tiolato.
- 20 Singh R.R. et al., 2002, caracterizaron inhibidores de proteasas ricas en disulfuro e identificaron residuos lisina y arginina en la proximidad de un residuo cisteína que contribuyen probablemente a la reactividad de los enlaces disulfuro respectivos. Ya en 1991, Yang et al. identificaron aminoácidos funcionales dentro del centro activo de una proteína enzimática por mutagénesis orientada, y encontraron que el reemplazamiento de Arg26 o Lys27 en glutarredoxina de porcino reducía la reactividad de Cys22 del centro activo.
- 25 Hansen et al., 2005, investigaron enlaces disulfuro intramoleculares de YFP producida por ingeniería genética y encontraron un aumento en la reactividad si están presentes aminoácidos con carga positiva en la proximidad de los residuos cisteína reactivos. Albrecht et al., 2006, informaron de la generación de Fab's mono-específicos multivalentes unidos a PEG por residuos cisteína.
- 30 Sin embargo, ninguno de los estudios anteriores describe un sistema en el cual se forma un enlace disulfuro intermolecular entre un primer (poli)péptido/proteína y un segundo (poli)péptido/proteína diferente. En particular, en ninguno de estos estudios se forma un enlace disulfuro de este tipo en el espacio periplasmático de una célula hospedadora. Adicionalmente, en ninguno de los estudios citados se presenta un (poli)péptido/proteína en la superficie de una partícula de bacteriófago.
- 35

#### Sumario de la Invención

- 40 Así pues, la presente invención proporciona un método para formar un enlace disulfuro entre un primer residuo cisteína comprendido en un primer (poli)péptido/proteína y un segundo residuo cisteína comprendido en un segundo (poli)péptido/proteína, comprendiendo el método:
- (a) introducir artificialmente un aminoácido con un pI mayor que 8 en dicho primer (poli)péptido/proteína o segundo (poli)péptido/proteína, en donde dicho aminoácido afecta positivamente a la reactividad de al menos uno de dichos residuos cisteína, y
- 45 (b) causar o permitir la fijación de dicho primer (poli)péptido/proteína a dicho segundo (poli)péptido/proteína, en donde dicha fijación está causada por la formación de un enlace disulfuro entre el primer residuo cisteína y el segundo residuo cisteína,
- en donde dicho primer (poli)péptido/proteína es un miembro de la cubierta proteica de una partícula de bacteriófago, y en donde dicho segundo (poli)péptido/proteína comprende una inmunoglobulina o un fragmento funcional de la misma.
- 50 Dicha mejora conduce a una mayor reactividad de dichos residuos cisteína, confiriendo con ello una tasa de presentación incrementada, en particular una tasa de presentación funcional incrementada.
- 55 La solución a este problema técnico se consigue proporcionando las realizaciones caracterizadas en las reivindicaciones. La solución técnica que resuelve el problema subyacente y que constituye la base de la presente invención, es decir la introducción de aminoácidos cargados positivamente en contexto espacial con los residuos cisteína reactivos, no se ha proporcionado ni sugerido en la técnica anterior.
- 60 La presente invención proporciona también un sistema mejorado para la presentación de inmunoglobulinas o fragmentos funcionales de las mismas en la superficie de partículas de bacteriófago sin necesidad de utilizar proteínas de fusión con proteínas de la cubierta del fago. La mayor reactividad de dichos residuos cisteína conduce por tanto a una mayor tasa de presentación, en particular una mayor tasa de presentación funcional.

Según lo anterior, la presente invención proporciona, entre otras cosas, un método mejorado para cribar grandes bibliotecas de inmunoglobulinas o fragmentos funcionales de las mismas presentados en la superficie de partículas de bacteriófago.

5 En ciertas realizaciones, la presente invención proporciona un método para formar un enlace disulfuro, que comprende: causar o permitir la fijación de un primer (poli)péptido/proteína a un segundo (poli)péptido/proteína, en donde dicha fijación está causada por la formación de un enlace disulfuro entre un primer residuo cisteína comprendido en dicho primer (poli)péptido/proteína y un segundo residuo cisteína comprendido en dicho segundo (poli)péptido/proteína, en donde uno de dichos (poli)péptidos/proteínas comprende un aminoácido con un *pI* mayor que 8 que afecta positivamente a la reactividad de al menos uno de dichos residuos cisteína. Dicho aminoácido con un *pI* mayor que 8 puede estar comprendido en dicho primer (poli)péptido/proteína o en dicho segundo (poli)péptido/proteína. Dicho aminoácido con un *pI* mayor que 8 en dicho primer o segundo (poli)péptido/proteína. Dicho aminoácido con un *pI* mayor que 8 puede estar comprendido dentro de 10 aminoácidos adyacentes a un residuo cisteína en el mismo (poli)péptido/proteína, preferiblemente dentro de 5 aminoácidos adyacentes a un residuo cisteína en el mismo (poli)péptido/proteína. Dicho primer residuo cisteína puede estar presente en o en la proximidad del término N o el término C de dicho primer (poli)péptido/proteína. Dicho primer residuo cisteína puede ser también un residuo cisteína N-terminal o C-terminal. Dicho segundo residuo cisteína puede estar presente en o en la proximidad del término N o el término C de dicho segundo (poli)péptido/proteína. Dicho segundo residuo cisteína puede ser también un residuo cisteína N-terminal o C-terminal. Dicho segundo (poli)péptido/proteína puede estar presentado en la superficie de una partícula de bacteriófago. Dicho primer y dicho segundo (poli)péptido/proteína puede expresarse y ensamblarse en una célula hospedadora apropiada. Dicho enlace disulfuro puede estar formado en el espacio periplasmático de una célula hospedadora. Dicho enlace disulfuro puede ser un enlace disulfuro intermolecular. Dicho aminoácido con un *pI* mayor que 8 puede seleccionarse de lisina y arginina, preferiblemente lisina. Dicho primer (poli)péptido/proteína es un miembro de la cubierta proteica de una partícula de bacteriófago. Dicho miembro de la cubierta proteica puede ser una variante truncada de una proteína de la cubierta de un bacteriófago de tipo salvaje, en donde dicha variante truncada comprende al menos aquella parte de dicha proteína de la cubierta de tipo salvaje que causa la incorporación de dicha proteína de la cubierta en la cubierta proteica de la partícula del bacteriófago. Dicho miembro de la cubierta proteica puede ser una variante modificada de una proteína de la cubierta de un bacteriófago de tipo salvaje, en donde dicha variante modificada es capaz de incorporarse en la cubierta proteica de la partícula de bacteriófago. Dicho primer residuo cisteína comprendido en dicho primer (poli)péptido/proteína puede estar presente en una posición de aminoácido correspondiente en una proteína de la cubierta de un bacteriófago de tipo salvaje. Dicho primer residuo cisteína comprendido en dicho primer (poli)péptido/proteína puede no estar presente en una posición de aminoácido correspondiente en una proteína de la cubierta de un bacteriófago de tipo salvaje. Dicho primer residuo cisteína puede haber sido introducido artificialmente en una proteína de la cubierta de un bacteriófago de tipo salvaje. Dicho primer residuo cisteína puede haber sido introducido artificialmente en una variante truncada de una proteína de la cubierta de un bacteriófago de tipo salvaje. Dicho primer residuo cisteína puede haber sido introducido artificialmente en una variante modificada de una proteína de la cubierta de un bacteriófago de tipo salvaje. Dicha partícula de bacteriófago puede ser una partícula de bacteriófago de un bacteriófago filamentoso. Dicho miembro de la cubierta proteica de una partícula de bacteriófago puede derivarse de la proteína de la cubierta de tipo salvaje pIII. Dicho miembro de la cubierta proteica de la partícula de bacteriófago puede derivarse de la proteína de la cubierta de tipo salvaje pIX. Dicho segundo residuo cisteína comprendido en dicho segundo (poli)péptido/proteína puede no estar presente en una posición de aminoácido correspondiente en el tipo salvaje de dicho segundo (poli)péptido/proteína. Dicho segundo residuo cisteína puede haber sido introducido artificialmente en dicho segundo (poli)péptido/proteína. Dicho segundo (poli)péptido/proteína comprende una inmunoglobulina o un fragmento funcional de la misma. Dicho fragmento funcional puede ser un fragmento scFv o Fab.

Se describe también en esta memoria un método de presentación de un segundo (poli)péptido/proteína en la superficie de una partícula de bacteriófago que comprende: causar o permitir la fijación de dicho (poli)péptido/proteína después de la expresión a un miembro de la cubierta proteica, en donde dicha fijación está causada por la formación de un enlace disulfuro entre un primer residuo cisteína comprendido en dicho miembro de la cubierta proteica y un segundo residuo cisteína comprendido en dicho (poli)péptido/proteína, en donde dicho (poli)péptido/proteína o dicho miembro de la cubierta proteica comprende un aminoácido con un *pI* mayor que 8 que afecta positivamente a la reactividad de dicho primer o dicho segundo residuo cisteína.

55 En ciertas realizaciones, la presente invención proporciona una secuencia de ácido nucleico que codifica una variante modificada de una proteína de la cubierta de un bacteriófago de tipo salvaje, en donde dicha variante modificada comprende:

- 60 (a) una o más partes de dicha proteína de la cubierta de un bacteriófago de tipo salvaje, en donde una de dichas partes comprende al menos aquella parte que causa o permite la incorporación de dicha proteína de la cubierta en la cubierta del fago,
- (b) un residuo cisteína N-terminal o C-terminal, y
- (c) un aminoácido con un *pI* mayor que 8, que está localizado dentro de 5 aminoácidos adyacente a y que afecta positivamente a la reactividad de dicho residuo cisteína N-terminal o C-terminal.

65

En ciertas realizaciones, la presente invención proporciona una secuencia de ácido nucleico que codifica una inmunoglobulina modificada o fragmento funcional de la misma, en donde dicha inmunoglobulina modificada o fragmento funcional comprende:

- 5 (a) una inmunoglobulina o un fragmento funcional de la misma,
  - (b) un residuo cisteína N-terminal o C-terminal, y
- un aminoácido con un pI mayor que 8, que está localizado dentro de 5 aminoácidos adyacente a y que afecta positivamente a la reactividad de dicho residuo cisteína N-terminal o C-terminal. Dicho fragmento funcional de una inmunoglobulina modificada puede ser un fragmento scFv o Fab.
- 10 Cualquiera de las secuencias de ácido nucleico arriba mencionadas puede codificar adicionalmente una o más secuencias peptídicas para propósitos de purificación y/o detección.

En ciertas realizaciones, la presente invención proporciona un vector que comprende cualquiera de las secuencias de ácido nucleico mencionadas anteriormente. Dicho vector puede comprender adicionalmente una o más

15 secuencias de ácido nucleico que codifican un segundo (poli) péptido/proteína que comprende un segundo residuo cisteína.

En ciertas realizaciones, la presente invención proporciona una célula hospedadora que comprende cualquiera de las secuencias o vectores de ácido nucleico mencionados anteriormente. Dicha célula hospedadora puede contener

20 un segundo vector que comprende una o más secuencias de ácido nucleico que codifican un segundo (poli) péptido/proteína que comprende un segundo residuo cisteína.

Se describen también en esta memoria (poli) péptidos/proteínas codificados por cualquiera de las secuencias de ácido nucleico mencionadas anteriormente, codificados por cualquiera de los vectores mencionados anteriormente o

25 producidos por cualquiera de las células hospedadoras mencionadas anteriormente.

Se describe también en esta memoria una partícula de bacteriófago que presenta un (poli) péptido/proteína en su superficie, obtenible por los métodos mencionados anteriormente. Dicho (poli) péptido/proteína presentado en dicha

30 partícula de bacteriófago puede ser una inmunoglobulina o un fragmento funcional de la misma.

En ciertas realizaciones, la presente invención proporciona una colección diversa de partículas de bacteriófago como se ha mencionado anteriormente en esta memoria, en donde cada una de dichas partículas de bacteriófago

35 presenta un segundo (poli) péptido/proteína de una colección diversa de segundos (poli) péptidos/proteínas.

Se describe también en esta memoria un método para obtener un (poli) péptido/proteína que tiene una propiedad deseada, que comprende:

- (a) proporcionar una colección diversa de partículas de bacteriófago como se describe anteriormente en esta memoria, y
- 40 (b) cribar dicha colección diversa y/o seleccionar de dicha colección diversa para obtener al menos una partícula de bacteriófago que exhibe un (poli) péptido/proteína que tiene una propiedad deseada. En el paso (b) de dicho método puede comprender adicionalmente:
  - (ba) poner en contacto dicha colección diversa de partículas de bacteriófago con la diana de interés;
  - (bb) diluir partículas de bacteriófago que no se fijan a la diana de interés; y
  - 45 (bc) eluir las partículas de bacteriófago que se fijan a la diana de interés por tratamiento de los complejos de diana de interés y bacteriófagos que se fijan a dicha diana de interés formados en el paso (ba) en condiciones reductoras. Dicha propiedad deseada puede ser fijación a una diana de interés, inhibición de una diana de interés, bloqueo de una diana de interés, activación de una reacción mediada por la diana o una actividad enzimática.

50 En ciertas realizaciones, la presente invención proporciona un complejo que comprende un primer (poli) péptido/proteína que comprende un primer residuo cisteína, y un segundo (poli) péptido/proteína que comprende un segundo residuo cisteína, en donde uno de dichos (poli) péptidos/proteínas comprende además un aminoácido con un pI mayor que 8, que está localizado dentro de 5 aminoácidos adyacente a y que afecta positivamente a la reactividad de al menos uno de dichos residuos cisteína, en donde dicho primer

55 (poli) péptido/proteína es un miembro de una cubierta proteica de una partícula de bacteriófago, en donde dicho segundo (poli) péptido/proteína comprende una inmunoglobulina o un fragmento funcional de la misma y en donde dichos primer y segundo (poli) péptidos/proteínas forman un enlace disulfuro a través de dichos residuos cisteína.

Dicho segundo (poli) péptido/proteína puede ser un miembro de una colección diversa de segundos (poli) péptidos/proteínas presentados en una colección diversa de una pluralidad de partículas de bacteriófago. Dichos segundos (poli) péptidos/proteínas pueden comprender una inmunoglobulina o un fragmento funcional de la

60 misma. Dicho fragmento funcional puede ser un fragmento scFv o Fab.

Se describe también en esta memoria una célula hospedadora que comprende cualquiera de los complejos

65 mencionados anteriormente.

- Se describe también en esta memoria un método para formar un enlace disulfuro, que comprende: causar o permitir la fijación de un primer (poli)péptido/proteína a un segundo (poli)péptido/proteína, en donde dicha fijación está causada por la formación de un enlace disulfuro entre un primer residuo cisteína comprendido en dicho primer (poli)péptido/proteína y un segundo residuo cisteína comprendido en dicho segundo (poli)péptido/proteína, en donde uno de dichos (poli)péptidos/proteínas comprende un aminoácido con un  $pI$  mayor que 8. Dicho aminoácido con un  $pI$  mayor que 8 puede afectar positivamente a la reactividad de al menos uno de dichos residuos cisteína.

#### Descripción Detallada de la Invención

- Un "enlace disulfuro" es un enlace covalente formado por la reacción de dos grupos tiol. Los enlaces disulfuro juegan un papel importante en el plegamiento y la estabilidad de (poli)péptidos y proteínas. Muchas proteínas con enlaces disulfuro son secretadas. Muchos compartimientos celulares son un ambiente reductor, y los enlaces disulfuro son generalmente inestables en el citosol. Los enlaces disulfuro en (poli)péptidos y proteínas se forman típicamente entre los grupos tiol de residuos cisteína, donde la oxidación de dos residuos cisteína forma un enlace disulfuro covalente. Los enlaces disulfuro pueden ser enlaces intra- o intermoleculares. En los procariontes, los enlaces disulfuro se forman preferiblemente en el ambiente oxidante del periplasma. En las células eucariotas, los enlaces disulfuro se forman usualmente en el ambiente oxidante del retículo endoplasmático, pero no en el ambiente reductor del citosol (con la excepción de algunas proteínas citosólicas que tienen residuos cisteína que funcionan como sensores de oxidación). Los enlaces disulfuro se encuentran en la mayoría de los casos en proteínas secretoras, en proteínas lisosómicas, y en los dominios exoplásmicos de proteínas de membrana. Los enlaces disulfuro juegan también un papel importante en la vulcanización del caucho.

- El " $pI$ " o "punto isoeléctrico" es el  $pH$  al cual una molécula, o una superficie, lleva una carga eléctrica neta nula. Para tener un punto isoeléctrico bien definido, una molécula (o superficie) tiene que ser anfótera, es decir debe tener a la vez grupos funcionales ácidos y básicos. Las proteínas y los aminoácidos son moléculas que cumplen este requisito. Los  $pI$ 's de los 20 aminoácidos existentes naturalmente se exponen en la Tabla 1. Sin embargo, pueden utilizarse también aminoácidos no existentes naturalmente para practicar el método de la presente invención.

- Tabla 1: Puntos isoeléctricos ( $pI$ 's) de los veinte aminoácidos existentes naturalmente (ordenados por  $pI$  creciente)**

Aminoácido	Punto isoeléctrico ( $pI$ )
ácido aspártico	2,77
ácido glutámico	3,22
cisteína	5,02
asparagina	5,41
fenilalanina	5,48
treonina	5,64
glutamina	5,65
tirosina	5,66
serina	5,68
metionina	5,74
triptófano	5,89
isoleucina	5,94
valina	5,96
glicina	5,97
leucina	5,98
alanina	6,00
prolina	6,30
histidina	7,47
lisina	9,59
arginina	11,15

Para los aminoácidos que tienen solamente un grupo amino y un grupo carboxilo, el pI puede calcularse a partir de los valores pKa's de esta molécula. Para los aminoácidos con más de dos grupos ionizables, tales como lisina, se utilizan para el cálculo del pI aquellos dos pKa's que pierden y ganan una carga con respecto a la forma neutra del aminoácido. Los cálculos respectivos son conocidos por el profesional experto y pueden encontrarse en cualquier libro de texto de bioquímica [v.g. Nelson DL, Cox MM (2004). Lehninger Principles of Biochemistry. W.H. Freeman; 4ª edición].

Las proteínas pueden separarse según su pI por enfoque isoeléctrico. A un pH inferior al pI, las proteínas llevan una carga neta positiva. Por encima del pI, las proteínas llevan una carga neta negativa. El pH del gel electroforético viene determinado por el tampón utilizado para dicho gel. Si el pH del tampón es superior al pI de la proteína que se está analizando, la proteína migrará al polo positivo (la carga negativa es atraída hacia un polo positivo). Si el pH del tampón es inferior al pI de la proteína que se está pasando, la proteína migrará al polo negativo del gel (la carga positiva es atraída hacia el polo negativo). Si la proteína se hace pasar con un pH de tampón que es igual a pI, no migrará en absoluto. Esto es cierto también para los aminoácidos individuales.

En realizaciones preferidas, el primer y/o el segundo (poli)péptido/proteína de la presente invención comprende un aminoácido con un pI mayor que 8. En otras realizaciones preferidas, dicho primer y/o segundo (poli)péptido/proteína comprende un aminoácido con un pI mayor que 9, mayor que 10, o mayor que 11. En otras realizaciones preferidas, dicho aminoácido con un pI mayor que 8, mayor que 9, mayor que 10, o mayor que 11 está presente en el primer (poli)péptido/proteína. En realizaciones preferidas alternativas, dicho aminoácido con un pI mayor que 8, mayor que 9, mayor que 10, o mayor que 11 está presente en el segundo (poli)péptido/proteína. En otras realizaciones preferidas, dicho aminoácido con un pI mayor que 8 se selecciona de lisina y arginina. En ciertas realizaciones preferidas, dicho aminoácido es lisina. En realizaciones preferidas alternativas, dicho aminoácido es arginina.

En ciertas realizaciones preferidas, el primer (poli)péptido/proteína de la presente invención comprende más de un aminoácido con un pI mayor que 8, que afecta positivamente a la reactividad de al menos uno de dichos residuos cisteína. En realizaciones preferidas alternativas, el segundo (poli)péptido/proteína de la presente invención comprende más de un aminoácido con un pI mayor que 8 que afecta positivamente a la reactividad de al menos uno de dichos residuos cisteína. En algunas realizaciones, dicho primer y/o dicho segundo (poli)péptido/proteína comprenden al menos dos, al menos tres, al menos tres cuatro o al menos cinco aminoácidos con un pI mayor que 8 que afecta positivamente a la reactividad de al menos uno de dichos residuos cisteína.

En otras realizaciones adicionales, los residuos de aminoácidos directamente adyacentes a dicho aminoácido con un pI mayor que 8 son residuos histidina. En ciertas realizaciones, el residuo de aminoácido directamente N-terminal a dicho aminoácido con un pI mayor que 8 es un residuo histidina. En otras realizaciones, el residuo de aminoácido directamente C-terminal a dicho aminoácido con un pI mayor que 8 es un residuo histidina. En otras realizaciones adicionales, tanto el residuo de aminoácido directamente N-terminal a dicho aminoácido con un pI mayor que 8 y el residuo de aminoácido directamente C-terminal a dicho aminoácido con un pI mayor que 8, son residuos histidina. Tramos de polipéptidos preferidos adicionales directamente adyacentes a dicho aminoácido con un pI mayor que 8 son polipéptidos que tienen una longitud de tres, cuatro, cinco, seis, siete u ocho residuos histidina, en donde al menos un residuo histidina está sustituido con un aminoácido con un pI mayor que 8, preferiblemente lisina. Tramos muy preferidos de polipéptidos directamente adyacentes a dicho aminoácido con un pI mayor que 8 son polipéptidos que tienen una longitud de seis residuos histidina, en donde uno, dos o tres residuos histidina están sustituidos con un aminoácido con un pI mayor que 8, preferiblemente lisina. Se prefieren particularmente los polipéptidos siguientes directamente adyacentes a dicho aminoácido con un pI mayor que 8: HHHHHH, HHHKHH, HHHHHK, HKHKHK (todos los aminoácidos expresados en código de una sola letra, es decir H = histidina, K = lisina). En cierta realización, el primer y/o segundo residuo cisteína comprendido en dicho primer y/o segundo (poli)péptido/proteína es directamente C-terminal a dicho tramo de residuos histidina, en el cual al menos un residuo histidina está sustituido con un aminoácido con un pI mayor que 8, preferiblemente lisina.

En otras realizaciones, el primer y/o segundo residuo cisteína comprendido en dicho primer y/o segundo (poli)péptido/proteína es directamente C-terminal a un tramo de tres, cuatro, cinco, seis, siete u ocho residuos histidina y directamente N-terminal a un aminoácido con un pI mayor que 8, preferiblemente lisina. Opcionalmente, uno de los residuos histidina directamente N-terminal al primer y/o segundo residuo cisteína comprendido en dicho primer y/o segundo (poli)péptido/proteína está sustituido adicionalmente con un aminoácido con un pI mayor que 8, preferiblemente lisina.

El término "afecta positivamente a la reactividad" como se utiliza en el contexto de la presente invención se refiere a una situación en la cual el equilibrio de una reacción en la que dos grupos tiol reaccionan para formar un enlace disulfuro está desplazado hacia el lado del producto, es decir se forma un número mayor de enlaces disulfuro, v.g. en comparación con sistemas conocidos, tales como, por ejemplo, el sistema "CysDisplay" descrito en WO 01/05950. La reactividad de los grupos tiol respectivos puede ser detectada y medida fácilmente como se describe en WO 01/05950 y en la presente invención. La tasa de presentación relativa o la tasa de presentación funcional, como se describe más adelante en esta memoria, puede ser un sistema de test apropiado. Según la presente invención, dicho desplazamiento del equilibrio se consigue por un aminoácido con un pI mayor que 8, que está

presente en una de las sustancias reaccionantes, es decir en el primer o el segundo (poli)péptido/proteína. Dicho aminoácido con un pl mayor que 8 está localizado espacialmente en la proximidad del primer residuo cisteína comprendido en el primer (poli)péptido/proteína o el segundo residuo cisteína comprendido en el segundo (poli)péptido/proteína de una manera tal que aquél puede afectar a dicho desplazamiento del equilibrio.

5 En algunas realizaciones de los métodos de la invención, dicho aminoácido con un pl mayor que 8 está localizado dentro de los diez aminoácidos, preferiblemente dentro de los ocho aminoácidos, más preferiblemente dentro de los seis aminoácidos, y muy preferiblemente dentro de los cinco aminoácidos directamente adyacentes a dicho primer o dicho segundo residuo cisteína. En ciertas realizaciones, dicho aminoácido con un pl mayor que 8 está presente en posición N-terminal a dicho primer o dicho segundo residuo cisteína. En otras realizaciones, dicho aminoácido con un pl mayor que 8 está presente en posición C-terminal a dicho primer o dicho segundo residuo cisteína.

15 En otras realizaciones de los métodos de la invención, dicho aminoácido con un pl mayor que 8 está localizado a una distancia mayor que diez aminoácidos del primer o el segundo residuo cisteína comprendido en dicho primer o segundo (poli)péptido/proteína, pero dicho primer o segundo (poli)péptido/proteína tiene una estructura tridimensional, de tal modo que dicho aminoácido con un pl mayor que 8 se encuentra en proximidad espacial con dicho primer o dicho segundo residuo cisteína. El aminoácido con un pl mayor que 8 y el residuo cisteína afectado por dicho aminoácido pueden estar comprendidos en el mismo (poli)péptido/proteína, por ejemplo en dominios diferentes del mismo (poli)péptido/proteína. Alternativamente, el aminoácido con un pl mayor que 8 y el residuo cisteína afectado por dicho aminoácido pueden estar comprendidos en diferentes (poli)péptidos/proteínas, v.g., el aminoácido con un pl mayor que 8 en el primer (poli)péptido/proteína y el residuo cisteína afectado por dicho aminoácido en el segundo (poli)péptido/proteína, o viceversa. En este caso, el aminoácido con un pl mayor que 8, que está comprendido en un (poli)péptido/proteína afecta positivamente a la reactividad del segundo residuo cisteína comprendido en el otro (poli)péptido/proteína. El profesional experto sabrá qué posiciones de aminoácido dentro de un (poli)péptido/proteína dado pueden seleccionarse para introducir un aminoácido con un pl mayor que 8 que afecte positivamente a la reactividad de un residuo cisteína. Se conocen diversas técnicas para la determinación de las estructuras tridimensionales de (poli)péptidos/proteínas, tales como cristalografía de rayos X o técnicas NMR. Adicionalmente, las estructuras tridimensionales de muchos (poli)péptidos/proteínas están ya disponibles, lo que hace fácil la selección de posiciones de aminoácidos apropiadas. En particular, las estructuras tridimensionales de diversas inmunoglobulinas o fragmentos funcionales, tales como fragmentos scFv o Fab están disponibles públicamente de diversas bases de datos, tales como PDB (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>) o PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=Structure>).

35 En el contexto de la presente invención, el término "bacteriófago" se refiere a virus bacterianos que forman paquetes constituidos por una cubierta proteica que contiene el ácido nucleico requerido para la replicación de los fagos. El ácido nucleico puede ser DNA o RNA, bicatenario o monocatenario, lineal o circular. Bacteriófagos tales como el fago lambda o un fago filamentosos (tal como M13, fd, o f1) son bien conocidos por los especialistas que tienen experiencia ordinaria en la técnica. En ciertas realizaciones, se prefieren fagos filamentosos. En el contexto de la presente invención, el término "partículas de bacteriófago" se refiere a las partículas según la presente invención, es decir a partículas que presentan un (poli)péptido/proteína a través de un enlace disulfuro. En ciertas realizaciones se prefieren partículas de bacteriófago de fagos filamentosos.

45 Durante el ensamblaje de los bacteriófagos, las proteínas de la cubierta de pueden empaquetar diferentes secuencias de ácido nucleico, siempre que las mismas comprendan una señal de empaquetamiento. En el contexto de la presente invención, el término "secuencias de ácido nucleico" contenidas en bacteriófagos o proteínas de bacteriófago se refiere a secuencias o vectores de ácido nucleico que tienen la posibilidad de ser empaquetadas por las proteínas de la cubierta del bacteriófago durante el ensamblaje de los bacteriófagos o las partículas de bacteriófago. Preferiblemente, dichas secuencias o vectores de ácido nucleico se derivan de genomas de bacteriófago existentes naturalmente, y comprenden por ejemplo, en el caso de un fago filamentosos, vectores de fago y fagémido. Los últimos son plásmidos que contienen una señal de empaquetamiento y un origen de replicación de fago además de las características de plásmido.

55 En ciertas realizaciones, dicho primer o dicho segundo (poli)péptido/proteína se presentan en la superficie de una partícula de bacteriófago. En realizaciones preferidas, el segundo (poli)péptido/proteína se presenta en la superficie de una partícula de bacteriófago. En realizaciones alternativas, el primer (poli)péptido/proteína se presenta en la superficie de una partícula de bacteriófago. Se prefieren partículas de bacteriófago filamentosos.

60 En ciertas realizaciones, dicho primer o dicho segundo (poli)péptido/proteína es un miembro de la cubierta proteica de una partícula de bacteriófago. En realizaciones preferidas, el primer (poli)péptido/proteína es un miembro de la cubierta proteica de una partícula de bacteriófago. En realizaciones alternativas, el segundo (poli)péptido/proteína es un miembro de la cubierta proteica de una partícula de bacteriófago. En realizaciones preferidas, dicho miembro de la cubierta proteica de la partícula de bacteriófago es o se deriva de la proteína de la cubierta de tipo salvaje pIII. En otra realización, dicho miembro de la cubierta proteica de la partícula de bacteriófago es o se deriva de la proteína de la cubierta de tipo salvaje pIX.

65



En el contexto de la presente invención, el término "se deriva" hace referencia a una modificación, en la cual la proteína modificada es capaz de incorporarse en la cubierta proteica de la partícula de bacteriófago. Preferiblemente, aquellas partes de la proteína modificada que corresponden a la proteína de tipo salvaje exhiben una identidad de aminoácido que excede de aproximadamente 50%, aproximadamente 60%, aproximadamente 70%, con preferencia aproximadamente 80%, y de modo muy preferible aproximadamente 90% comparada con la secuencia de tipo salvaje correspondiente.

Se describe también un método, en el cual dicho miembro de la cubierta proteica es una proteína de la cubierta de un bacteriófago de tipo salvaje.

El término "proteína de la cubierta de tipo salvaje" se refiere a aquellas proteínas que forman la cubierta de fago de los bacteriófagos existentes naturalmente. En el caso de un bacteriófago filamentosos, dichas proteínas de tipo salvaje son la proteína del gen III (pIII), la proteína del gen VI (pVI), la proteína del gen VII (pVII), la proteína del gen VIII (pVIII), y la proteína del gen IX (pIX). Las secuencias, con inclusión de las diferencias entre los miembros estrechamente afines de los bacteriófagos filamentosos tales como f1, fd, y M13, son bien conocidas por una persona con experiencia ordinaria en la técnica (véase, v.g., Kay et al., 1996).

En una realización preferida adicional, dicho miembro de la cubierta proteica es una variante modificada de una proteína de la cubierta de un bacteriófago de tipo salvaje, en donde dicha variante modificada es susceptible de incorporación en la cubierta proteica de la partícula de bacteriófago.

El término "variante modificada" se refiere a proteínas derivadas de las proteínas de tipo salvaje a que se ha hecho referencia anteriormente que están modificadas en comparación con las secuencias de tipo salvaje. Dicha modificación puede incluir cualquier sustitución de aminoácido, delección de aminoácido o incorporación de aminoácidos adicionales en comparación con las secuencias de tipo salvaje. El término "variante modificada" incluye "variantes truncadas" como se defina más adelante.

Métodos para conseguir la modificación de una proteína de tipo salvaje según la presente invención son bien conocidos para una persona con experiencia ordinaria en la técnica, e implican técnicas estándar de clonación y/o mutagénesis. Los métodos para la construcción de moléculas de ácido nucleico que codifican una variante modificada de una proteína de tipo salvaje utilizada en un método según la presente invención, para la construcción de vectores que comprenden dichas moléculas de ácido nucleico, con inclusión de la construcción de vectores de fago y/o fagémido, para introducción de dichos vectores en células hospedadoras seleccionadas adecuadamente, para causar o permitir la expresión de dicha proteína modificada son bien conocidos en la técnica (véase, v.g., Sambrook et al., 2001; Ausubel et al., 1999; Kay et al., 1996). Para identificar variantes modificadas según la presente invención, un identificador de detección puede fusionarse a la variante, y puede disponerse un ensayo para determinar si la variante es susceptible de ser incorporada en la cubierta del fago de las partículas de bacteriófago formadas en presencia de la variante.

En una realización preferida adicional, dicho miembro de la cubierta proteica es una variante truncada de una proteína de la cubierta de un bacteriófago de tipo salvaje, en donde dicha variante truncada comprende al menos aquella parte de dicha proteína de la cubierta de tipo salvaje que causa la incorporación de dicha proteína de la cubierta en la cubierta proteica de la partícula de bacteriófago.

El término "variante truncada" se refiere a proteínas derivadas de las proteínas de tipo salvaje a que se hace referencia anteriormente, que están modificadas por delección de al menos parte de las secuencias de tipo salvaje. Esto comprende variantes tales como variantes truncadas de la proteína del gen III que se han encontrado en mutantes de bacteriófago (Crissman & Smith, 1984) o que han sido generadas en el curso de métodos estándar de presentación de fago (v.g. Bass et al., 1990; Krebber, 1996). Por ejemplo, dicha variante truncada puede consistir en, o incluir, el dominio C-terminal de la proteína del gen III. Para identificar variantes truncadas según la presente invención, puede fusionarse un identificador de detección a la variante, y puede disponerse un ensayo para determinar si la variante está incorporada en la cubierta del fago de las partículas de bacteriófago formadas en presencia de la variante.

Por vía de truncación de una proteína de tipo salvaje por delección de una parte de la proteína de tipo salvaje, puede hacerse disponible un residuo cisteína que en la proteína de tipo salvaje estaba formando un enlace disulfuro con una segunda cisteína comprendida en la parte delecionada.

El término "(poli)péptido" se refiere a moléculas que comprenden una o más cadenas de múltiples, es decir dos o más, aminoácidos unidos por enlaces peptídicos.

El término "proteína" se refiere a (poli)péptidos en los cuales al menos parte del (poli)péptido tiene o es capaz de adquirir una configuración tridimensional definida por formación de estructuras secundarias, terciarias, o cuaternarias dentro de y/o entre su(s) cadena(s) de (poli)péptido. Esta definición comprende proteínas tales como proteínas existentes naturalmente o al menos parcialmente artificiales, así como fragmentos o dominios de proteínas enteras,

siempre que estos fragmentos o dominios sean capaces de adquirir una configuración tridimensional definida como se ha descrito arriba.

5 Ejemplos de (poli)péptidos/proteínas constituidos por una sola cadena son fragmentos de anticuerpos monocatenarios Fv, y ejemplos de (poli)péptidos/proteínas constituidos por más cadenas son fragmentos de anticuerpos Fab.

10 Cuando el primer residuo cisteína está localizado en el término C del primer (poli)péptido/proteína, el formato de presentación corresponde a la disposición de presentación convencional, estando el término C fusionado genéticamente al miembro de la proteína de la cubierta del fago. En cambio, cuando se utiliza el término N del primer (poli)péptido/proteína, el formato de presentación puede invertirse como en el sistema pJuFO de Crameri & Suter a que se ha hecho referencia anteriormente (Crameri & Suter, 1993).

15 El término "superficie de una partícula de bacteriófago" se refiere a la parte de una partícula de bacteriófago que está en contacto con el medio en el que está contenida la partícula, y que es accesible. La superficie viene determinada por las proteínas que forman parte de la cubierta del fago (los miembros de la cubierta proteica de la partícula) que se ensambla durante la producción del fago en células hospedadoras apropiadas.

20 El término "después de la expresión" se refiere a la situación en la que el ácido nucleico que codifica dicho segundo (poli)péptido/proteína se expresa en una célula hospedadora antes de la fijación del segundo (poli)péptido/proteína a dicha cubierta, en contraste con los enfoques en los cuales se expresan ácidos nucleicos que codifican proteínas de fusión con proteínas de la cubierta del bacteriófago. La expresión de ácido nucleico que codifica dicho segundo (poli)péptido/proteína y el paso de causar o permitir la fijación pueden realizarse en pasos y/o ambientes separados. Preferiblemente, sin embargo, la expresión y el paso de causar o permitir la fijación se realizan secuencialmente en una célula hospedadora apropiada.

30 El término "en donde dicha fijación está causada por la formación de un enlace disulfuro" se refiere a una situación, en la cual el enlace disulfuro es responsable de la fijación, y en donde ningún dominio de interacción para interaccionar con un segundo dominio presente en el segundo (poli)péptido/proteína se ha fusionado recombinantemente a dicho miembro de la cubierta proteica, como por ejemplo en el caso del sistema pJuFO (Crameri & Suter, 1993).

35 En una realización preferida, la partícula de bacteriófago que presenta el segundo (poli)péptido/proteína contiene una secuencia de ácido nucleico que codifica el segundo (poli)péptido/proteína.

40 Métodos para construcción de moléculas de ácido nucleico que codifican un (poli)péptido/proteína según la presente invención, para construcción de vectores que comprenden dichas moléculas de ácido nucleico, para introducción de dichos vectores en células hospedadoras elegidas adecuadamente, para causar o permitir la expresión de dichos (poli)péptidos/proteínas son bien conocidos en la técnica (véase, v.g., Sambrook et al., 2001; Ausubel et al., 1999; Ge et al., 1995). Además, son bien conocidos métodos para la introducción del material genético requerido para la generación de bacteriófagos o partículas de bacteriófago de progenie en células hospedadoras adecuadas, y para causar o permitir la generación de dichos bacteriófagos o partículas de bacteriófago de progenie (véase, v.g., Kay et al., 1996).

45 En una determinada realización, la presente invención se refiere a un método, en el cual dicho primer residuo cisteína está presente en una posición de aminoácido correspondiente en la versión de tipo salvaje de dicho primer (poli)péptido/proteína. Más preferiblemente, dicho primer residuo cisteína está presente en una posición de aminoácido correspondiente en una proteína de la cubierta de un bacteriófago de tipo salvaje.

50 En una realización más preferida, dicho primer residuo cisteína no está presente en una posición de aminoácido correspondiente en la versión de tipo salvaje de dicho primer (poli)péptido/proteína. Aún más preferiblemente, dicho primer residuo cisteína no está presente en una posición de aminoácido correspondiente en una proteína de la cubierta de un bacteriófago de tipo salvaje.

55 En el contexto de la presente invención, el término "versión de tipo salvaje" de un (poli)péptido/proteína se refiere a un (poli)péptido/proteína que tiene una secuencia de aminoácidos existente naturalmente.

60 En una realización aún más preferida, dicho primer residuo cisteína se ha introducido artificialmente en un primer (poli)péptido/proteína. En realizaciones más preferidas, dicho primer residuo cisteína se ha introducido artificialmente en una proteína de la cubierta de un bacteriófago de tipo salvaje. En otras realizaciones, dicho primer residuo cisteína se ha introducido artificialmente en una variante modificada de una proteína de la cubierta de un bacteriófago de tipo salvaje. En otras realizaciones adicionales, dicho primer residuo cisteína se ha introducido artificialmente en una variante truncada de una proteína de la cubierta de un bacteriófago de tipo salvaje.

65 En cierta realización, la presente invención se refiere a un método en el cual dicho segundo residuo cisteína está presente en una posición de aminoácido correspondiente en la versión de tipo salvaje de dicho segundo

(poli)péptido/proteína. Más preferiblemente, dicho segundo residuo cisteína está presente en una posición de aminoácido correspondiente en una inmunoglobulina o un fragmento funcional de la misma.

5 En una realización más preferida, dicho segundo residuo cisteína no está presente en una posición de aminoácido correspondiente en la versión de tipo salvaje de dicho segundo (poli)péptido/proteína. Aún más preferiblemente, dicho segundo residuo cisteína no está presente en una posición de aminoácido correspondiente en una proteína de la cubierta de un bacteriófago de tipo salvaje.

10 En una realización aún más preferida, dicho segundo residuo cisteína se ha introducido artificialmente en un segundo (poli)péptido/proteína. En realizaciones más preferidas, dicho segundo residuo cisteína se ha introducido artificialmente en una inmunoglobulina o un fragmento funcional de la misma. Preferiblemente, dicho fragmento funcional es un fragmento scFv o Fab.

15 En cierta realización, la presente invención se refiere a un método, en el cual dicho aminoácido con un pl mayor que 8 está presente en una posición de aminoácido correspondiente en la versión de tipo salvaje del primer o el segundo (poli)péptido/proteína. Más preferiblemente, dicho aminoácido con un pl mayor que 8 está presente en una posición de aminoácido correspondiente en una proteína de la cubierta de un bacteriófago de tipo salvaje o una inmunoglobulina o un fragmento funcional de la misma, preferiblemente un fragmento scFv o Fab.

20 En una realización más preferida, dicho aminoácido con un pl mayor que 8 no está presente en una posición de aminoácido correspondiente en la versión de tipo salvaje del primer o el segundo (poli)péptido/proteína. En otra realización preferida, dicho primer (poli)péptido/proteína no es un (poli)péptido/proteína de tipo salvaje y dicho aminoácido con un pl mayor que 8 no está presente en la versión de tipo salvaje de dicho primer (poli)péptido/proteína. En otra realización preferida, dicho segundo (poli)péptido/proteína no es un  
25 (poli)péptido/proteína de tipo salvaje y dicho aminoácido con un pl mayor que 8 no está presente en la versión de tipo salvaje de dicho segundo (poli)péptido/proteína. Aún más preferiblemente, dicho aminoácido con un pl mayor que 8 no está presente en una posición de aminoácido correspondiente en una proteína de la cubierta de tipo salvaje de un bacteriófago o una inmunoglobulina o un fragmento funcional de la misma, preferiblemente un fragmento scFv o Fab.

30 En una realización aún más preferida, dicho aminoácido con un pl mayor que 8 se ha introducido artificialmente en la versión de tipo salvaje del primer o el segundo (poli)péptido/proteína. En realizaciones más preferidas, dicho aminoácido con un pl mayor que 8 se ha introducido artificialmente en una proteína de la cubierta de un bacteriófago de tipo salvaje o una inmunoglobulina o un fragmento funcional de la misma, preferiblemente un fragmento scFv o Fab.  
35

En el contexto de la presente invención, el término "introducido artificialmente" se refiere a una situación en la que un (poli)péptido/proteína se ha modificado por, v.g., medios recombinantes. En la presente invención, pueden modificarse diversos (poli)péptidos/proteínas. Por ejemplo, el ácido nucleico que codifica el primer  
40 (poli)péptido/proteína puede manipularse por procedimientos estándar para introducir un codón cisteína, creando una secuencia de ácido nucleico que codifica un primer (poli)péptido/proteína modificado, en donde un residuo cisteína se ha introducido artificialmente por inserción en, o adición de dicho residuo cisteína a, dicho primer (poli)péptido/proteína, o por sustitución de un residuo de aminoácido comprendido en dicho primer (poli)péptido/proteína o proteína modificada por dicho residuo cisteína, o por fusión de dicho primer  
45 (poli)péptido/proteína con un segundo (poli)péptido/proteína que comprende dicho segundo residuo cisteína, o por cualquier combinación de dichas inserciones, adiciones, sustituciones o fusiones. Muy preferiblemente, dicho primer (poli)péptido/proteína es una proteína de la cubierta de un bacteriófago de tipo salvaje, o una variante modificada o truncada de la misma.

50 Análogamente, el ácido nucleico que codifica el segundo (poli)péptido/proteína puede ser manipulado por procedimientos estándar para introducir un codón cisteína de la misma manera que se describe para el primer (poli)péptido/proteína. Dicho segundo (poli)péptido/proteína preferido comprende una inmunoglobulina o un fragmento funcional de la misma. Se prefiere particularmente un fragmento scFV o Fab.

55 Análogamente, el ácido nucleico que codifica el primer o el segundo (poli)péptido/proteína puede manipularse por procedimientos estándar para introducir un codón de aminoácido, que codifica un aminoácido con un pl mayor que 8.

60 En el caso en que el primer (poli)péptido/proteína es una proteína de la cubierta de un bacteriófago de tipo salvaje, la expresión del ácido nucleico que comprende un codón de cisteína de este tipo introducido recombinantemente conduce a la formación de una variante de la proteína de la cubierta de tipo salvaje que comprende un residuo cisteína.

65 En una realización adicional muy preferida, dicha primera cisteína se ha introducido artificialmente en una variante truncada de una proteína de la cubierta de un bacteriófago de tipo salvaje.

En una realización aún más preferida, dicha primera cisteína se ha introducido artificialmente en una variante modificada de una proteína de la cubierta de un bacteriófago de tipo salvaje.

5 Los métodos para conseguir la introducción artificial según la presente invención son bien conocidos por una persona con experiencia ordinaria en la técnica, e implican técnicas estándar de clonación y/o mutagénesis. Los métodos para la construcción de moléculas de ácido nucleico que codifican una variante modificada de una proteína de tipo salvaje utilizada en un método según la presente invención, para construcción de vectores que comprenden dichas moléculas de ácido nucleico, para introducción de dichos vectores en células hospedadoras seleccionadas adecuadamente, para causar o conseguir la expresión de dichas proteínas de fusión son bien conocidos en la  
10 técnica (véase, v.g., Sambrook et al, 2001; Ausubel et al., 1999).

En otra realización, la presente invención se refiere a un método, en el cual dicho primer residuo cisteína está presente en, o en la proximidad del término C o el término N de dicho miembro del primer (poli)péptido/proteínas. En realizaciones preferidas, dicho primer residuo cisteína está presente en, o en la proximidad del término C o el  
15 término N de un miembro de la cubierta proteica de una partícula de bacteriófago. En ciertas realizaciones, dicho primer residuo cisteína es un residuo cisteína N-terminal. En otras realizaciones, dicho primer residuo cisteína es un residuo cisteína C-terminal.

En otra realización, la presente invención se refiere a un método, en el cual dicho segundo residuo cisteína está presente en, o en la proximidad del término C o el término N de dicho miembro del segundo (poli)péptido/proteína. En realizaciones preferidas, dicho segundo residuo cisteína está presente en, o en la proximidad del término C o el  
20 término N de una inmunoglobulina, o un fragmento funcional de la misma, preferiblemente un fragmento scFv o Fab. En ciertas realizaciones, dicho segundo residuo cisteína es un residuo cisteína N-terminal. En otras realizaciones, dicho segundo residuo cisteína es un residuo cisteína C-terminal.

25 El término "en la proximidad de" hace referencia a un tramo de hasta 15, más preferiblemente, hasta 10 aminoácidos, y, aún más preferiblemente, hasta 5 aminoácidos, contados en ambos casos desde el término N o C de dicho primer o segundo (poli)péptido/proteína.

30 En realizaciones preferidas, dicho primer (poli)péptido/proteína comprende un miembro de la cubierta proteica de una partícula de bacteriófago, preferiblemente pIII.

En realizaciones preferidas, dicho segundo (poli)péptido/proteína comprende una inmunoglobulina o un fragmento funcional de la misma, preferiblemente un fragmento scFv o Fab.

35 En este contexto, "inmunoglobulina" se utiliza como sinónimo de "anticuerpo". El término "fragmento funcional" se refiere a un fragmento de una inmunoglobulina que retiene el resto de fijación de antígeno de una inmunoglobulina. Fragmentos funcionales de inmunoglobulina según la presente intención puede ser fragmentos Fv (Skerra & Plückthun, 1988), scFv (Bird et al., 1988; Huston et al., 1988), Fv enlazado a disulfuro (Glockshuber et al., 1992; Brinkmann et al., 1993), Fab, F(ab')<sub>2</sub> u otros Ofragmentos bien conocidos por el profesional experto en la técnica, que comprenden el dominio variable de una inmunoglobulina o fragmento de inmunoglobulina. Se prefiere particularmente un fragmento scFv o Fab.

45 En este contexto, "diferente" representa que los dos (poli)péptidos/proteínas no son completamente idénticos. En las realizaciones más preferidas, el primer y el segundo (poli)péptido/proteína codifican (poli)péptidos/proteínas funcionales diferentes, v.g., un (poli)péptido/proteína codifica una variante modificada de una proteína de la cubierta de un bacteriófago de tipo salvaje y el otro (poli)péptido codifica una inmunoglobulina o un fragmento funcional de la misma. En otras realizaciones preferidas, el primer y el segundo (poli)péptido/proteína se derivan de especies diferentes (v.g. un (poli)péptido/proteína se deriva de bacteriófago y el otro (poli)péptido se deriva de un humano).

50 Se describe también en esta memoria un método para presentación de un segundo (poli)péptido/proteína en la superficie de una partícula de bacteriófago que comprende: causar o permitir la fijación de dicho segundo (poli)péptido/proteína después de la expresión a un miembro de la cubierta proteica, en donde dicha fijación está causada por la formación de un enlace disulfuro entre un primer residuo cisteína comprendido en dicho miembro de  
55 la cubierta proteica y un segundo residuo cisteína comprendido en dicho segundo (poli)péptido/proteína, en donde dicho segundo (poli)péptido/proteína comprende un aminoácido con un pI mayor que 8 que afecta positivamente a la reactividad de dicho primer residuo cisteína.

60 En otras realizaciones preferidas, dicho primer y dicho segundo (poli)péptido/proteína se expresan y ensamblan en una célula hospedadora apropiada.

Se describe también en esta memoria un método que comprende los pasos siguientes:

65 (a) proporcionar una célula hospedadora que alberga una primera secuencia de ácido nucleico que comprende una primera secuencia de ácido nucleico que codifica un primer (poli)péptido/proteína que comprende un primer residuo cisteína y una segunda secuencia de ácido nucleico que comprende una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica un segundo (poli)péptido/proteína que comprende un

segundo residuo cisteína, en donde uno de dichos (poli)péptidos/proteínas comprende un aminoácido con un pl mayor que 8 que afecta positivamente a la reactividad de al menos uno de dichos residuo cisteína; (b) causar o permitir la expresión de dicha primera y dicha segunda secuencias de ácido nucleico; y (c) causar o permitir la fijación de dicho primer residuo cisteína comprendido en dicho primer (poli)péptido/proteína a dicho segundo residuo cisteína comprendido en dicho segundo (poli)péptido/proteína.

Los pasos (b) y (c) pueden realizarse secuencialmente, en cualquier orden o simultáneamente.

En el contexto de la presente invención, el término "causar o permitir la expresión" describe cultivar células hospedadoras en condiciones tales que se expresa una secuencia de ácido nucleico.

Los métodos para construcción de moléculas de ácido nucleico que codifican un primer o un segundo (poli)péptido/proteína según la presente invención, para construcción de vectores que comprenden dichas moléculas de ácido nucleico, para introducción de dichos vectores en dichas células hospedadoras seleccionadas adecuadamente, para causar o permitir la expresión de (poli)péptidos/proteínas son bien conocidos en la técnica (véase v.g., Sambrook et al., 2001; Ausubel et al., 1999). Son adicionalmente bien conocidos métodos para la introducción del material genético requerido para la generación de bacteriófagos o partículas de bacteriófago de progenie en células hospedadoras adecuadas, y para causar o permitir la generación de dichos bacteriófagos o partículas de bacteriófago de progenie (véase, v.g., Kay et al., 1996). El paso de causar o permitir la producción de partículas de bacteriófago puede requerir el uso de fagos adyuvantes apropiados, v.g. en el caso de trabajar con fagémidos.

Se describe también en esta memoria una secuencia de ácido nucleico que codifica una variante modificada de una proteína de la cubierta de un bacteriófago de tipo salvaje, en donde dicha variante modificada comprende o consiste en

- (a) una o más partes de dicha proteína de la cubierta de un bacteriófago de tipo salvaje, en donde una de dichas partes comprende al menos aquella parte que causa o permite la incorporación de dicha proteína de la cubierta en la cubierta del fago;
- (b) un primer residuo cisteína, y
- (c) un aminoácido con un pl mayor que 8 que afecta positivamente a la reactividad de dicho primer residuo cisteína. En otra realización, dicho aminoácido con un pl mayor que 8 afecta positivamente a la reactividad de un segundo residuo cisteína comprendido en un segundo (poli)péptido/proteína. En realizaciones preferidas, dicha secuencia de ácido nucleico es una secuencia de ácido nucleico aislada. En otras realizaciones, dicha secuencia de ácido nucleico codifica adicionalmente una o más secuencias peptídicas para propósitos de purificación y/o detección.

Se describe también en esta memoria un secuencia de ácido nucleico que codifica una inmunoglobulina modificada o un fragmento funcional de la misma, en donde dicha inmunoglobulina o fragmento funcional modificado(a) consiste en

- (a) una inmunoglobulina o fragmento funcional de la misma,
- (b) un residuo cisteína, y
- (c) un aminoácido con un pl mayor que 8 que afecta positivamente a la reactividad de dicho residuo cisteína. Como se utiliza en este contexto, la inmunoglobulina o un fragmento funcional de la misma es equivalente al segundo (poli)péptido/proteína según la terminología de la presente invención. En otra realización, dicho aminoácido con un pl mayor que 8 afecta positivamente a la reactividad de otro residuo cisteína comprendido en otro (poli)péptido/proteína. Este otro (poli)péptido/proteína es equivalente al primer (poli)péptido/proteína según la terminología de la presente invención. En realizaciones preferidas, dicho fragmento funcional de una inmunoglobulina modificada es un fragmento scFv o Fab. En realizaciones preferidas, dicha secuencia de ácido nucleico es una secuencia de ácido nucleico aislada. En otras realizaciones, dicha secuencia de ácido nucleico codifica adicionalmente una o más secuencias peptídicas para propósitos de purificación y/o detección.

En el contexto de la presente invención, una variante modificada obtenida por sustitución de un residuo de aminoácido en una secuencia de proteína de la cubierta de tipo salvaje por un residuo cisteína puede considerarse como una variante compuesta de dos partes de dicha proteína de tipo salvaje enlazadas por un residuo cisteína adicional. Correspondientemente, variantes de una proteína de la cubierta de tipo salvaje que comprenden varias mutaciones comparadas con la secuencia de tipo salvaje puede considerarse que están compuestas de varias partes de tipo salvaje, en donde las partes individuales están enlazadas por los residuos mutados. Sin embargo, dicha variante puede ser también resultado de la adición de hasta 6 residuos, con inclusión de un residuo cisteína, al término C y/o al término N de la proteína de la cubierta de tipo salvaje.

Análogamente, una variante modificada de una inmunoglobulina o un fragmento funcional de la misma obtenido por sustitución de un residuo de aminoácido en una secuencia de proteína inmunoglobulina de tipo salvaje o parental o un fragmento funcional de la misma puede considerarse como una variante compuesta de dos partes de inmunoglobulina o fragmento funcional de la misma enlazadas por un residuo cisteína adicional. Del mismo modo, una variante modificada de una proteína de la cubierta de tipo salvaje o una variante modificada de una

inmunoglobulina o un fragmento funcional de la misma pueden considerarse como variantes compuestas de dos partes enlazadas por un aminoácido adicional con un  $pI$  mayor que 8, que afecta positivamente a la reactividad de dicho residuo cisteína. Cuando ambos, un residuo cisteína y un aminoácido con un  $pI$  mayor que 8 se introducen en una variante modificada de una proteína de la cubierta de tipo salvaje o una variante modificada de una  
 5 inmunoglobulina o un fragmento funcional de la misma, entonces dicha proteína puede considerarse como variante compuesta de tres partes, o de incluso más partes, si dichas proteínas comprenden aún más mutaciones.

En algunas realizaciones, la secuencia de ácido nucleico de la presente invención codifica además una o más secuencias peptídicas para propósitos de purificación y/o detección. En ciertas realizaciones de la presente  
 10 invención, las secuencias de ácido nucleico de la presente invención están comprendidas en una célula hospedadora.

Se prefieren particularmente péptidos que comprenden al menos 5 residuos histidina (Hochuli et al., 1988), que son también capaces de fijarse a iones metálicos, y pueden utilizarse por tanto para la purificación de la proteína a la que  
 15 están fusionados (Lindner et al., 1992). Se proporcionan también por la invención restos adicionales tales como los identificadores c-myc y FLAG utilizados comúnmente (Hopp et al., 1988; Knappik & Plückthun, 1994), el Strep-tag (Schmidt & Skerra, 1994; Schmidt et al., 1996), o el E-tag (GE Healthcare).

La variante modificada del primer y el segundo (poli)péptido/proteína de la presente invención puede comprender  
 20 adicionalmente residuos de aminoácidos requeridos para clonación, para expresión, o para transporte de proteínas. Los residuos de aminoácidos requeridos para clonación pueden incluir residuos codificados por secuencias de ácido nucleico que comprenden secuencias de reconocimiento para endonucleasas de restricción que se incorporan para permitir la clonación de las secuencias de ácido nucleico en vectores apropiados. Los residuos de aminoácidos  
 25 requeridos para expresión pueden incluir residuos que conducen a solubilidad o estabilidad incrementadas del (poli)péptido/proteína. Los residuos de aminoácidos requeridos para transporte de proteínas pueden incluir secuencias de señalización responsables del transporte de la variante modificada al periplasma de *E. coli*, y/o residuos de aminoácidos que facilitan la escisión eficiente de dichas secuencias de señalización. Residuos de aminoácidos adicionales requeridos para propósitos de clonación, expresión, transporte de proteínas, purificación  
 30 y/o detección a que se ha hecho referencia arriba son numerosos restos bien conocidos por el profesional experto en la técnica.

En otra realización, la presente invención se refiere a un vector que comprende una secuencia de ácido nucleico según la presente invención.

Como se describe también en esta memoria, el vector comprende o está constituido por una o más secuencias de  
 35 ácido nucleico que codifican una variante modificada de una proteína de la cubierta de un bacteriófago de tipo salvaje, en donde dicha variante modificada comprende o consiste en

- (a) una o más partes de dicha proteína de la cubierta de un bacteriófago de tipo salvaje, en donde una de  
 40 dichas partes comprende al menos aquella parte que causa o permite la incorporación de dicha proteína de la cubierta en la cubierta del fago;
- (b) un primer residuo cisteína, y
- (c) un aminoácido con un  $pI$  mayor que 8 que afecta positivamente a la reactividad de dicho primer residuo cisteína. En realizaciones adicionales, dicho vector comprende además una secuencia de ácido nucleico que  
 45 codifica una inmunoglobulina modificada o fragmento funcional de la misma, en donde dicha inmunoglobulina modificada o fragmento funcional consiste en
  - (a) una inmunoglobulina o un fragmento funcional de la misma, y
  - (b) un segundo residuo cisteína.

Como se describe también en esta memoria, el vector comprende o está constituido por una o más secuencias de  
 50 ácido nucleico que codifican una inmunoglobulina modificada o fragmento funcional de la misma, en donde dicha inmunoglobulina modificada o fragmento funcional comprende o consiste en

- (a) una inmunoglobulina o un fragmento funcional de la misma;
- (b) un segundo residuo cisteína, y
- (c) un aminoácido con un  $pI$  mayor que 8 que afecta positivamente a la reactividad de dicho residuo  
 55 cisteína. En otras realizaciones, dicho vector comprende adicionalmente una secuencia de ácido nucleico que codifica una variante modificada de una proteína de la cubierta de un bacteriófago de tipo salvaje, en donde dicha variante modificada comprende o consiste en
  - (a) una o más partes de dicha proteína de la cubierta de un bacteriófago de tipo salvaje, en  
 60 donde una de dichas partes comprende al menos aquella parte que causa o permite la incorporación de dicha proteína de la cubierta en la cubierta del fago; y
  - (b) otro residuo cisteína.

En ciertas realizaciones de la presente invención, los vectores de la presente invención están comprendidos en una  
 65 célula hospedadora.

El segundo (poli)péptido/proteína de la presente invención comprende una inmunoglobulina o fragmento funcional de la misma.

5 En el caso de fragmentos de anticuerpo monocatenarios Fv a que se ha hecho referencia anteriormente en esta memoria, el vector comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica los dominios VH y VL enlazados por un enlazador (poli)peptídico y en caso de los fragmentos de anticuerpo Fab, el vector comprende dos secuencias de ácido nucleico que codifican las cadenas VH-CH y VL-CL.

10 En una realización adicional, la presente invención se refiere a una célula hospedadora que contiene una secuencia de ácido nucleico según la presente invención o un vector según la presente invención. El primer (poli)péptido/proteína de la presente invención puede estar codificado por una secuencia de ácido nucleico comprendida en el mismo vector que el ácido nucleico que codifica el segundo (poli)péptido/proteína de la presente invención. En tal caso, la célula hospedadora puede comprender un vector que comprende secuencias de ácido nucleico que codifican ambos (poli)péptidos/proteínas. Alternativamente, el primer (poli)péptido/proteína de la presente invención puede estar codificado por una secuencia de ácido nucleico comprendida en un vector diferente que el ácido nucleico que codifica el segundo (poli)péptido/proteína de la presente invención. En tal caso, la célula hospedadora puede comprender dos vectores diferentes, uno que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica el primer (poli)péptido/proteína y otro que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica el segundo (poli)péptido/proteína.

20 En el contexto de la presente invención, el término "célula hospedadora" puede ser cualquiera de cierto número de células utilizadas comúnmente en la producción de proteínas heterólogas, con inclusión, pero sin carácter limitante de bacterias, tales como *Escherichia coli* (Ge et al., 1995), o *Bacillus subtilis* (Wu et al., 1993), hongos, tales como levaduras (Horwitz et al., 1988; Ridder et al., 1995) u hongos filamentosos (Nyyssönen et al., 1993), células de plantas (Hiatt & Ma, 1993; Whitelam et al., 1994), células de insecto (Potter et al., 1993; Ward et al., 1995), o células de mamífero (Trill et al., 1995). En realizaciones preferidas, la célula hospedadora es una célula hospedadora procariota, más preferiblemente una célula hospedadora Gram-negativa y muy preferiblemente *Escherichia coli*.

30 En otra realización preferida adicional, la presente invención se refiere a una variante modificada de una proteína de la cubierta de un bacteriófago de tipo salvaje codificada por una secuencia de ácido nucleico según la presente invención, un vector según la presente invención, o producida por una célula hospedadora según la presente invención.

35 Se describe también en esta memoria una partícula de bacteriófago que presenta un (poli)péptido/proteína en su superficie que puede obtenerse por un método que comprende:

causar o permitir la fijación de dicho (poli)péptido/proteína después de la expresión a un miembro de la cubierta proteica, en donde dicha fijación está causada por la formación de un enlace disulfuro entre un primer residuo cisteína comprendido en dicho miembro de la cubierta proteica y un segundo residuo cisteína comprendido en dicho segundo (poli)péptido/proteína, en donde dicho (poli)péptido/proteína o dicho miembro de la cubierta proteica comprende un aminoácido con un pI mayor que 8, que afecta positivamente a la reactividad de dicho primer o dicho segundo residuo cisteína. En ciertas realizaciones, dicho aminoácido con un pI mayor que 8 está comprendido dentro de dicho (poli)péptido/proteína. En otras realizaciones, dicho aminoácido con un pI mayor que 8 está comprendido dentro de dicho miembro de la cubierta proteica. En realizaciones preferidas, dicho (poli)péptido/proteína es una inmunoglobulina, o un fragmento funcional de la misma. En otras realizaciones adicionales, un aminoácido con un pI mayor que 8 está comprendido en dicho primer (poli)péptido/proteína, preferiblemente un miembro de la cubierta proteica, y un aminoácido con un pI mayor que 8 está comprendido en dicho segundo (poli)péptido/proteína, preferiblemente una inmunoglobulina, o un fragmento funcional de la misma.

50 Se describen también en esta memoria partículas de bacteriófago que contienen un vector según la presente invención, en donde dicho vector comprende una primera secuencia de ácido nucleico que comprende una primera secuencia de ácido nucleico que codifica un primer (poli)péptido/proteína que comprende un primer residuo cisteína y una segunda secuencia de ácido nucleico que comprende una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica un segundo (poli)péptido/proteína que comprende un segundo residuo cisteína, en donde uno de dichos (poli)péptidos/proteínas comprende un aminoácido con un pI mayor que 8 que afecta positivamente a la reactividad de al menos uno de dichos residuos cisteína. Muy preferiblemente, dicho segundo (poli)péptido/proteína comprende al menos un dominio funcional de una inmunoglobulina.

60 Las realizaciones preferidas del método de la presente invención a que se hace referencia anteriormente en esta memoria se aplican, mutatis mutandis, a los bacteriófagos de la presente invención.

En una realización adicional, la presente invención se refiere a una colección diversa de partículas de bacteriófago según la presente invención, donde cada una de dichas partículas de bacteriófago presenta un segundo (poli)péptido/proteína de entre una colección diversa de (poli)péptidos/proteínas.

65

Una "colección diversa de partículas de bacteriófago" puede designarse también como una "biblioteca" o una "pluralidad de partículas de bacteriófago". Cada miembro de una biblioteca de este tipo presenta un miembro distinto de la biblioteca.

5 En el contexto de la presente invención, el término "colección diversa" se refiere a una colección de al menos dos partículas o moléculas que difieren en al menos parte de sus composiciones, propiedades, y/o secuencias. Por ejemplo, una colección diversa de (poli)péptidos/proteínas es un conjunto de (poli)péptidos/proteínas que difieren al menos en una posición de aminoácido de su secuencia. Una colección diversa de (poli)péptidos/proteínas de este tipo puede obtenerse de diversas maneras, por ejemplo por mutagénesis aleatoria de al menos un codón de una  
10 secuencia de ácido nucleico que codifica un (poli)péptido/proteína de partida, por utilización de PCR propensa a errores para amplificar una secuencia de ácido nucleico que codifica un (poli)péptido/proteína de partida, o por utilización de cepas causantes de mutación como células hospedadoras en un método según la presente invención. Estos y otros métodos adicionales o alternativos para la generación de colecciones diversas de (poli)péptidos/proteínas son bien conocidos por una persona que tenga experiencia ordinaria en la técnica. Una  
15 "colección diversa de partículas de bacteriófago" puede designarse también como una biblioteca o una pluralidad de partículas de bacteriófago. Cada miembro de una biblioteca de este tipo presenta un miembro distinto de la biblioteca.

Se describe también en esta memoria un método para obtención de un (poli)péptido/proteína que tiene una propiedad deseada que comprende:

- (a) proporcionar la colección diversa de partículas de bacteriófago según la presente invención; y
- (b) cribar dicha colección diversa y/o seleccionar a partir de dicha colección diversa para obtener al menos una partícula de bacteriófago que presenta un (poli)péptido/proteína que tiene dicha propiedad deseada.

25 En el contexto de la presente invención, el término "propiedad diversa" se refiere a una propiedad determinada que debe tener uno de los (poli)péptido/proteínas de entre la colección diversa de (poli)péptidos/proteínas y que forma la base para cribado y/o selección de la colección diversa. Dichas propiedades deseadas comprenden propiedades tales como fijación a una diana, bloqueo de una diana, activación de una reacción mediada por la diana, actividad enzimática, y propiedades adicionales que son conocidas por una persona con experiencia ordinaria. Dependiendo  
30 del tipo de propiedad deseada, una persona con experiencia ordinaria será capaz de identificar el formato y los pasos necesarios para realizar el cribado y/o la selección. Es muy preferido un método en el cual dicha propiedad deseada es la fijación a una diana de interés.

Dicha diana de interés puede presentarse a dicha colección diversa de partículas de bacteriófago de una diversidad de modos bien conocidos por una persona con experiencia ordinaria, por ejemplo aplicada como recubrimientos sobre superficies para bioselección por afinidad en fase sólida, enlazadas a partículas tales como cuentas magnéticas para bioselección por afinidad en solución, o presentadas en la superficie de células para bioselección por afinidad en células enteras o bioselección por afinidad en secciones de tejido. Las partículas de bacteriófago que se han fijado a dicha diana puede recuperarse por una diversidad de métodos bien conocidos por una persona con  
40 experiencia ordinaria, por ejemplo por elución con tampones apropiados, sea por utilización de un gradiente de pH o de sal, o por elución específica utilizando una diana soluble.

Se describe también en esta memoria un (poli)péptido/proteína que comprende adicionalmente:

- (ba) poner en contacto dicha colección diversa de partículas de bacteriófago con la diana de interés;
- (bb) eluir partículas de bacteriófago que no se fijan a la diana de interés;
- (bc) eluir partículas de bacteriófago que se fijan a la diana de interés por tratamiento de los complejos de diana de interés y bacteriófagos que se fijan a dicha diana de interés formados en el paso (ba) en condiciones reductoras.

50 En condiciones reductoras, por ejemplo por incubación con DTT, los enlaces disulfuro se escinden, permitiendo así recuperar las partículas específicas de bacteriófago para tandas ulteriores de bioselección por afinidad y/o para identificación de los (poli)péptidos/proteínas que se fijan específicamente a dicha diana.

Se describe también en esta memoria un método para mejorar un sistema de presentación de cisteína por introducción de un aminoácido con un pI mayor que 8 en un primer o un segundo (poli)péptido/, tal que un primer residuo cisteína comprendido en dicho primer (poli)péptido/proteína forma más preferiblemente un enlace disulfuro con un segundo residuo cisteína comprendido en un segundo (poli)péptido/proteína que en un sistema de presentación de cisteína equivalente en el cual no se ha introducido ningún aminoácido de este tipo con un pI mayor que 8.

Se describe también en esta memoria un complejo que comprende

- (a) un primer (poli)péptido/proteína que comprende un primer residuo cisteína, y
- (b) un segundo (poli)péptido/proteína que comprende un segundo residuo cisteína,

65 en donde uno de dichos (poli)péptidos/proteínas comprende adicionalmente una secuencia de aminoácidos con un pI mayor que 8 que afecta positivamente a la reactividad de al menos uno de dichos residuos cisteína, y en donde dicho primer y dicho segundo (poli)péptido/proteína forman un enlace disulfuro por la vía de dichos residuos cisteína.



En realizaciones preferidas, dicho segundo (poli)péptido/proteína es un miembro de una colección diversa de segundos (poli)péptidos/proteínas presentada en una colección diversa de una pluralidad de partículas de bacteriófago. En ciertas realizaciones preferidas, dicho primer (poli)péptido/proteína es una proteína de la cubierta de fago. En otras realizaciones preferidas, dicho segundo (poli)péptido/proteína comprende una inmunoglobulina o un fragmento funcional de la misma, más preferiblemente un fragmento scFv o Fab. En otras realizaciones, la presente invención proporciona una célula hospedadora que comprende cualquiera de los complejos descritos anteriormente en esta memoria.

**Ejemplos**

*Ejemplo 1: Construcción de vectores nuevos*

Los vectores están basados en vectores de expresión conocidos descritos en WO 01/05950. Las cadenas pesada y ligera de fragmentos Fab se expresan a partir de un fagémido dicistrónico bajo el control de la región del promotor/operador lac. La primera casete de expresión comprende la secuencia señal ompA y el dominio variable y constante de la cadena ligera. La segunda casete de expresión comprende la secuencia señal phoA y el dominio variable y constante de la cadena pesada. Las cadenas pesada y ligera no están unidas por un enlace disulfuro. El gen III está codificado también en el mismo vector. Los residuos cisteína que forman el enlace disulfuro están localizados en el término N de pIII y en el término C del fragmento Fd de la cadena pesada. Las características principales de un vector típico CysDisplay se muestran en la Figura 1.

Se han construido nuevas variantes de vectores de presentación (pMORPH25, versiones A, B, C y E) basadas en el vector pMORPH25, que es un derivado de pMORPH23 (descrito en WO 04/013276). La secuencia y los mapas vectoriales de pMORPH23 y pMORPH25 que contienen un fragmento Fab HuCAL específico de Estrodiol-BSA se muestran en las Figuras 5, 6, 7 y 8. Las secuencias Cisteína-Tag de pMORPH23 y pMORPH25 son idénticas.

A fin de construcción de variantes de vectores con una Cisteína-Tag modificada, se ha digerido pMORPH25 con EcoRI y HindIII para retirar la secuencia de tipo salvaje C-terminal (pMORPH25\_WT tag). Se insertaron nuevos identificadores C-terminal de las versiones A, B, C y E por ligación de oligonucleótidos bicatenarios (ds) reasociados con salientes compatibles al vector de presentación pMORPH25 digerido con EcoRI y HindIII.

Las secuencias de los oligonucleótidos respectivos se resumen en la Tabla 2. Se reasociaron oligonucleótidos bicatenarios según el procedimiento siguiente: se incubaron 200 ng de cada una de las combinaciones de oligonucleótidos respectivas (v.g. Seq ID No 1 y Seq ID No 2 para pMORPH25 versión A) durante 20 minutos a 99°C seguido por enfriamiento a la temperatura ambiente, permitiendo así la reasociación de secuencias complementarias. Se ligó el dsDNA reasociado a pMORPH25 digerido según técnicas de DNA estándar (véase, v.g., Sambrook et al., 2001; Ausubel et al., 1999; Kay et al., 1996) y se transformó en células Top10F electrocompetentes (Invitrogen).

**Tabla 2: Oligonucleótidos utilizados para construcción de la casete identificadora de presentación**

Seq ID No1: pMORPH25_A_for
5'aattccagggggagcggagggtgcgccgacccatcatcaccatcactgcaaatgata3'
Seq ID No2: pMORPH25_A_rev
5'agcttatcatttgagtgatggtgatggtgcggcgacccctccgctccccctggg3'
Seq ID No3 pMORPH25_B_for
5'aattccagggggagcggagggtgcgccgacccatcataaacatcactgctgata3'
Seq ID No4 pMORPH25_B_rev
5'agcttatcagcagtgatggttatgatggtgcggcgacccctccgctccccctggg3'
Seq ID No5 pMORPH25_C_for
5'aattccagggggagcggagggtgcgccgacccatcatcaccataaatgctgata3'
Seq ID No6 pMORPH25_C_rev
5'agcttatcagcatttatggtgatggtgcggcgacccctccgctccccctggg3'
Seq ID No7 pMORPH25_E_for
5'aattccagggggagcggagggtgcgccgacaaacataaacataaatgctgata3'
Seq ID No8 pMORPH25_E_rev

5'agcttatcagcatttatgtttatgtttgtgcggcgccacctccgctccccctggg3'

La secuencia de aminoácidos del término C del fragmento de la cadena pesada del constructo de control pMORPH25 se muestra en la Tabla 3. Cuatro derivados de este tipo están marcados como "pMORPH25 versión A", "pMORPH25 versión B", "pMORPH25 versión C" y "pMORPH25 versión E" en la Tabla 3. Una variante lleva un residuo lisina sobrante en el mismo término C (variante A). En las variantes B y C, un residuo histidina, tres y un aminoácidos N-terminales al residuo cisteína reactivo, respectivamente, se cambiaron a un residuo lisina. En la variante E, tres de los cinco residuos histidina directamente N-terminales al residuo cisteína reactivo se cambiaron a residuos lisina.

10 **Tabla 3: Secuencias de aminoácidos de los términos C del fragmento de cadena pesada utilizado en la presente invención**

Constructo	Término C del fragmento de la cadena pesada
pMORPH25	PGGSGGAPHHHHHH <u>C</u>
pMORPH25 versión A	PGGSGGAPHHHHHH <u>C</u> K
pMORPH25 versión B	PGGSGGAPHHHKHH <u>C</u>
pMORPH25 versión C	PGGSGGAPHHHHHK <u>C</u>
pMORPH25 versión E	PGGSGGAPHKHKHK <u>C</u>

*Ejemplo 2: Fijación de fago a placas Ni-NTA*

15 Los seis residuos histidina directamente N-terminales al residuo cisteína reactivo en pMORPH25 confieren a las partículas de bacteriófago la capacidad de fijarse a placas Ni-NTA. En la versión A, se introdujo un residuo lisina C-terminal al residuo cisteína reactivo. En las versiones B, C y E de pMORPH25, este tramo de seis residuos histidina se destruyó por introducción de al menos un residuo lisina en cada uno de dichos tramos hexa-histidina. Presumiblemente, esto debería conducir a una pérdida de la capacidad de las partículas de bacteriófago que presentaban los fragmentos Fab a fijarse a las placas Ni-NTA.

20 Se produjeron por técnicas estándar (véase v.g. Kay et al., 1996 y el Ejemplo 2.2 de WO 01/05909) partículas de bacteriófago que presentaban fragmentos Fab. La fijación de partículas de bacteriófago a las placas Ni-NTA se determinó como se ha reseñado brevemente. Las partículas de fago ( $8 \times 10^8$ /pocillo), que se preincubaron durante 2 horas con solución de bloqueo (Chemiblock diluida con TBS, 0,1% Tween 20), se añadieron a placas de 96 pocillos pre-bloqueadas, recubiertas con níquel HIS-select iLAP HC (Sigma-Aldrich Co). Después de lavado con PBST y PBS, los fagos remanentes se visualizaron con un conjugado anti-M13-HRP (Amersham Pharmacia Biotech) y azul BM soluble (Boehringer Mannheim).

30 Los resultados se representan en la Figura 2.

Como puede verse en la Figura 2, las versiones B y E de pMORPH25 destruían eficazmente el identificador histidina. El constructo original se fijaba todavía a las placas Ni-NTA. Lo mismo es cierto para la versión A, que lleva todavía el identificador hexa-histidina, así como para la versión C, que lleva todavía un identificador penta-histidina, que parece ser suficiente para hacer posible la fijación de las partículas de bacteriófago a las placas Ni-NTA.

*Ejemplo 3: Tasa de presentación relativa*

40 La tasa de presentación relativa de las partículas de fago de los diversos constructos vectores (versión A versión E, como se reseña en el Ejemplo 1) se determinaron como se describe a continuación.

45 Se produjeron partículas de fago por procedimiento estándar (véase v.g. Kay et al., 1996 y el Ejemplo 2.2 de WO 01/05909). El número de partículas de fago y la tasa de presentación de anticuerpos de una solución de partículas de fago desconocidas se determinó en dos experimentos ELISA independientes. El título de partículas de fago de una preparación de fago se determina por un ELISA de captura anti-pIII, y la tasa de presentación de anticuerpos de una preparación de fago se determinó por un ELISA de captura anti-Fd. La tasa de presentación relativa se define como la señal anti-Fd dividida por la señal ELISA de captura anti-pIII.

50 Se recubrieron placas de microtitulación Maxisorp Nunc-Immuno con 100  $\mu$ l de una solución de anticuerpo de captura anti-pIII de 2,5  $\mu$ g/ml (MoBiTech, Göttingen, Alemania) y una segunda placa con 100  $\mu$ l de solución de anticuerpo de captura anti-Fd de 0,5  $\mu$ g/ml durante 12 horas a 4°C, y se bloquearon durante 2 horas a la temperatura ambiente con solución Chemiblock (Chemichon, International) diluida 1:2 en TPBS. Se añadieron diluciones seriadas de partículas de fago a las placas durante 2 horas. Después de 5 lavados con TBST, las

partículas de fago capturadas fueron detectadas por un anticuerpo anti-M13-HRP (específico anti-g8p, Amersham) seguido por detección de fluorescencia (QuantaBlue, Pierce).

- 5 Los títulos de partículas de fago pueden calcularse a partir de una curva de calibración de una solución de fago de referencia con concentración de partículas conocida. La tasa de presentación se calculó a partir de una preparación de partículas de fago de referencia definida con una tasa de presentación de fragmentos de anticuerpo conocida. La tasa de presentación de esta preparación de fago de referencia ha sido determinada según Johansen, L.K. et al. (1985).
- 10 Las tasas de presentación relativas se resumen en la Tabla 4. La tasa de presentación con el constructo original pMORPH25 se ajustó a 100%.

**Tabla 4: Tasas de presentación relativas de los constructos de este estudio**

	Experimento #1	Experimento #2	Experimento #3
<b>pMORPH25</b>	1,00	1,00	1,00
<b>pMORPH25 versión A</b>	0,98	1,52	
<b>pMORPH25 versión B</b>	1,29	2,14	1,51
<b>pMORPH25 versión C</b>	1,25	1,67	
<b>pMORPH25 versión E</b>			2,57

- 15 Como puede verse, los cuatro derivados de pMORPH25 exhibían tasas de presentación relativas mayores comparadas con pMORPH25 propiamente dicho. La tasa de presentación máxima era exhibida por pMORPH25 versión E, que exhibía una tasa de presentación 2,57 veces mayor referida al constructo original pMORPH25.
- 20 Este experimento demuestra el resultado sorprendente de que la destrucción del identificador hexa-histidina, conseguida por la introducción del aminoácido cargado positivamente lisina, conduce a una tasa de presentación incrementada en las partículas de bacteriófago.

*Ejemplo 4: Tasa de presentación funcional*

- 25 Las tasas de presentación funcionales se midieron en un ensayo ELISA de fijación de antígeno, que es específico para el ligante particular utilizado en este estudio. Se aplicó en forma de capa 1 µg de proteína recombinante sobre placas de microtitulación Maxisorp Nunc-Immuno durante 12 horas a 4°C y se bloqueó con PBS que contenía 5% de leche desnatada en polvo (J. M. Gabler Saliter GmbH & Co KG) durante 2 horas a la temperatura ambiente. Las preparaciones de fago de los diversos constructos de identificación se pre-incubaron en PBS, 5% de leche desnatada en polvo y 0,05% de Tween 20 en presencia o ausencia de DTT 20 mM. Se añadieron diluciones en serie de partículas de bacteriófago pre-bloqueadas a los pocillos Maxisorp recubiertos y se incubaron durante 2 horas. Después de lavado con PBST y PBS, los fagos remanentes se visualizaron con un conjugado anti-M13-HRP (Amersham Pharmacia Biotech) y azul BM soluble (Boehringer Mannheim).

- 35 En una primera serie de experimentos de control se añadieron además a los pocillos 25 mM de DTT. En una segunda serie de experimentos de control, las placas se recubrieron con BSA únicamente. Los resultados se muestran en la Figura 3 para las versiones A, B y C de pMORPH25, y en la Figura 4 para la versión E de pMORPH25.

- 40 Se identificaron las partículas funcionales de bacteriófago para todos los constructos testados. pMORPH25 versión A es ligeramente mejor que el pMORPH25 estándar. Las versiones B y C de pMORPH25 son claramente mejores que el pMORPH25 estándar. Las diferencias son muy pronunciadas cuando los pocillos individuales se inoculan con al menos 5 e+0,8 partículas de bacteriófago por pocillo. La tasa de presentación funcional de pMORPH25 versión E es incluso cerca de 4 veces mayor que la tasa de presentación del pMORPH25 estándar (indicada por las flechas en la Figura 4). Todas las partidas de control, es decir los pocillos en los cuales se añadió además DTT 25 mM y los pocillos en las placas recubiertas con BSA, no daban señales por encima del ruido de fondo.

- 50 Este experimento demuestra el resultado sorprendente de que la destrucción del identificador hexa-histidina, conseguida por la introducción del aminoácido lisina cargado positivamente, no sólo conduce a una tasa de presentación incrementada en las partículas de bacteriófago, sino que la tasa de presentación incrementada está estrechamente relacionada con la fijación funcional de partículas de bacteriófago. De hecho, el aumento de la tasa de presentación funcional es mayor aún que el aumento de la tasa de presentación relativa medida en el experimento anterior.

- 55 *Ejemplo 5: Presentación de bibliotecas diversas*

- Este ejemplo muestra que las mejoras en la tasa de presentación por las versiones de identificación modificadas (véase la Tabla 4) no se limitan a un fragmento Fab específico, sino que pueden aplicarse genéricamente a una biblioteca de fragmentos Fab diversas. Las tasas de presentación relativas de una biblioteca Fab que contenía fragmentos de cadena pesada de pMORPH25 versión E (término C = -HKHKHKC) se compararon con una biblioteca Fab que contenía fragmentos de cadena pesada del vector original pMORPH23 (término C: -HHHHHC). Véase la Tabla 3 para una comparación (las secuencias Cisteína-Tag de pMORPH23 y pMORPH25 son idénticas). La disposición experimental era idéntica a la descrita en el Ejemplo 3. Los resultados se ilustran en la Figura 9.
- 10 Como puede verse, esencialmente todos los entramados que comprenden los polipéptidos según la presente invención exhiben una tasa de presentación claramente mejorada en comparación con los vectores convencionales (ajustados a 1). Adicionalmente, la tasa de presentación relativa incrementada se observa con ambos fragmentos de cadena lambda y kappa.

#### 15 Breve descripción de los dibujos

##### Figura 1: Un vector CysDisplay típico

- Las cadenas pesadas y cadenas ligeras de los fragmentos Fab se encuentran bajo control de la región del promotor/operador lac. La primera casete de expresión comprende la secuencia señal ompA y el dominio variable (VL) y constante (CL) de la cadena ligera, y la segunda casete de expresión comprende la secuencia señal phoA y el dominio variable (VH) y constante (CH1) de la cadena pesada. La cadena pesada y la ligera no están unidas por un enlace disulfuro. El gen III está codificado también en el mismo vector (gIII). La cisteínas que forman el enlace disulfuro están localizadas en el término N de pIII y en el término C del fragmento Fd de la cadena pesada (indicado por 'C'). Accl, AflIII, XbaI, EcoRI y HindIII indican sitios de restricción que pueden utilizarse convenientemente para generar o modificar el vector de presentación.

##### Figura 2: Fijación a Placas Ni-NTA

- 30 "pM25" representa el constructo original "pMORPH25", y "pM25\_A" hasta "pM25\_E" representan los constructos "pMORPH25 versión A" hasta "pMORPH25 versión E", respectivamente. "pM25 w/o HIS tag" representa un constructo en el cual se deletionó el identificador histidina. La absorbancia se midió a 370 nm.

##### Figura 3: Tasas de presentación funcional de pMORPH de las versiones A, B y C

- 35 "pM25" representa el constructo original "pMORPH25", y "pM25\_A" hasta "pM25\_E" representan los constructos "pMORPH25 versión A" hasta "pMORPH25 versión E", respectivamente. Las barras de izquierda a derecha para cada constructo son como sigue: 5,0e+10 partículas de bacteriófago por pocillo, 5,0e+9 partículas de bacteriófago por pocillo, 5,0e+8 partículas de bacteriófago por pocillo, 5,0e+7 partículas de bacteriófago por pocillo, 5,0e+10 partículas de bacteriófago por pocillo más DTT 25 mM, y 5,0e+10 partículas de bacteriófago por pocillo en una placa recubierta con BSA.

##### Figura 4: Tasa de presentación funcional de pMORPH versión E

- 45 "pM25" representa el constructo original "pMORPH25", y "pM25\_E" representa el constructo "pMORPH25 versión E". Las barras de izquierda a derecha para cada constructo son como sigue: 1,0e+10 partículas de bacteriófago por pocillo, 1,0e+9 partículas de bacteriófago por pocillo, 5,0e+8 partículas de bacteriófago por pocillo, 2,5e+8 partículas de bacteriófago por pocillo, 1,25e+8 partículas de bacteriófago por pocillo, 6,25e+7 partículas de bacteriófago por pocillo, 1,0e+10 partículas de bacteriófago por pocillo en una placa recubierta con BSA, y 1,0e+10 partículas de bacteriófago por pocillo más DTT 25 mM. La flecha indica aquellas medidas en las cuales la diferencia entre el estándar pMORPH25 y pMORPH25 versión E era más pronunciada.

La Figura 5 muestra la secuencia de un derivado de pMORPH23 que contiene un fragmento Fab HuCAL específico de Estradiol-BSA.

- 55 La Figura 6 muestra un mapa vectorial de un derivado de pMORPH23 que contiene un fragmento Fab HuCAL específico de Estradiol-BSA.

- 60 La Figura 7 muestra la secuencia de un derivado de pMORPH23 que contiene un fragmento Fab HuCAL específico de Estradiol-BSA.

La Figura 8 muestra un mapa vectorial de un derivado de pMORPH25 que contiene un fragmento Fab HuCAL específico de Estradiol-BSA.

- 65 La Figura 9 muestra la tasa de presentación relativa de bibliotecas de fragmentos Fab basadas en la presente invención comparadas con bibliotecas de constructos convencionales. Las tasas de presentación de los constructos

convencionales (pMORPH23) se ajustaron a 1 (es decir 100%) para cada constructo individual. Se muestran las tasas de presentación relativas de los constructos mejorados, ilustradas por pMORPH25-versión E, en relación con la tasa de presentación de los constructos pMORPH23. Los diferentes entramados testados se indican en el eje x. Las barras blancas indican fragmentos de cadena lambda, y la barra negra indica fragmentos de cadena kappa.

5

## Referencias

- Albrecht, H., DeNardo, G.L. & DeNardo, S.J. (2006) Monospecific bivalent scFv-SH: Effects of linker length and location of an engineered cysteine on production, antigen binding activity and free SH accessibility. *Journal of Immunological Methods*, 310, 100-116.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Sedman, J. G., Smith, J. A. & Struhl, K. eds. (1999). *Current Protocols in Molecular Biology*. New York: John Wiley and Sons.
- Bass, S., Greene, R. & Wells, J.A. (1990) Hormone phage: an enrichment method for variant proteins with altered binding properties. *Proteins: Structure, Function and Genetics* 8, 309-314.
- Bird, R.E., Hardman, K.D., Jacobson, J.W., Johnson, S., Kaufman, B.M., Lee S.M., Lee T., Pope S.H., Riordan G.S. & Whitlow M. (1988). Single-chain antigen-binding proteins [published erratum appears in (1989). *Science* 244, 409]. *Science* 242, 423-6.
- Brinkmann, U., Reiter, Y., Jung, S., Lee, B. & Pastan, I. (1993). A recombinant immunotoxin containing a disulfide-stabilized Fv fragment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 7538-7542.
- Britto, P.J., Knipling, L. & Wolff, J. (2002) The Local Electrostatic Environment Determines Cysteine Reactivity in Tubulin. *Journal of Biological Chemistry*, 2002, 29018-29027.
- Bulja, G., Kortemme, T. & Goldenberg, D. P. (1998) Ionization-Reactivity Relationships for Cysteine Thiols in Polypeptides. *Biochemistry* 37, 8965-8972.
- Cramer, R., & Suter, M. (1993). Display of biologically active proteins on the surface of filamentous phages: a cDNA cloning system for selection of functional gene products linked to the genetic information responsible for their production. *Gene* 137, 69-75.
- Crissman, J. W. & Smith, G. P. (1984). Gene-III protein of filamentous phages: evidence for a carboxy-terminal domain with a role in morphogenesis. *Virology* 132, 445-455.
- Dunn, I. S. 1996. Phage display of proteins. *Curr. Opin. Biotechnol.* 7:547-553.
- Gao, C., Mao, S., Lo, C.-H. L., Wirsching, P., Lerner, R. A., & Janda, K. D. (1999). Making artificial antibodies: A format for phage display of combinatorial heterodimeric arrays. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 6025-6030.
- Ge, L., Knappik, A., Pack, P., Freund, C. & Plückthun, A. (1995). Expressing antibodies in *Escherichia coli*. *Antibody Engineering. A Practical Approach* (Ed. C.A.K. Borrebaeck). IRL Press, Oxford, pp. 229-266.
- Glockshuber, R., Malia, M., Pfitzinger, I. & Plückthun, A. (1992). A comparison of strategies to stabilize immunoglobulin Fv-fragments. *Biochemistry* 29, 1362-1366.
- Greenwood J., Willis A.E. & Perham R.N. (1991) Multiple display of foreign peptides on a filamentous bacteriophage. Peptides from *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein as antigens. *J. Mol. Biol.* 220, 821-827.
- Hansen, R.E., Ostergaard, H. & Winther, J.R. (2005) Increasing the Reactivity of an Artificial Dithiol-Disulfide Pair through Modification of the Electrostatic Milieu. *Biochemistry*, 44, 5899-5906.
- Hiatt, A. & Ma, J.K. (1993). Characterization and applications of antibodies produced in plants. *Int. Rev. Immunol.* 10, 139-152.
- Hochuli, E., Bannwarth, W., Döbeli, H., Gentz, R. & Stüber, D. (1988). Genetic approach to facilitate purification of recombinant proteins with a novel metal chelate adsorbent. *Bio/Technology* 6, 1321-1325.
- Hopp, T.P., Prickett, K.S., Price, V.L., Libby, R.T., March, C.J., Cerretti, D.P., Urdal, D.L. & Conlon, P.J. (1988). A short polypeptide marker sequence useful for recombinant protein identification and purification. *Bio/Technology* 6, 1204-1210.
- Horwitz, A. H., Chang, C. P., Better, M., Hellstrom, K. E. & Robinson, R. R. (1988). Secretion of functional antibody and Fab fragment from yeast cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85, 8678-8682.
- Huston, J.S., Levinson, D., Mudgett-Hunter, M., Tai, M.S., Novotny, J., Margolies, M.N., Ridge, R.J., Brucoleri, R.E., Haber, E. & Crea, R. (1988). Protein engineering of antibody binding sites. Recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue produced in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85, 5879-5883.
- Jespersen, L. S., Messens, J. H., De Keyser, A., Eeckhout, D., Van de B., I, Gansemans, Y. G., Lauwereys, M. J., Vlasuk, G. P. & Stanssens, P. E. (1995). Surface expression and ligand-based selection of cDNAs fused to filamentous phage gene VI. *Biotechnology (N.Y.)* 13, 378-382.
- Kay, B. K., Winter, J. & McCafferty, J., eds. (1996). *Phage display of peptides and proteins: a laboratory manual*. Academic Press, Inc., San Diego.
- Knappik, A. & Plückthun, A. (1994). An improved affinity tag based on the FLAG peptide for detection and purification of recombinant antibody fragments. *BioTechniques* 17, 754-761.
- Knappik, A., Ge, L., Honegger, A., Pack, P., Fischer, M., Wellenhofer, G., Hoess, A., Wölle, J., Plückthun, A. & Virnekäs, B. (2000). Fully synthetic Human Combinatorial Antibody Libraries (HuCAL) based on modular consensus frameworks and CDRs randomized with trinucleotides. *J. Mol. Biol.* 296, 57-86.
- Krebber, C. (1996). *Selektiv infektiöse Phagen: In vivo Selektion auf Interaktionen zwischen Protein und Ligand*. Dissertation at the University of Zurich.

- Krebber, C., Spada, S., Desplancq, D., Krebber, A., Ge, L. & Plückthun, A. (1997). Selectively-infective phage (SIP): A mechanistic dissection of a novel in vivo selection for protein-ligand interactions. *J. Mol. Biol.* 268, 607-618.
- Lindner, P., Guth, B., Wülfing, C., Krebber, C., Steipe, B., Müller, F. & Plückthun, A. (1992). Purification of native proteins from the cytoplasm and periplasm of *Escherichia coli* using IMAC and histidine tails: a comparison of proteins and protocols. *Methods: A Companion to Methods Enzymol.* 4, 41-56.
- 5 Maruyama I. N., Maruyama H. I. & Brenner S. (1994) Lambda foo: a lambda phage vector for the expression of foreign proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 8273-8277.
- McGregor, D. (1996). Selection of proteins and peptides from libraries displayed on filamentous bacteriophage. *Mol. Biotechnol.* 6:155-162.
- 10 Mikawa Y. G., Maruyama I. N. & Brenner S. (1996). Surface display of proteins on bacteriophage lambda heads. *J. Mol. Biol.* 262, 21-30.
- Nyssonen, E., Penttila, M., Harkki, A., Saloheimo, A., Knowles, J. K. & Keranen, S. (1993). Efficient production of antibody fragments by the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Bio/Technology* 11, 591-595.
- Parmley S. F. & Smith G.P. (1988) Antibody-selectable filamentous fd phage vectors: affinity purification of target genes. *Gene* 73, 305-318.
- 15 Paschke M. (2006). Phage display systems and their applications. *Applied Microbiol. and Biotechnol.* 70(1):2-11.
- Potter, K. N., Li, Y. & Capra, J. D. (1993). Antibody production in the baculovirus expression system. *Int. Rev. Immunol.* 10, 103-112.
- Ridder, R., Schmitz, R., Legay, F. & Gram, H. (1995). Generation of rabbit monoclonal antibody fragments from a combinatorial phage display library and their production in the yeast *Pichia pastoris*. *Bio/Technology* 13, 255-260.
- 20 Sambrook, J. & Russell, D. (2001). *Molecular Cloning: A laboratory manual* (Third edition), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, USA.
- Schmidt, T.G. & Skerra, A. (1994). One-step affinity purification of bacterially produced proteins by means of the "Strep tag" and immobilized, recombinant core streptavidin. *J.Chromatogr. A* 676, 337-345.
- 25 Schmidt, T.G., Koepke, J., Frank, R., Skerra, A. (1996). Molecular interaction between the Strep-tag affinity peptide and its cognate target, streptavidin. *J. Mol. Biol.* 255, 753-766.
- Singh RR & Appu Rao AG. (2002). Reductive unfolding and oxidative refolding of a Bowman-Birk inhibitor from horsegram seeds (*Dolichos biflorus*): evidence for "hyperreactive" disulfide bonds and rate-limiting nature of disulfide isomerization in folding. *Biochim Biophys Acta.* 1597(2):280-91.
- 30 Skerra, A. & Plückthun, A. (1988). Assembly of a functional immunoglobulin Fv fragment in *Escherichia coli*. *Science* 240, 1038-1041.
- Smith G. P. (1985). Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* 228, 1315-1317.
- Snyder, G.H., Cennerazzo, M.J., Karalis, A.J. & Filed, D. (1981). Electrostatic Influence of Local Cysteine Environments on Disulfide Exchange Kinetics. *Biochemistry* 20, 6509-6519.
- 35 Snyder, G.H., Reddy, M.K., Cennerazzo, M.J. & Filed, D. (1983). Use of local electrostatic environments of cysteines to enhance formation of a desired species in a reversible disulfide exchange reaction. *Biochimica et Biophysica Acta* 749, 219-226.
- Sternberg N. & Hoess R. H. (1995). Display of peptides and proteins on the surface of bacteriophage lambda. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 1609-1613.
- 40 Trill, J. J., Shatzman, A. R. & Ganguly, S. (1995). Production of monoclonal antibodies in COS and CHO cells. *Curr. Opin. Biotechnol.* 6, 553-560.
- Ward, V. K., Kreissig, S. B., Hammock, B. D. & Choudary, P. V. (1995). Generation of an expression library in the baculovirus expression vector system. *J. Virol. Methods* 53, 263-272.
- 45 Whitelam, G. C., Cockburn, W. & Owen, M. R. (1994). Antibody production in transgenic plants. *Biochem. Soc. Trans.* 22, 940-944.
- Wu, X. C., Ng, S. C., Near, R. I. & Wong, S. L. (1993). Efficient production of a functional single-chain antidigoxin antibody via an engineered *Bacillus subtilis* expression-secretion system. *Bio/Technology* 11, 71-76.
- 50 Yang YF & Wells WW. (1991). Identification and characterization of the functional amino acids at the active center of pig liver thioltransferase by site-directed mutagenesis. *J Biol. Chem.* 266(19):12759-65.

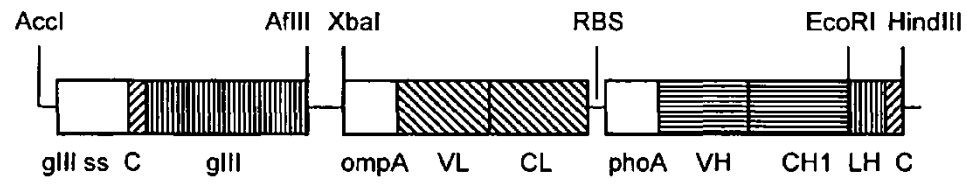
## REIVINDICACIONES

1. Un método para formar un enlace disulfuro entre un primer residuo cisteína comprendido en un primer (poli)péptido/proteína y un segundo residuo cisteína comprendido en un segundo (poli)péptido/proteína, comprendiendo el método:
- 5 (a) introducir artificialmente un aminoácido con un pI mayor que 8 en dicho primer (poli)péptido/proteína o segundo (poli)péptido/proteína, en donde dicho aminoácido afecta positivamente a la reactividad de al menos uno de dichos residuos cisteína,
- 10 y
- (b) causar o permitir la fijación de dicho primer (poli)péptido/proteína a dicho segundo (poli)péptido/proteína, en donde dicha fijación está causada por la formación de un enlace disulfuro entre el primer residuo cisteína y el segundo residuo cisteína,
- 15 en donde dicho primer (poli)péptido/proteína es un miembro de la cubierta proteica de una partícula de bacteriófago, y en donde dicho segundo (poli)péptido/proteína comprende una inmunoglobulina o un fragmento funcional de la misma.
2. El método de la reivindicación 1, en donde dicho aminoácido con un pI mayor que 8 se introduce en dicho primer (poli)péptido/proteína.
3. El método de la reivindicación 1, en donde dicho aminoácido con un pI mayor que 8 se introduce en dicho segundo (poli)péptido/proteína.
- 25 4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho segundo (poli)péptido/proteína se presenta en la superficie de una partícula de bacteriófago.
5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho enlace disulfuro se forma en el espacio periplasmático de una célula hospedadora.
- 30 6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho aminoácido con un pI mayor que 8 se selecciona de lisina y arginina.
7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho miembro de la cubierta proteica es
- 35 (i) una variante truncada de una proteína de la cubierta de un bacteriófago de tipo salvaje, en donde dicha variante truncada comprende al menos aquella parte de dicha proteína de la cubierta de tipo salvaje que causa la incorporación de dicha proteína de la cubierta en la cubierta proteica de una partícula de bacteriófago o
- 40 (ii) una variante modificada de una proteína de la cubierta de un bacteriófago de tipo salvaje, en donde dicha variante modificada es capaz de incorporarse en la cubierta proteica de la partícula de bacteriófago.
8. Una secuencia de ácido nucleico que codifica una variante modificada de una proteína de la cubierta de un bacteriófago de tipo salvaje, en donde dicha variante modificada comprende:
- 45 (a) una o más partes de dicha proteína de la cubierta de un bacteriófago de tipo salvaje, en donde una de dichas partes comprende al menos aquella parte que causa o permite la incorporación de dicha proteína de la cubierta en la cubierta del fago,
- (b) un residuo cisteína N-terminal o C-terminal, y
- 50 (c) un aminoácido con un pI mayor que 8, que está localizado dentro de 5 aminoácidos adyacente a y que afecta positivamente a la reactividad de dicho residuo cisteína N-terminal o C-terminal.
9. Una secuencia de ácido nucleico que codifica una inmunoglobulina modificada o fragmento funcional de la misma, en donde dicha inmunoglobulina modificada o un fragmento funcional comprende:
- 55 (a) una inmunoglobulina o un fragmento funcional de la misma,
- (b) un residuo cisteína N-terminal o C-terminal, y
- (c) un aminoácido con un pI mayor que 8, que está localizado dentro de 5 aminoácidos adyacente a y que afecta positivamente a la reactividad de dicho residuo cisteína N-terminal o C-terminal.
10. Un vector que comprende el ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 8 ó 9.
- 60 11. Una célula hospedadora que comprende la secuencia de ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 8 ó 9 o el vector de la reivindicación 10.
12. Una colección diversa de partículas de bacteriófago que puede obtenerse por el método de la reivindicación 4, en donde cada una de dichas partículas de bacteriófago presenta un segundo (poli)péptido/proteína de una colección diversa de segundos (poli)péptidos/proteínas.
- 65

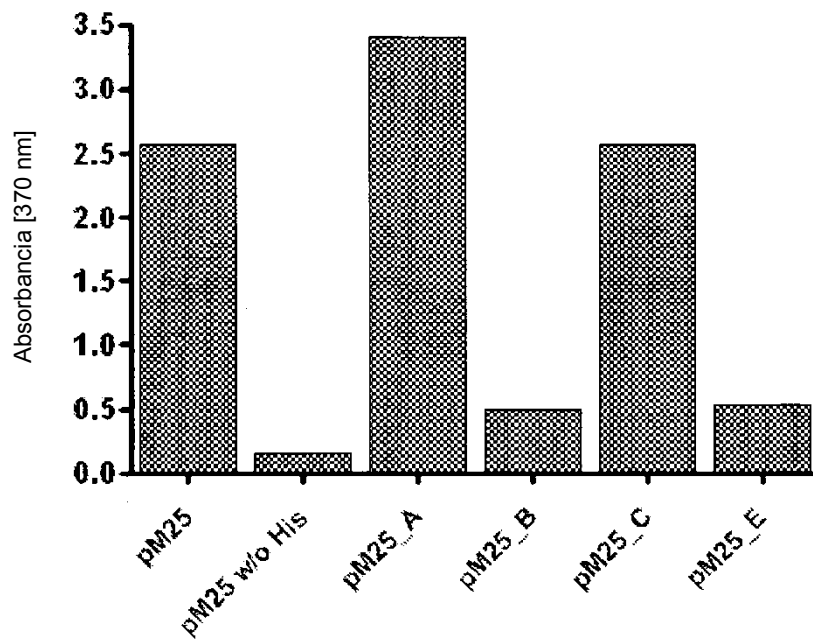
13. Un complejo que comprende  
(a) un primer (poli)péptido/proteína que comprende un primer residuo cisteína; y  
(b) un segundo (poli)péptido/proteína que comprende un segundo residuo cisteína, en donde uno de dichos  
5 (poli)péptidos/proteínas comprende adicionalmente un aminoácido con un pI mayor que 8, que está  
localizado dentro de cinco aminoácidos adyacentes a y que afecta positivamente a la reactividad de al menos  
uno de dichos residuos cisteína,  
en donde dicho primer (poli)péptido/proteína es un miembro de la cubierta proteica de una partícula de bacteriófago,  
en donde dicho segundo (poli)péptido/proteína comprende una inmunoglobulina o un fragmento funcional de la  
10 misma,  
y en donde dicho primer y dicho segundo (poli)péptido/proteína forman un enlace disulfuro por la vía de dichos  
residuos cisteína.
14. El complejo de la reivindicación 13, en donde dicho segundo (poli)péptido/proteína es un miembro de una  
15 colección diversa de segundos (poli)péptidos/proteínas presentados en una colección diversa de una pluralidad de  
partículas de bacteriófago.



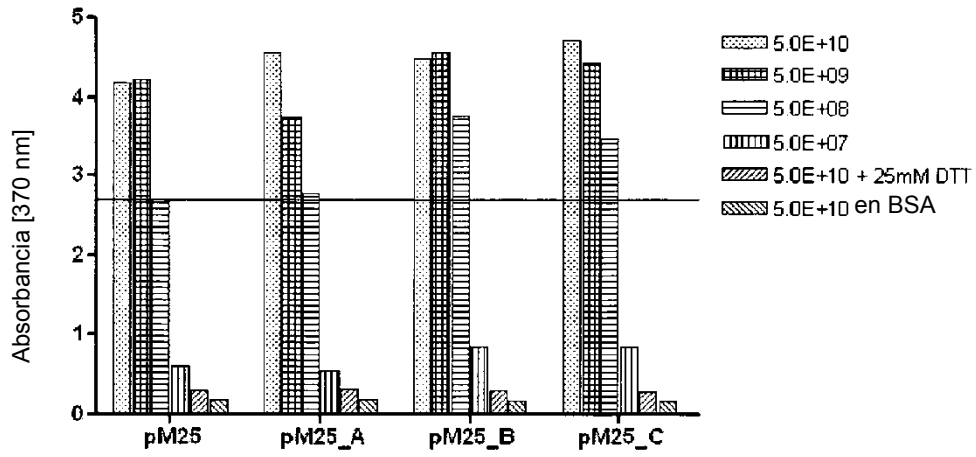
**Figura 1:** Un vector CysDisplay típico



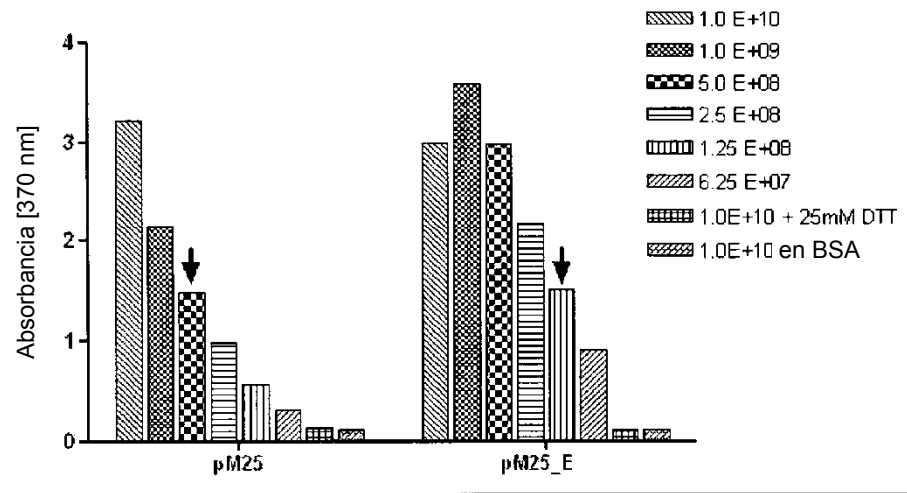
**Figura 2:** Fijación a placas Ni-NTA



**Figura 3:** Tasas de presentación funcionales de pMORPH25 versiones A, B y C



**Figura 4:** Tasa de presentación funcional de pMORPH25 versión E

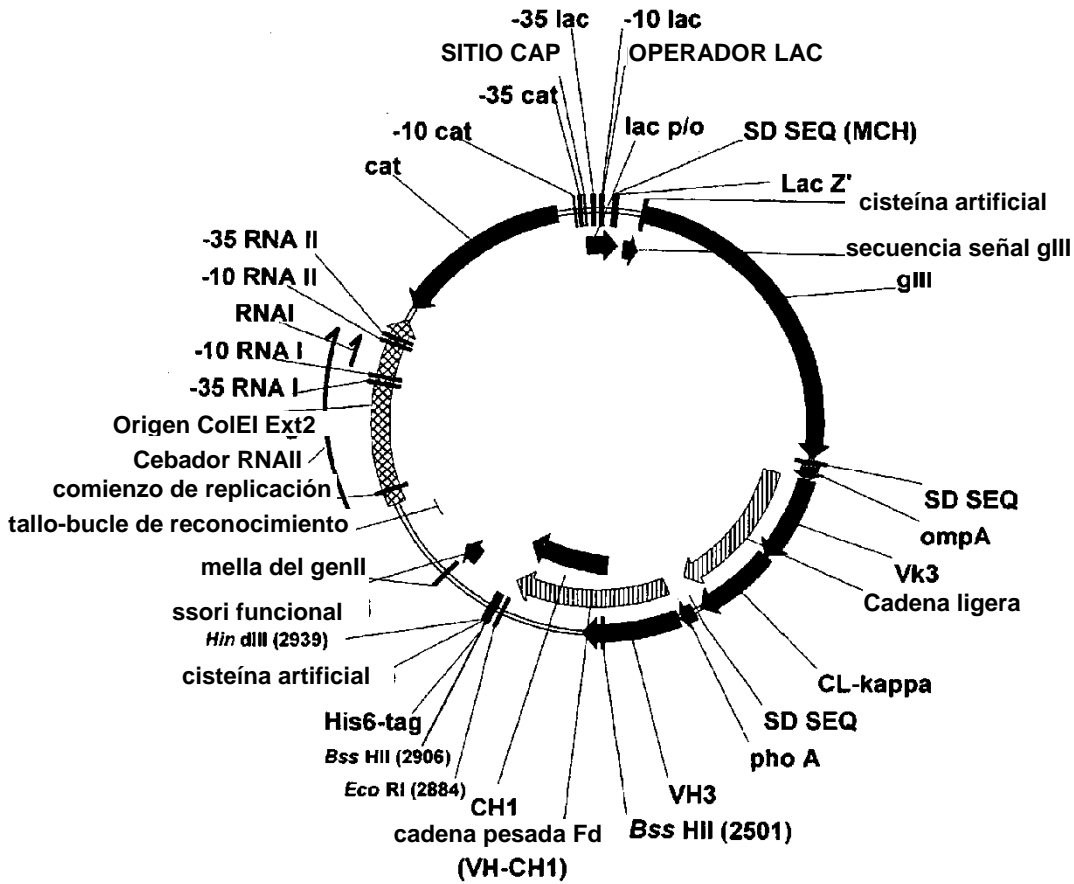


**Figura 5:** Secuencia de un derivado de pMORPH23 que contiene un fragmento Fab HuCAL específico de Estrodiol-BSA

ctcgtatgtgtggaattgtgagcggataacaattcacacaggaacagctatgacctgattacgaattctagatacagg  
gcaaaaaatgaaaaactgctgttcgcatccgctgggtggtccgttctatagccatagcgactactgacacatcgagttgca  
gaaacagttgaaagtgttagcaaaaaccatagcaaaaattcattactaacgctctggaagacgacaaaaacttagatcgta  
cgtaactatgagggtgctctggaatgctacagcgttgtagttgtactggtgacgaaactcagttacggtacatgggtct  
atgggctgctatccctgaaaatgaggggtggtctgaggggtggcgttctgaggggtggcgtctgaggggtggcgtacta  
aacctcctgagtagcgtgatacactatccgggctatactatatacaacctctcgacggcactatccgctggtactgagcaaa  
accccgtaactcctaactctctctgagggagctcagcctcttaatactttcattgcttcaagaataatagggtccgaaataggcagggg  
gcatlaactgtttatcgggcactgttactcaaggcactgaccccgtaaaactattaccagtagactcctgtatcatcaaaagcc  
atgtatgacgcttactggaacggtaaaatcagagactgccttccattctggcttaatgaggatccattcgtttggaatacaagg  
ccaatcgtctgacctgcctcaacctcctgcaatgctggcggcggcctctggtggtggtctggtggcggcctgaggggtggcggct  
ctgaggggtggcggctctgaggggtggcggcctgaggggtggcggctccgggtggcggcctccgggtccgggtgattttgattatgaaaa  
atggcaaacgtaataaggggctatgaccgaaaaatgcccagtaaaacgctacagctgacgctaaaggcaactgatt  
ctgctgactgattacgggtgctatcgatggttctggtgacgtttccggcctgtaaatggtaatggtgactggtgatttctg  
ggctcaattcccaaatggcctcaagctgagggatgataatcaccttaatagaalaatccgcaatattacctcttgcctcag  
cggttgaaatgctccctatgctcttggcgtgtaaacatataatctatgatttgacaaaaaactattccgtggtgctt  
gcttcttttatgttgcaccttatagtatgatttctgacgttctcaacatactgctgaataaggagcttaagtaatactagataacg  
agggcaaaaaatgaaaaagacagctatcgcgattgacgtggcactggcgtggttctgctaccgtagcgcaggccgatctgct  
tgaccagagcccgccgacccctgagcctgctcggggcgaacgtgacccctgagctgacagcgcaggcctgtttctcgt  
ctatctggcttggtaaccagcagaaccaggctcaagcaccgctctattaattatggcttctcgtcgtgcaactgggtcccg  
cgcgttttagcggctcggatccggcacggatttaccctgaccattagcagcctggaacctgaagactttgacgttattatgcca  
gcagcgtgtaattattctattaccttggccagggtacgaaaatgaaataaacgtaacggtggctgctccgagcgtttattttcc  
gccgagcgtgaaacaactgaaaagcggcagcggcagcgtggtgctgctgaaacaactttatccgctgaaagcgaagtt  
cagtgaaagtagacaacgcgctgcaaaagcggcaacagccaggaaagcgtgaccgaaacaggatagcaaaagtagcacc  
tattctgagcagcaccctgaccctgagcaaaagcggattatgaaaaacataaagtgatgctgctgaaagtagccatcaaggt  
ctgagcagcccgtgactaaatctttaaactggtggcagggcctgataagcatgctgtaggagaaaaataaaatgaaacaaagcac  
tattgactgacactctaccgttctctcaccctgttaccaaaagccagggtcaattggtgaaagcggcggcggcctggtgc  
aacggggcggcagcctgctgagctgagcggcctccggattacccttctcttattggtgtaattgggtgccaagcccctg  
ggaagggtctcagtggtgagcgglatccattattctgtagctctacattatgcgatagcgtgaaaggccgtttaccattc  
acgtgataatcgaaaaacaccctgatactgcaaatgaacagcctgctgctggaaagatacggccgttattatgctgctgct  
ctcataagtggtggtggtggtttgatcattggggccaaaggcaccctggtagcgttagctcagcgtcgaccaaagggtcaa  
gctgtttccgctggctccgagcagcaaaagcaccagcggcggcagcggcctccctgggctgctggttaaagattattccgg  
aacagctaccgtgagctggaacagcggggcgtgaccagcggcgtgataccttccggcgtgctgcaaaagcagcggcct  
gtatagcctgagcagcgttgtagccgtgcccagcagcagccttaggcactcagacctatattgcaacgtgaaccataaacggag

caacaccaaagtggaataaaaaagtggaaccgaaaaagcgaattcccaggggggagcgggagcgcgcgaccatcatcac  
 catcactgctgataagcttgacctggaagtgaataatggcgcagattgtgacacattttttgtctgcccgttaatagaaattgtaa  
 cgtaataattttgtaaaattcgcgttaaattttgtaaatcagctcatttttaaccaataggccgaaatcggcaaaatcccctataaat  
 caaagaatagaccgagataggggtgaggtgtccagtttggaacaagagtcactatataagaacgtggaactcaacgtca  
 aagggcgaaaaaccgtctatcagggcgatggcccactacgagaacctaccctaatacaagtttttggggtcgagggtccgta  
 aagcactaaatcggaaaccctaaaggggagccccgatttagagcttgacggggaaagccggcgaaacgtggcgagaaagga  
 aggggaagaagcgaaggagcggcgctagggcgctggcaagtgtagcggtcacgctgcgctgtaaccaccacaccggcc  
 gcgcttaatgcccgcctacagggcgctgctagccatgtgagcaaaaggccagcaaaaggccaggaaccgtaaaaaggcc  
 gcgtgtcggcgttttccataggtccgccccctgacgagcatcacaataatcgacgctcaagtcagagggtggcgaaccgg  
 acaggactataaagataccaggcgtttccccctggaagctccctcgtgctctcctgttccgacccctgcccgttaccggatcct  
 gtccgcttctccctcgggaagcgtggcgtttctcatagctcagctgtaggtatctcagttcgggtgtaggtcgttccccaagct  
 gggcgtgtgacgaacccccctcagtcgaccgctgcgcttaccgtaactatcgttctgagccaacccggtaagacac  
 gacttatcgccactggcagcagccactggtaacaggattagcagagcgggtatgtaggggtgctacagagttctgaagtg  
 tggcctaactcggctacactagaagaacagatttggatctgcgctcgtctgtagccagttacctcggaaaaagagttgtag  
 ctctgatccggcaaaacaaaccaccgctggtagcgggtggtttttgttgcaagcagcagattacgcgcagaaaaaaaggatct  
 caagaagatccttctctcaggggtcagcgtcagtggaacgaaaactcagtaagggttttggcagatcagcacc  
 aggcgttaaggccaccaataactgccttaaaaaaatacgcgcccgccctgccactcatcgcagctactgttaaltcattaagca  
 ttctccgacatggaagccatcacaacggcatgatgaacctgaatcgcagcggcatcagcaccttgccttgcgtataata  
 ttgcccatagtgaaaacggggcggaagaagttgctcatatggctacgttaaatcaaaactgggtaaaactaccagggttg  
 gctgagcgaaaaaacataattcataaaacccttagggaaataggccaggttttaccgtaacacgccacatcttgcgaatata  
 gtgtagaaaactcgggaaatcgtcgtggtatcactccagagcgaagaaaactcagtttgcctatggaaaaacgggtglaacaa  
 ggggtaacactatcccatatcaccagctaccgctcttcatgcatcaggaactcgggtgagcattcatcaggcgggcaagaa  
 tgtgaataaaggccgataaaaactgtgcttattttcttaccggtcttaaaaaggccgtaataatccagctgaacggctcgttatag  
 gtacattgagcaactgactgaaatgcctcaaatgttcttaccgaigcattgggatataatcaacgggtggtatccagtgatttttct  
 ccattttagcttcttagctcctgaaaatcgcgalaactcaaaaaaacgccggtagtgatcttattcattatgggaaagttggaa  
 cctcaccggcagctaatgtgagttagctcactcattagccacccaggctttacactttatgcttccgg

**Figura 6:** Mapa vectorial de un derivado de pMORPH23 que contiene un fragmento Fab HuCAL específico de Estradiol-BSA



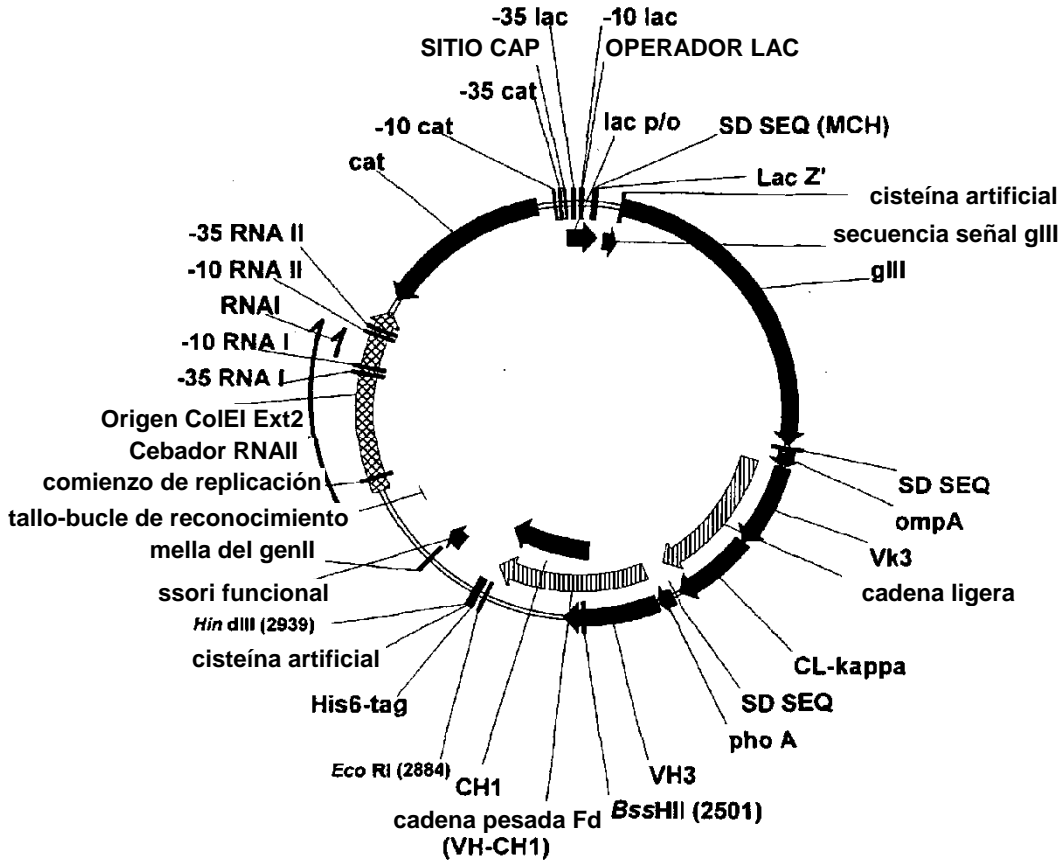
**Figura 7:** Secuencia de un derivado de pMORPH25 que contiene un fragmento Fab HuCAL específico de Estrodiol-BSA

ctcgtatgtgtggaattgtgagcgggataacaatttcacacaggaacagctatgaccalgtattacgaatttctagtatacagg  
gcaaaaaatgaaaaactgctgttcgcatccgctgggtggtccgttctatagccatagcgactactgcgacatcgagttgca  
gaaacagltgaaagttglttagcaaaaccccatacagaaaattcattactaacgtctgaaagacgcacaaaacttttagatcgta  
cgtaactatgagggctgtctgtggaatgctacaggcgtttagtttactggtgacgaaactcagttacggtacatgggtcct  
atgggctgtctacccctgaaaatgaggggtggtctctgaggggtggcgtctgaggggtggcgtctgaggggtggcgtacta  
aacctcctgagtagcgtgatacacctattccgggtatacttatacaaccctctcgacggcacttatccgctggtactgagcaaa  
accccgctaatcctaatcctctctttagaggagctcagcctcttaactttcatgtttcagaataataggtccgaaataggcagggg  
gcattaactgtttatagggcactgttactcaaggcactgaccccgtaaaacttattaccagtagactcctgtatcatcaaaagcc  
atgtatgacgcttactggaacggtaaaatcagagactgcgcttccattctggcttaatgaggatccattcgtttgtaatacaagg  
ccaalctgtgacctgcctcaacctcctgcaatgctggcggcggctctgggtggtctggtggcggctctgaggggtggcggct  
ctgaggggtggcggctctgaggggtggcggctctgaggggtggcggctccgggtggcggctccgggtccgggtatttgattgaaaa  
atggcaaacgctaalaaggggctatgaccgaaaatgccgatgaaaacgcgctacagctgacgctaaaggcaaacgtgatt  
ctgtcgtactgattacgggtgctctatcgatggttccattggtagcgttccggcctgctaattgtaaatggtgctactggtgatttct  
ggctctaattcccaatggctcaagtcggtagcgggtgataaattcactttaaataaattccgcaaatattaccttcttgcctcagt  
cgggtgaaatgctgcccattatgcttggcgtgtaaacatataatcttattgattgacaaaaataaactattccgtggtgctt  
gcttctttatgtgtgccaccttattgtatgtatttgcagcttctgaacalactgctglaaataaggagcttaagtaatactagataacg  
agggcaaaaaatgaaaagacagctatcgcgattgacgtggcactggctggttctgctaccgtagcgcaggccgatcgtgc  
tgaccagagcccggcgaccctgagcctgtctccggcggaacgtgacccctgagctgcagagcgcagccagctgttctcgtt  
cttactggttggtagcagcaaaaccaggtaagcaccgctctattaattatgggtctctcgtcgtgcaactggggctccgg  
cgcgttttagcggctctggatccggcaccgatttaccctgaccattagcagcctggaacctgaagacttgcgacttatttgcca  
gcagcgtggaattattctattaccttggccagggtacgaaagttgaaataaacgtacgggtggctgctccgagcgtgttattttcc  
gccgagcgtgaaacaactgaaaagcggcaccggaacgctggtgctgctgaacaactttatccgctgaagcgaaggt  
cagtggaagtagacaacgcgctgcaaaagcggcaacagccaggaaagcgtgaccgaacaggatagcaagatagcacc  
tattctgagcagcaccctgaccctgagcaaaagcggattatgaaaacataaagtgatgctgcaagtgaccatcaagg  
ctgagcagcccgtgactaaatctttaaactggtggcagggcctgalaagcatgctgtaggagaaaataaataaagcaaaagcac  
tattgcaactggcacttaccgttgccttcaaccctgttaccaaagcccagggtgcaattggtggaagcggcggcggcctggtgc  
aacggggcggcagcctgctgctgagctgcggcctccggatttacccttcttcttattggtgtaattgggtgccaagcccctg  
ggaagggctcagtggtgagcggatccattattctggtagctctacctattatgcgatagcgtgaaagccgtttaccatttc  
acgtgataattcgaaaaacacctgtatctgcaaatgaacagcctgctgcggaagatagcccgctgattattgctgctgct  
cttcataagtggtggtggtgggtttgatcatggggccaagccaccctggtgacggtagctcagcgtcgaccaaagggtcaa  
gctgtttccgctggctccgagcagcaaaagcaccagcggcggcagcggctgcccctggcctggtttaaagatttccgg  
aacagctcaccgtgagctggaacagcgggctgaccagcggcgtgcataccttccggcgggtgctgcaaaagcagcggcct  
gtatagcctgagcagcgtgtgaccgtgagcagcagccttaggactcagacctatatttgaacgtgaaccataaacggag  
caacaccaaaagtgataaaaaagtggaaccgaaaagcgaattcccaggggggagcggagggtgcccgcaccatcatcac



catcactgctgataagcctgacctgtgaagfgaaaaatggcgcagattgicgcacatTTTTTgtcgcggttaatgaaattgaaa  
 cgtaataTTTTgttaaaatcgcggttaaTTTTgttaaatcagctcatTTTTaaccaataggccgaaatcggaacaaatccctataaat  
 caaaagaatagaccgagataggggtgagtggtccagttggaaacaagagtcactattaagaacgtggactccaacgtca  
 aagggcgaaaaaccgtctatcagggcgatggcccactacgagaaccatcacctaatacaagTTTTggggtcgagggtccgta  
 aagcactaaatcggaaccctaaggaggcccccgattagagcctgacggggaaagccggcgaaacgtggcgagaaagga  
 agggaaagaaagcgaaggaggcgctagggcgctggcaagtgtagcgggtcacgctgcgctaacaccacaccccgcc  
 gcgcttaatgcgccgctacagggcgctgtagccatgtgagcaaaaggccagcaaaaggccaggaaccgtaaaaaggcc  
 gcgltgctggcgttttccataggctccgccccctgacgagcatcacaatacgacgctcaagtcagaggtggcgaaacccg  
 acaggactataagataaccaggcgttccccctggaagctccccctgicgctctcctgtccgaccctgcccttaccggatacct  
 gtccgcttctccctcgggaagcgtggcgcttctcatagctcagctgttaggtatctcagttcgggtgtaggtcgttcccaagct  
 gggctgtgtcacgaacccccgttcagctcagaccgctgcgccttaccgglactatcgtcttgagccaacccggtaagacac  
 gactatcgccactggcagcagccactggaacaggattagcagagcgaggtatgtagggcgtctacagagttctgaagtg  
 tggcctaactcggctacactagaagaacagatTTTggatctcgcgctctgctgtagccagttacctcggaaaaagagttgglag  
 ctctgtatccggcaaaacaccaccgctgtagcgggtttttgttgaagcagcagattacgcgcagaaaaaaggatct  
 caagaagatccttgatctttctacggggtgacgctcagtggaacgaaaactcacgtaagggttttggtcagatctagcacc  
 aggcgttaaggccaccaataactgccttaaaaaaatacggccccctgccactcagcagctgttgaattcattaagca  
 ttctgccgacatggaagccatcacaacggcatgatgaacctgaatcgccagcgcatcagcaccttgcgccttgcglataata  
 tttgccatagtgaaaacggggcggaagaagttgcatatTggctacgtttaaatacaaaactggtgaaatcaccagggttg  
 gctgagacgaaaaacataatctcaataaacctttagggaaataggccaggTTTcaccgtaacacgccacatcttgcgaatata  
 gtgtagaacatcgccgaaatcgtcgtggtattcactccagagcagatgaaaacgttccagtttgcctatggaaaacgggtgaacaa  
 ggggaacactatccatatacaccagctcaccgtcttattgcatatcggaactccgggtgagcattcatcaggcgggcaagaa  
 tgtgaataaaggccgataaaacttgtgcttatttcttaccggtctttaaaggccglaataccagctgaacggctcgtgtatag  
 gtacattgagcaactgactgaaatgctcaaaatgttcttaccgatgccaatgggatatacaacgggtgtatataccagtgatttttct  
 ccatttagctccttagctcctgaaaatctcgataactcaaaaaatcggccggtagtgatcttattcattatggtgaaagttggaa  
 cctcaccgcagcttaatgtgaggttagctcactcattaggcaccacggccttacactttatgcttccgg

**Figura 8:** Mapa vectorial de un derivado de pMORPH25 que contiene un fragmento Fab HuCAL específico de Estradiol-BSA



**Figura 9:** Tasa de presentación relativa de diferentes bibliotecas de entramado VH de constructos de la presente invención comparados con los entramados correspondientes de constructos convencionales

