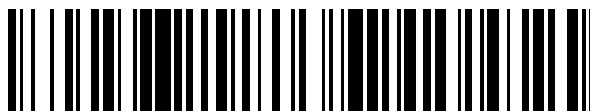


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 438 783**

51 Int. Cl.:

C12N 15/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.02.2010 E 10707493 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.09.2013 EP 2401373**

54 Título: **Exposición de piX en fagos independiente de secuencia de señal**

30 Prioridad:

25.02.2009 US 155437 P
28.05.2009 DK 200900666

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.01.2014

73 Titular/es:

NEXTERA AS (100.0%)
Gaustadalléen 21
0349 Oslo, NO

72 Inventor/es:

LØSET, GEIR ÅGE

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 438 783 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

Exposición de pIX en fagos independiente de secuencia de señal

5 **Antecedentes de la invención**

10 El uso de enfoques combinatorios para la identificación de proteínas, su caracterización y modificación, ha tenido un gran éxito tanto en la investigación académica como en el desarrollo comercial. A este respecto, la tecnología de exposición en bacteriófagos filamentosos, o fagos, ha allanado el camino, por ser la primera plataforma de biblioteca y, aún, reinar como tecnología dominante. De este modo, la exposición en fagos se aplica ampliamente tanto en el descubrimiento de proteínas básicas como en el de proteínas aplicadas, así como en el desarrollo tanto de los nuevos diagnósticos basados en proteínas como en el terapéutico, que son la clase de compuestos de más rápido crecimiento en todo el mundo.

15 El principio de la tecnología combinatoria de exposición en fagos se basa en la vinculación genotipo-fenotipo ofrecida por la propiedad de que cada virión sólo expondrá visualmente en su superficie las mismas auténticas proteínas que son codificadas por el genoma encapsulado por su capa de proteína. La propia partícula de fago es muy resistente a una variedad de condiciones fisicoquímicas; por lo tanto, la exposición en fagos ofrece una versatilidad superior en muchos regímenes de selección en comparación con las tecnologías combinatorias que compiten con aquél.

20 La exposición en fagos de polipéptidos heterólogos se ha logrado usando las cinco proteínas estructurales de la cubierta del fago filamentososo, pero sólo la exposición de la pIII- y, en cierta medida, la de la pVIII- han ganado uso generalizado (véase la figura 1).

25 Cuando la fusión heteróloga es sólo un péptido corto, se prefieren los sistemas de exposición multivalentes que usan vectores basados en genoma de fagos, mientras que, para las fusiones más grandes, que requieren dominios plegados, la mayoría de las aplicaciones se beneficiarán de los sistemas de fagémido. En este último caso, la exposición en fagos de anticuerpos pIII es, con mucho, la que domina el campo, pero van saliendo a la luz andamiajes alternativos, que alimentan la necesidad de expansión de las herramientas de ingeniería de proteínas para el mañana. Una aplicación muy deseada consiste en obtener efectivamente un péptido de alta afinidad específica o aglutinantes de proteínas a partir de una biblioteca de exposiciones en fagos simplemente mediante la infección de bacterias con viriones de fagos cuando todavía están unidos a su objetivo.

30 Endemann y Model, 1995 (PMID: 7616570), informó de que la cubierta menor de pIX no era funcional con otra proteína fusionada con su N-terminal. Por lo tanto, este informe concluía que pIX no se puede usar para la exposición en fagos.

35 Tanto Gao et al. (PMID: 10339535, 12239343 y WO 0071694) como Khalil et al. (PMID: 17360403) han demostrado más tarde que la exposición de fusión de pIX de N-terminal se permite cuando se expresa a partir de fagémidos y se usa en combinación con orientación periplásmica dependiente de secuencia de señal. En estos sistemas, la complementación tiene lugar cuando la wt pIX es donada desde el genoma del fago auxiliar sobre el rescate de fagémido.

40 El fagémido, como se describe en la figura 2A del documento WO 0071694 (sin proteína de fusión insertada) y en la figura 2B del documento WO 0071694 (con proteína de fusión insertada), comprende claramente una secuencia de señal pelB (con el texto de la figura en la página 7, líneas 2-14).

45 Como se mencionó anteriormente, había sido sugerido previamente que pIX no era funcional con otra proteína fusionada con el extremo N-terminal, y Gao et. al. dio dos posibles razones de su éxito, ya fuera por sí solo o por la combinación de ambos.

50 Una posible razón era que una secuencia líder procariota (secuencia de señal) se unía al N-terminal de las proteínas de fusión, asegurando, de este modo, la orientación de la proteína recombinante al espacio periplásmico, y, por ello, prevenía la acumulación en el citoplasma.

55 Otra posible razón era que las proteínas recombinantes fueran expresadas desde un fagémido, no desde un genoma de fago, como en Endemann y Model; por lo tanto, un pIX de tipo salvaje del fago auxiliar necesitaba inevitablemente que un rescate de fagémido fuera complementando las proteínas recombinantes pIX de fusión, preservando, de este modo, la funcionalidad de tipo salvaje que, de otro modo, podría haber perdido debido a la modificación recombinante. Es decir, los fagos comprenderían una mezcla de proteínas de tipo salvaje y de fusión.

60 Khalil et al. (PMID: 17360403) describe una aplicación que explota la característica de un virión de fago filamentososo biespecífico en el que se expone un péptido exógeno en cada punta distal del mismo virión. Esto se logró usando una combinación de un vector de genoma de fago pIII común complementando a un fagémido procariota de exposición de pIX dependiente de secuencia de señal. En esta configuración, el vector genoma de fago sirvió como

fago auxiliar en el rescate del fagémido.

Sumario de la invención

5 Un objeto de la presente invención es proporcionar un andamiaje alternativo para péptidos expuestos en fagos filamentosos.

10 Un primer aspecto de la invención es el de unas proteínas pIX de fusión que se originan en un fago filamentosos, dichas proteínas de fusión no comprenden una secuencia de señal de N-terminal de procariota y, por lo tanto, es una fusión directa con un péptido exógeno.

Otro aspecto de la invención se refiere a ácidos nucleicos que codifican las proteínas de fusión de la invención.

15 Un aspecto de la invención se refiere a fagos filamentosos que comprenden las proteínas de fusión de la invención.

Otro aspecto de la invención se refiere a una biblioteca de fagos filamentosos.

20 Otro aspecto de la invención se refiere a un sistema de exposición en fagos que comprende un fagémido y un fago auxiliar, en el que el fagémido comprende un ácido nucleico que codifica las proteínas pIX de fusión de la invención.

25 Un aspecto se refiere a un estuche que comprende un sistema de exposición en fagos y un fago auxiliar, en el que el fagémido comprende un ácido nucleico que codifica las proteínas pIX de fusión de la invención.

Breve descripción de las figuras

25 Figura 1. Dibujo esquemático de la estructura de un fago filamentosos. El virión está constituido por cinco proteínas estructurales que recubren una molécula de cadena sencilla de ADN. En el fago de tipo salvaje (wt) hay alrededor de 2.700 copias de pVIII y aproximadamente 3-5 copias de cualquiera de las cuatro proteínas pIII, pVI, pVII y pIX, que se encuentran en cada punta del virión. El tamaño del virión depende del tamaño del genoma en aproximadamente 30 2,3 nucleótidos por proteína de pVIII de la cubierta y, de este modo, la longitud de la partícula se acomoda a un aumento o disminución de las copias insertadas de pVIII. De manera notable, las estructuras de pIII y pVIII se han caracterizado por difracción de fibra por rayos X, cristalografía y RMN. La proteína de capa menor de pIII contiene tres dominios distintos, separados por regiones ricas en glicina: N1 (que se une a TolA), N2 (que se une al pilus F) y CT (que, integrado en el virión, es importante para el montaje normal del virión).

35 Figura 2. Dibujos esquemáticos de los nuevos fagémidos pGALD9 (A) y pGALD97ΔL (B) de exposición de pIX. La columna vertebral del vector de ambos fagémidos se basa en el fagémido pSEX81 (SEC ID N°: 2) de exposición de pIII, a cuya secuencia se puede acceder desde el acceso de GenBank N°: Y14584, y cuyos detalles sobre la construcción se describen en *Material and Methods*. Ambos fagémidos pueden acomodar segmentos de secuencias exógenas en marco (denominados E₁ y E₂) a través de un fácil intercambio de casetes de las porciones de NcoI/HindIII y MluI/NotI, respectivamente. Los casetes están conectados por una secuencia de enlazador sintético que varía entre las diferentes construcciones descritas en este documento. Abreviaturas: lacPO, promotor lac; sd, 40 secuencia de Shine-Dalgarno; pelB, secuencia de señal de peptato liasa bacteriana; TP, sitio de proteasa tripsina; t, T7 terminador de la transcripción.

45 Figura 3. Títulos de fagémidos de (A) scFv anti-phOx (SEC ID N°: 11) y (C) scFv anti-NIP expuestos a partir de pGALD9ΔL, pGALD9, pSEX81. Todos los fagémidos albergan un marcador de resistencia a ampicilina; por lo tanto, los títulos se muestran como unidades de formación de colonia resistente a la ampicilina por mililitro de solución (cfu^{ampR}/ml). La relación entre fagémido y fago auxiliar de (B) scFv anti-phOx (SEQ ID N°: 11) y (D) scFv anti-NIP, expuestos a partir de pGALD9ΔL, pGALD9, pSEX81, se muestra como la relación entre el título de fagémido (cfu^{ampR}/ml) dividido por el título del fago auxiliar (cfu^{kanR}/ml). El empaquetamiento de los viriones se hizo mediante rescate de fagémidos estándar, como se describe en materiales y métodos sin (expresión basal), o con una 50 concentración final de 0,1 mM de IPTG presente (inducción de IPTG) después de la superinfección.

55 Figura 4. ELISA de antígeno específico que compara la exposición funcional de (A) scFv anti-phOx (SEQ ID N°: 11) y (B) scFv anti-NIP (SEC ID N°: 3) entre pIX y pIII, y con y sin secuencia de señal (ΔL). El ELISA se llevó a cabo como se describe en materiales y métodos usando 100 μl/ sobrenadante bien aclarado conteniendo virión. El anti-M13^{HRP} es un control negativo en adsorción inespecífica de la detección del virión MAb al antígeno y bloqueo. (C y D) El ELISA en A y B se repitieron, pero el desarrollo se detuvo antes de la saturación de la señal y los niveles relativos de exposición se determinaron usando la reactividad al antígeno como una función de título. 60

65 Figura 5. El aparente enriquecimiento del objetivo específico en selección de afinidad depende del andamiaje de la exposición de la cápside, de la expresión de la proteína de interés (PDI) y de las condiciones de elución. Se evaluaron volúmenes iguales de sobrenadante no titulado que contiene virión de cada una de las 8 bibliotecas phOx-/NIP agregadas después de las rondas 1 y 2 de selección para determinar la reactividad de antígeno mediante ELISA. La ronda 0 corresponde a la entrada agregada de 1x10¹⁰ cfu^{ampR}. Para estimar la respuesta máxima posible,

se incluyeron los sobrenadantes clonales de los que se derivaban los concentrados agregados de la ronda 0, y los resultados representados vienen dados por las señales de fondo restadas como una fracción de la respuesta máxima posible indicada con la forma de cono.

5 Descripción detallada de la invención

Se debe observar que las realizaciones y características descritas en el contexto de uno de los aspectos de la presente invención también se aplican a los otros aspectos de la invención.

10 Todas las referencias de patentes y de no patente citadas en la presente solicitud se incorporan aquí mediante referencia en su totalidad.

En este documento se presenta un concepto novedoso, en el que la proteína pIX de la capa estructural del virión de fago filamentoso es alterada genéticamente de tal manera que la versión modificada codifica un péptido del N-terminal o dominio de proteína.

Proteína pIX de fusión

20 En un aspecto, la presente invención proporciona una proteína pIX de fusión que se origina en un fago filamentoso, comprendiendo dicha proteína de fusión la fusión de un péptido exógeno del N-terminal de pIX. Tal proteína de fusión es útil, por ejemplo, en el contexto de la exposición en fagos.

25 Cuando se hace referencia a un "péptido exógeno", lo que se ha de entender es un péptido no originalmente parte de la proteína pIX con o sin aminoácidos de enlazador al extremo N-terminal de la parte de aminoácidos de pIX de la proteína de fusión.

En una realización preferida, el ácido nucleico que codifica la proteína de fusión no comprende una secuencia de señal de N-terminal de procariota.

30 Como se usa en este documento, el término "péptido" abarca tanto péptidos cortos como polipéptidos, proteínas y fragmentos de ellos.

35 El término "proteína pIX" se refiere a la secuencia de aminoácidos descrita en (SEC ID N° 1 (MSVLVYSFASFVLGWCLRSGITYFTRLMETSS))

40 En una realización, la proteína pIX comprende el aminoácido con una identidad de secuencia de al menos un 70 % a la de la SEC ID N° 1, tal como de un 75 % de identidad, tal como de un 80 % de identidad, tal como de un 81 % de identidad, tal como de un 82 % de identidad, tal como de un 83 % de identidad, tal como de un 84 % de identidad, tal como de un 85 % de identidad, tal como de un 86 % de identidad, tal como de un 87 % de identidad, tal como de un 88 % de identidad, tal como de un 89 % de identidad, tal como de un 90 % de identidad, tal como de un 91 % de identidad, tal como de un 92 % de identidad, tal como de un 93 % de identidad, tal como de un 94 % de identidad, tal como de un 95 % de identidad, tal como de un 96 % de identidad, tal como de un 97 % de identidad, tal como de un 98 % de identidad, tal como de un 99 % de identidad.

Identidad de la secuencia

Al igual que se define comúnmente "identidad", se define aquí como la identidad de la secuencia de genes o de proteínas a nivel de nucleótidos o de aminoácidos, respectivamente.

50 De este modo, en el presente contexto, "identidad de secuencia" es la medida de identidad entre proteínas a nivel de aminoácidos y la medida de identidad entre ácidos nucleicos a nivel de nucleótidos. La identidad de secuencia de proteínas se puede determinar al comparar la secuencia de aminoácidos en una posición dada en cada secuencia cuando las secuencias están alineadas. De manera similar, la identidad de secuencia de ácidos nucleicos se puede determinar al comparar la secuencia de nucleótidos en una posición dada en cada secuencia cuando las secuencias están alineadas.

60 Para determinar el porcentaje de identidad de dos secuencias de aminoácidos o de dos secuencias de ácidos nucleicos, las secuencias se alinean con fines de comparación óptima (por ejemplo, se pueden introducir huecos en la secuencia de una Cebadora secuencia de aminoácidos o de ácidos nucleicos para la alineación óptima con una segunda secuencia de aminoácidos o de ácidos nucleicos). Los residuos de aminoácidos o de nucleótidos en las correspondientes posiciones de aminoácidos o posiciones de nucleótidos se comparan después. Cuando una posición de la Cebadora secuencia está ocupada por el mismo residuo de aminoácido o de nucleótido que la posición correspondiente en la segunda secuencia, entonces las moléculas son idénticas en esa posición. El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, % de identidad = # de posiciones idénticas / # total de posiciones (por ejemplo, posiciones de superposición) x 100). En una realización, las dos secuencias tienen la misma longitud.

Se pueden alinear manualmente las secuencias y contar el número de aminoácidos idénticos. Alternativamente, la alineación de dos secuencias para la determinación del porcentaje de identidad se puede llevar a cabo usando un algoritmo matemático. Tal algoritmo se incorpora en los programas NBLAST y XBLAST (véase Altschul et al. 1990).

- 5 Las búsquedas BLAST de nucleótidos se pueden efectuar con el programa NBLAST, puntuación = 100, longitud de palabra = 12, para obtener secuencias de nucleótidos homólogas a las de la molécula de ácido nucleico de la invención. Las búsquedas BLAST de proteínas se pueden realizar con el programa XBLAST, puntuación = 50, longitud de palabra = 3, para obtener secuencias de aminoácidos homólogas a las de la molécula de proteína de la invención. Para obtener alineaciones con huecos con fines de comparación, se puede usar Gapped BLAST.
- 10 Alternativamente, se puede usar PSI-Blast para efectuar una búsqueda iterada que detecta relaciones distantes entre moléculas. Cuando se utilizan los programas NBLAST, XBLAST, y Gapped BLAST, se pueden usar los parámetros por defecto de los programas respectivos. Véase <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Alternativamente, la identidad de secuencia se puede calcular después de que las secuencias se hayan alineado, por ejemplo, mediante el programa BLAST en la base de datos EMBL (véase www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST). En general, se puede usar para la alineación la configuración por defecto con respecto a, por ejemplo la "matriz de puntuación" y la "penalización por hueco". En el contexto de la presente invención, las configuraciones por defecto de BLAST y de PSI BLASTN pueden resultar ventajosas.

- 20 El porcentaje de identidad entre dos secuencias se puede determinar usando técnicas similares a las descritas anteriormente, con o sin dejar huecos. Al calcular el porcentaje de identidad, se cuentan sólo las coincidencias exactas.

Proteínas plegadas

- 25 En una realización preferida, el término "péptido" se refiere exclusivamente a las proteínas plegadas tales como dominios derivados de anticuerpos. El experto en la técnica reconocerá que las proteínas plegadas pueden ser anticuerpos o fragmentos de ellos, cubriendo Fv, scFv, Fab, dominios individuales, dominio Z de la proteína A o fragmentos de él (affibody), ankyrin o fragmentos de ella, DARPin o fragmentos de ella, receptor de células T o fragmentos de los mismos, CMH de clase I o II o fragmentos de él, fibronectina o fragmentos de ella, Anticalins o fragmentos de ellas, dominios PDZ o fragmentos de ellos, IgNAR o fragmentos de él, CTLA4 o fragmentos de él, ImmE7 o fragmentos de ella, knottins o fragmentos de ellos, avimer o fragmentos de ella, GFP o fragmentos de ella y otros fluoróforos biológicos codificados por genes.

- 35 En principio, se puede hacer una biblioteca de cualquier cosa, siempre y cuando se exponga; por lo tanto, en su forma más simple, se pueden sólo separar cosas que tienen una configuración no estructurada, en comparación con una estructura ordenada, que es un pliegue.

- 40 En otra realización preferida, el término péptido se refiere exclusivamente a péptidos cortos de entre 2 a 50 aa. A una cierta longitud, un péptido corto de espiral al azar será lo suficientemente largo para adoptar un pliegue secundario o terciario definido y, por lo tanto, entrar en la definición de dominio plegado. Obviamente, esto dependerá de la composición química; por lo tanto, un péptido de 20 aa podría seguir siendo espiral al azar mientras que otro péptido de 20 aa podría estar plegado y caer en la definición de dominio plegado.

- 45 En otra realización preferida, la proteína pIX de fusión de la invención comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las posiciones 1-32, 2-32, 3-32, 4-32, 5-32, 6-32, 7-32, 8-32, 9-32, 10-32, 11-32 y 12-32 de la SEC ID N°: 1. En principio, en el contexto de los fagémidos, se puede prever cualquier modificación de N-terminal de pIX, dado que la porción trans-membrana se conserva y permite la incorporación normal del virión y el montaje.

- 50 SEC ID N°: 1. (MSVLVYSFASFVLGWCLRSGITYFTRLMETSS) es la secuencia de aminoácidos de la cubierta estructural de la proteína pIX del fago filamentoso (pIX tipo salvaje). Lo más preferiblemente, la proteína pIX de fusión comprende las posiciones 1-32 de la SEC ID N°: 1.

SEQ ID N°: 1. No debe confundirse con la secuencia de señal/líder que se describe posteriormente.

55 Secuencia de señal

Preferiblemente, el péptido exógeno se fusiona directamente con o sin los aminoácidos de enlazador al extremo N-terminal de la secuencia de la proteína pIX de fusión.

- 60 Aún en otra realización preferida, la proteína pIX de fusión no comprende una secuencia líder de N-terminal de procariota.

- 65 El término "secuencia líder" se usa de manera intercambiable con los términos "péptido de señal" y "secuencia de señal", y se refiere a una secuencia de aminoácidos que orienta la proteína (de la que la secuencia líder es parte) hacia el espacio periplasmático de membrana de bacterias gram negativas. Ejemplos de secuencias líder de uso frecuente son pelBss, OmpAss, TorAss, malEss, phoAss, lamBss, Blass y DspAss, mgIBss, sfmCcss, tolBss y TorTss.

Tales secuencias de señal son conocidas para orientar la proteína completa hacia la maquinaria de secreción de *E. coli*, que se sabe que incluye al menos translocación de SRP-dependiente, SEC-dependiente, TatABC-dependiente o YidC-dependiente desde el citosol hasta el espacio periplásmico (Baneyx. et al. PMID: 15529165). Por lo tanto, el término "secuencia de señal de N-terminal" se refiere a una secuencia de señal que está en la parte de N-terminal de la proteína.

Las secuencias de señal que albergan la propiedad de orientar una proteína (de la que son parte) hacia la maquinaria de secreción de *E. coli*, y por ello también la de translocarla desde el citosol hasta el compartimento periplásmico, se pueden identificar en parte a través de firmas, o motivos, definidos por sus propiedades químicas o por su composición de aminoácidos.

La variedad de secuencias funcionales de señal existente hasta el momento, sin embargo, excede los conocimientos actuales para su identificación, por lo tanto, en el estado actual de la técnica, la definición de un péptido como unas secuencias cognadas de señal se hace típicamente a través de minería de datos usando el conocimiento basado en datos basados como en plantilla mediante, por ejemplo, la red neuronal o la metodología heurística. Hay varias de tales herramientas disponibles para la comunidad a través de canales de acceso abierto en la actualidad, tales como SignalP, PPSEARCH de PROSITE (EMBL-EBI), SecretomeP o TatP.

El reto es aún mayor con la clase de las proteínas secretoras, en el sentido de que se exportan desde el compartimento citosólico, lo que las desvía de las normas de tal manera que no se puede identificar el motivo de secuencia de señal, pero a través de la minería de datos se pueden también aquí definir las características de la secuencia de señal o conseguir la probabilidad de la capacidad de secreción de la proteína eucariótica en cuestión. Hasta el momento, no existe tal herramienta para el taxón procariótico.

El único método actualmente disponible que irrevocablemente identificó un péptido como una secuencia de señal es, por lo tanto, validar la propiedad de un péptido por medios experimentales para establecer si es o no es una secuencia real de señal. También está claro que se puede efectuar ingeniería en tales péptidos tal que las posiciones de los aminoácidos dadas en la secuencia de señal se pueden alterar, conservando sin embargo su función de péptido de señal, ya sea por funcionalidad nativa o por funcionalidad alterada, tal como una capacidad de transporte aumentada. También se puede emplear la supresión o la adición de aminoácidos. Tal análisis e ingeniería se han hecho realmente con la secuencia Ff de señal de pVIII, orientando g8pss a la vía de sección (Sec-vía) y orientando el TorAss a la Tat-vía. Especialmente, los resultados de Shen et al. pueden servir como bien fundadas líneas de guía para la ingeniería de mutantes funcionales, pero alterados, de la secuencia de señal de pIII y de la secuencia bacteriana de señal de peptato liasa.

La funcionalidad de una secuencia de señal puede dividirse, adicionalmente, en las dos propiedades siguientes:

1. Orientación de una proteína (de la que es parte) hacia la maquinaria de secreción de *E. coli* y por ello translocarla desde el citosol hasta el compartimento periplásmico, y, en el curso de este proceso, ser proteolíticamente separada de la proteína restante mediante proteasas específicas, tales como peptidasa de señal de lipoproteína, o peptidasas líder.

2. Orientación de una proteína (de la que es parte) hacia la maquinaria de secreción de *E. coli* y, por ello, translocarla desde el citosol hasta el compartimento periplásmico, y, después de la translocación, todavía permanecer como parte de la proteína.

A pesar de que una vasta mayoría de secuencias de señal se mapea para la situación dada anteriormente, 1) es evidente que estas proteínas pueden ser fácilmente diseñadas en situación. 2) Por lo tanto, cualquiera de las secuencias de señal conocidas en la actualidad, por ejemplo una pelBss mutante y otras que originalmente pertenecen a esa situación, 1) pero que se alteran en esa situación, 2) todavía se consideran como secuencias de señal cognadas.

Lo que es más, es concebible o bien 1) alterar una secuencia de señal de situación en situación, o bien 2) elegir directamente una secuencia de señal que se mapea para la situación 2) y, entonces, después de la translocación, retirar la secuencia de señal. Esto se puede hacer ya sea mediante proteasas endógenas del huésped y/o, en el caso de, por ejemplo, exposición en fagos, cuando la proteína se fusiona con una proteína de la cápside. Se podría después diseñar, en la región apropiada de la secuencia de señal, o de la proteína de la que es una parte, un sitio artificial de proteasa, tal que se pueda efectuar una escisión definida. Por aquí se pueden visualizar dos tipos diferentes de sitios seleccionados de proteasa:

- A. El sitio de proteasa no escinde la proteína de interés, sólo el sitio previsto, como por ejemplo, carboxipeptidasa A, o el sitio de proteasa de rinovirus 3C en combinación con anticuerpos u otros andamiajes de interés, tales como moléculas del complejo principal de histocompatibilidad o receptores de células T. Usando este enfoque se puede visualizar, por ejemplo, una exposición en fagos de la proteína de interés mediante el uso de un mapeo de secuencia de señal para la situación, 2) anteriormente y antes de usar en la selección, etc., retirar artificialmente el péptido señal para obtener la funcionalidad y la homogeneidad de la fusión de la cápside.

B. El sitio de proteasa escinde la proteína de interés además del sitio diseñado, tal como, por ejemplo, tripsina.

Ambas situaciones seguirán siendo consideradas como exposición en fagos dependiente de secuencia de señal.

5 Péptido exógeno

En una realización preferida, el péptido exógeno de la proteína pIX de fusión se selecciona de entre el grupo que consiste en anticuerpos o fragmentos de los mismos, cubriendo Fv, scFv, Fab, dominios individuales, dominio Z de la proteína A o fragmentos de él (affibody), ankyrin o fragmentos de ella, DARPin o fragmentos de ella, receptor de células T o fragmentos de los mismos, CMH de clase I o II o fragmentos de él, fibronectina o fragmentos de ella, Anticalins o fragmentos de ellas, dominios PDZ o fragmentos de ellos, IgNAR o fragmentos de él, CTLA4 o fragmentos de él, ImmE7 o fragmentos de ella, knottins o fragmentos de ellos, avimer o fragmentos de ella, GFP o fragmentos de ella y otros fluoróforos biológicos codificados por genes.

15 En una realización preferida, el péptido exógeno de la proteína pIX de fusión es un miembro de la biblioteca.

Una biblioteca, tal como se usa en el presente contexto, se refiere a una colección de diferentes péptidos. Los péptidos pueden ser dominios plegados o péptidos cortos de, por ejemplo, 2-50 aminoácidos. Tales bibliotecas son de interés porque se pueden usar para identificar nuevos ligandos que se unen a un objetivo dado.

20 Existen varias ventajas al usar pIX para exponer una biblioteca en comparación con bibliotecas expuestas usando pIII o pVIII. La exposición de pIX contiene los mismos activos de la exposición de pIII con respecto a la direccionalidad y la valencia, pero no afectará a la infectividad, un fenómeno que se sabe que ocurre con la exposición de pIII, que introduce heterogeneidad incontrolada e indeseada en el sistema sobre, por ejemplo, el rescate después de la selección por afinidad.

30 Lo que es más, la exposición de pIX puede lograrse sin la necesidad de una secuencia de señal de N-terminal de procarionota, que son requisitos previos para la exposición tanto de pIII como de pVIII. Finalmente, cualquier especie objetivo inmovilizada en la exposición de pIII requiere normalmente la interrupción (normalmente por competitivo, o por alto o bajo pH de elución) de esta unión objetivo-fago. De esto se conoce, por ejemplo, que obstaculiza gravemente la recuperación de alta afinidad, o las uniones estables en la exposición de pIII. Como la pIII requerida para la infección está inalterada y es fácilmente disponible para interacciones alternativas en la exposición de pIX, incluso después de la interacción fago-objetivo, esto elimina completamente la necesidad de interrupción de uniones, por ejemplo elución ácida, ya que los fagos inmovilizados conservan plena infectividad y, por lo tanto, pueden ser recuperados simplemente por infección mientras se unen al objetivo.

Acido nucleico

40 Un segundo aspecto de la invención es un ácido nucleico que codifica la proteína de fusión de la invención. El ácido nucleico de la invención puede ser parte de un plásmido, de un vector, de un genoma de fago, de un fagémido o de un fásmido.

45 El término "ácido nucleico" se refiere a una macromolécula compuesta de cadenas de nucleótidos monoméricos. En bioquímica, estas moléculas llevan información genética o forman estructuras dentro de las células. Los ácidos nucleicos más comunes son el ácido desoxirribonucleico (ADN) y el ácido ribonucleico (ARN). Además, el término "ácidos nucleicos" incluyen ácidos nucleicos artificiales tales como el ácido péptido nucleico (APN), morfolina y ácido nucleico bloqueado (ANB), así como el ácido nucleico glicol (GNA) y el ácido nucleico de treosa (TNA). Cada uno de éstos se distingue en su naturaleza del ADN o del ARN por cambios en la columna vertebral de la molécula.

50 Un fagémido o fásmido es un tipo de vector de clonación desarrollado como un híbrido de los fagos filamentosos Ff y los plásmidos para producir un vector que se puede propagar como un plásmido, y también ser empaquetado como ADN monocatenario en partículas virales. De manera similar a un plásmido, un fagémido se puede usar para clonar fragmentos de ADN y ser introducido en un huésped bacteriano mediante una variedad de técnicas (transformación, electroporación). Sin embargo, la infección de un huésped bacteriano que contiene un fagémido, con un fago 'auxiliar', por ejemplo VCSM13 o M13K07, proporciona los componentes virales necesarios para permitir la replicación del ADN monocatenario y el empaquetado del ADN fagémido en partículas de fago.

60 De este modo, un aspecto de la presente invención se refiere a un genoma de fago o a un fagémido que comprende un ácido nucleico que codifica una proteína pIX de fusión originada a partir de un fago filamentosos, en el que la proteína de fusión no comprende una secuencia de señal de N-terminal de procarionota.

65 En una realización de la presente invención, el genoma de fago o el fagémido comprende un ácido nucleico que codifica una proteína pIX de fusión originada a partir de un fago filamentosos, en la que la proteína de fusión no comprende una secuencia de señal de N-terminal de procarionota y en la que la proteína pIX de fusión comprende una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en la posición 1-32, 2-32, 3-32, 4-32 y 5-32 de la SEC ID N°: 1 (MSVLVYSFASFVLGWCLRSGITYFTRLMETSS).

En otra realización de la presente invención, el péptido exógeno está directamente fusionado con el extremo N-terminal de la secuencia de pIX.

5 Una realización de la presente invención se refiere al genoma de fago o al fagémido de la presente invención, en el que el péptido exógeno fusionado con pIX se selecciona de entre el grupo consistente en anticuerpos o fragmentos de ellos, cubriendo Fv, scFv, Fab, dominios individuales, dominio Z de la proteína A o fragmentos de él (affibody), ankyrin o fragmentos de ella, DARPin o fragmentos de ella, receptor de células T o fragmentos de los mismos, CMH de clase I o II o fragmentos de él, fibronectina o fragmentos de ella, Anticalins o fragmentos de ellas, dominios PDZ o fragmentos de ellos, IgNAR o fragmentos de él, CTLA4 o fragmentos de él, ImmE7 o fragmentos de ella, knottins o fragmentos de ellos, avimer o fragmentos de ella, GFP o fragmentos de ella y otros fluoróforos biológicos codificados por genes.

En otra realización de la presente invención, el péptido exógeno fusionado con pIX es un miembro de la biblioteca.

15 Fago filamentosos

Un tercer aspecto de la invención es un fago filamentosos que comprende la proteína de fusión de la invención. El virión del fago filamentosos puede albergar un fagémido.

20 Por "fago", a menudo llamado bacteriófago, se entiende en este documento un virus que infecta, que se replica y que es secretado a partir de bacterias. Un bacteriófago filamentosos, o fago filamentosos, es un fago con una molécula de ADN monocatenario (ADNss) que está empaquetada con proteínas de cubierta de fago. La partícula secretada de fago filamentosos tiene una estructura fenotípicamente filamentosos.

25 El término "fago filamentosos", tal como se usa en este documento, abarca tanto viriones derivados del genoma de fagos como viriones derivados de fagémidos.

30 El término "fago auxiliar" se refiere a un virus que ayuda a un virus defectuoso, separado y sin relación definido como, por ejemplo, un fagémido que en sí mismo no es un genoma de fago ni un virus funcional, sino simplemente un plásmido que contiene uno o varios elementos derivados de un genoma de fago, para reproducirse infectando la misma célula huésped que ya está ocupada por el virus defectuoso y proporcionar las proteínas que le faltan al virus defectuoso y necesita para formar viriones que contienen el fagémido.

35 En una realización, el fago filamentosos comprende un ácido nucleico que codifica la proteína de fusión de la invención. Se prefiere, en particular, un fago que comprenda un fagémido que comprenda el ácido nucleico que codifica la proteína de fusión de la invención.

40 Una biblioteca de fagos es una colección de fagos filamentosos que exponen péptidos o proteínas como parte de una o más de las proteínas de la cubierta de fago filamentosos. Tales bibliotecas pueden comprender dos o más fagos que exponen diferentes péptidos o proteínas.

De este modo, en una realización de la presente invención, los fagos filamentosos están exponiendo péptidos o proteínas como parte de una o más de las proteínas de cubierta de fago filamentosos.

45 En una realización, el fago filamentosos comprende adicionalmente una proteína pIII de fusión, una proteína pVII de fusión o una proteína pVIII de fusión.

50 Un aspecto de la invención es una biblioteca de fagos filamentosos de la invención, exponiendo dichos fagos filamentosos péptidos exógenos o proteínas como fusiones con una o más de las proteínas pIII, pVII, pVIII o pIX.

Una biblioteca es una colección de fagos filamentosos que exponen péptidos o proteínas como parte de una o más de las proteínas de cubierta de fagos filamentosos.

55 Tales bibliotecas pueden comprender dos o más fagos que exponen diferentes péptidos o proteínas.

Un aspecto de la presente invención se refiere a una biblioteca de fagos que comprende dos o más fagos filamentosos que exponen diferentes proteínas, en el que al menos una de estas proteínas es una proteína pIX de fusión expresada a partir del genoma de fago o del fagémido de la presente invención.

60 Una realización de la presente invención se refiere a una biblioteca de fagos que comprende dos o más fagos filamentosos que exponen diferentes péptidos o proteínas.

En una realización particular, al menos uno de estos péptidos o proteínas es de la proteína pIX de fusión de la invención.

65 En una realización, los péptidos se exponen simultáneamente en pIX y o bien pIII, pVII o pVIII.

En otra realización, los péptidos se exponen simultáneamente en pIX y dos o tres formas seleccionadas del grupo que consiste en pIII, pVII o pVIII.

5 El término “tipo salvaje”, a veces escrito “wt”, es la forma típica de un organismo, una cepa, un gen o una característica que tiene lugar en la naturaleza. De “tipo salvaje” se refiere al fenotipo más común en la población natural. “Tipo salvaje” también se refiere al alelo en cada locus requerido para producir el fenotipo de tipo salvaje. “Tipo salvaje” es el estándar de referencia para el genotipo y el fenotipo. En biología, se refiere específicamente a la diferencia entre un organismo natural y uno que ha sido mutado deliberadamente. La mutagénesis dirigida es una
10 técnica de investigación que permite la mutación de nucleótidos específicos en la secuencia genética de un gen de tipo salvaje. Las proteínas de tipo salvaje se escriben como wt-(nombre de la proteína); por ejemplo, una proteína pIX de tipo salvaje se escribe wt pIX, wt-pIX o pIX de tipo salvaje.

De este modo, un aspecto de la invención se refiere al fago filamentoso de la presente invención que no comprende un gen que codifica wt pIX y/o la proteína de wt pIX.
15

Otro aspecto de la presente invención se refiere al fago filamentoso de la invención que comprende adicionalmente un gen que codifica wt pIX y/o la proteína de wt pIX.

20 Otro aspecto de la presente invención se refiere a un fago filamentoso que comprende el genoma de fago o el fagémido de la presente invención.

En una realización de la presente invención, el fago filamentoso, que comprende el genoma de fago o el fagémido de la presente invención, comprende adicionalmente un gen que codifica wt pIX y/o la proteína de wt pIX.
25

En otra realización de la presente invención, el fago filamentoso, que comprende el genoma de fago o el fagémido de la presente invención, no comprende un gen que codifica wt pIX ni/o la proteína de wt pIX.

Un aspecto adicional de la presente invención se refiere a proteínas pIX de fusión que son funcionales en una exposición en fagos sin complementación mediante proteína wt pIX. Un aspecto de la presente invención se refiere a un fago filamentoso que comprende el genoma de fago o el fagémido de la presente invención, y que comprende adicionalmente uno o más elementos del grupo seleccionado de entre la proteína pIII de fusión, la proteína pVII de fusión y la proteína pVIII de fusión.
30

35 Sistema de exposición en fagos

Un quinto aspecto de la invención es un sistema de exposición en fagos que comprende un fagémido y un fago auxiliar, en el que el fago auxiliar comprende un ácido nucleico que codifica la proteína pIX de fusión de la invención.

40 El “sistema de exposición en fagos”, la “técnica de exposición en fagos”, la “tecnología de exposición en fagos” o, simplemente, la “exposición en fagos” se refiere a un método para el descubrimiento y el estudio de las interacciones proteína-proteína, proteína-péptido y proteína-ADN, que utiliza bacteriófagos para conectar proteínas con la información genética que los codifica.

45 “Exponer una proteína” o una “proteína expuesta” se refiere a una proteína fusionada con una proteína de la cubierta del fago que es accesible para la detección o la inmovilización por un ligando.

Un sexto aspecto de la invención es un sistema de exposición en fagos que comprende un fagémido y un fago auxiliar, en el que el fagémido comprende un ácido nucleico que codifica la proteína pIX de fusión de la invención.
50

Un aspecto de la presente invención se refiere a un sistema de exposición en fagos que comprende un genoma de fago o un fagémido de la presente invención.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un sistema de exposición en fagos que comprende un genoma de fago o un fagémido de la presente invención, y un fago auxiliar.
55

Un aspecto de la presente invención se refiere a una biblioteca de fagos que comprende dos o más fagos filamentosos que exponen diferentes proteínas, en el que al menos una de estas proteínas es la proteína pIX de fusión expresada a partir del genoma de fago o del fagémido de la presente invención.
60

En una realización de la presente invención, la biblioteca de fagos de la presente invención comprende una o más proteínas de fusión adicionales seleccionadas de entre la proteína pIII de fusión, la proteína pVII de fusión y la proteína pVIII de fusión.

65 Estuches

Un séptimo aspecto de la invención es un estuche que comprende un sistema de exposición en fagos compuesto de un fagémido y un fago auxiliar, en el que el fagémido comprende el ácido nucleico que codifica la proteína pIX de fusión de la invención. El estuche debe incluir un fagémido con un gen que codifica pIX con un sitio de N-terminal de clonación múltiple en la región de codificación y un fago auxiliar (por ejemplo, M13K07, VCSM13 u otro). El estuche debe ser complementado con protocolos para infección, expresión, inmovilización, selección y detección de clones de fagos. Los estuches también deben estar acompañados con las recetas necesarias para tampones y medios para efectuar los ensayos específicos.

Con "estuche" se hace referencia, en este documento, a una colección de reactivos para generar partículas de fago con una única o biespecíficas proteínas de fusión, ya sea como una biblioteca de exposición en fagos o como una única partícula de fagos. El estuche puede incluir fagémidos, fagos auxiliares, cepas bacterianas, el protocolo con recetas para los reactivos y la descripción del ensayo. El estuche puede ser usado para el desarrollo de la investigación, de diagnóstico y para reactivos terapéuticos.

Un aspecto de la presente invención se refiere a un estuche que comprende la exposición en fagos que comprende el genoma de fago o el fagémido de la presente invención, y un fago auxiliar.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un estuche que comprende el genoma de fago o el fagémido de la presente invención.

Todavía otro aspecto de la presente invención se refiere a un estuche que comprende un fago filamentoso que comprende el genoma de fago o el fagémido de la presente invención.

La invención se describirá ahora con más detalle en los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplos

Ejemplo 1: Exposición de fagémido en pIX

Reactivos

Todos los medios y tampones se prepararon esencialmente como se describe en Sambrook et al. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor*, Nueva York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. El anticuerpo anti-M13-HRP se adquirió en GE Healthcare Bio-Sciences AB (Uppsala, Suecia). Las enzimas de restricción (RE) se adquirieron en New England Biolabs (Ipswich, MA, EE.UU.), con la excepción de DpnI, que se obtuvo de Stratagene (La Jolla, CA, EE.UU.). Los oligos de ADN se adquirieron en MWG Biotech AG (Ebersberg, Alemania). Albúmina de suero bovino (BSA) y Tween 20 se adquirió en Sigma-Aldrich (Oslo, Noruega). La polimerasa de ADN Pfu Turbo fue adquirida en Stratagene (La Jolla, CA, EE.UU.). Los haptenos 2-feniloxazol-5-ona (phOx) y 5-nitrofenacetil (NIP) conjugados con BSA se prepararon esencialmente como se describe en otro lugar (véanse Nakela et al., PMID: 722243 y Michaelsen et al., PMID: 2125362). El isopropil-beta-D-tiogalactopiranosido (IPTG) se adquirió en Fermentas (Burlington, Canadá). La trietilamina (TEA) y la tripsina/EDTA se adquirieron en Sigma-Aldrich (Oslo, Noruega) y en BioWhittaker (Lonza Group Ltd., Visp, Suiza), respectivamente. La cepa de *E. coli* XL1-Blue se adquirió en Stratagene (La Jolla, CA, EE.UU.). El fago auxiliar M13K07 se adquirió en GE Healthcare Bio-Ciencias AB (Uppsala, Suecia). El fagémido pSEX81 (SEC ID N°: 2) (exposición de pIII) que alberga un Fv de cadena sencilla (scFv) con especificidad frente a phOx-BSA fue proporcionado amablemente por Affitech AS (Oslo, Noruega). El vector pSG1 de expresión procariota que alberga el anti-NIP de scFv (SEQ ID N°: 3) (no publicado) se basa en pHOG21 (véase Kiprianov et al., PMID: 9005945) y se ha hecho internamente a partir de los genes variables de anticuerpos derivados de pLNOH2 y pLNOK (véase Norderhaug et al., PMID: 9202712).

Construcción de los nuevos vectores pGALD9 y pGALD9 Δ L de fagémidos de exposición de pIX. A modo de plantilla de partida para la columna vertebral del vector, se ha elegido el fagémido pSEX81 (SEC ID N°: 2) que fue descrito anteriormente (véase GenBank adhesión N°: Y14584). En Cebador lugar, para retirar la secuencia pelB de señal de procariota (N-MKYLPTAAAGLLLLAAQPAMA-C) (SEQ ID N°: 4) que codifica la escisión en este vector, se introdujo un sitio NcoI RE en el extremo N-terminal por mutagénesis in vitro de QuikChange™ usando la pareja de cebadores a41g fwd/a41g--rev (5'-AGAGGAGAAATTAACCATGGAATACCTATTGCCTACG-GC-3' /5'-GCCGTAGGCAATAGGTATTCATGGTTAATTTCTCCTCT-3') (SEQ ID N°: 5 y SEQ ID N°: 6, respectivamente), cambiando por ello el Cebador nucleótido en el segundo codón del ORF de pelB de A a G. A continuación de la mutagénesis, el vector fue digerido con NcoI, religado y usado como plantilla en una segunda PCR recuperando la parte relevante del vector usando la pareja de cebadores pHOG_ EcoRI_ FRWD/scTCR_ rev (5'-TAGCTCACTCATTAGGCACCC-3'/5'-TTTGGATCCAGCG-GCCGC-3') (SEQ ID N°: 7 y SEQ ID N°: 8, respectivamente). Este fragmento de PCR fue movido después al pSEX81 original (SEQ ID N°: 2) en los sitios compatibles con EcoRI/HindIII RE usando técnicas estándar y confirmando por secuenciación del ADN. Este paso retira por completo la porción de pelB de secuencia de señal de codificación, pero preserva el codón de inicio y su posición relativa hacia la secuencia de Shine-Dalgarno (SD) y lacPO, importante para la transcripción y la traducción normales, así como que añade sólo un residuo de Ala antes de la secuencia exógena definido por los sitios NcoI/NotI RE que se encuentran en el pSEX81 original (SEC ID N°: 2). La nueva construcción se denotó pSEX81 Δ L.

En segundo lugar, la secuencia de codificación de pXI se amplificó a partir de M13K07 usando la pareja de cebadores del extremo 5' reetiquetada de pIX_EcoRV/pIX_NheI (5'-ATATGATAT-CAGAATGAGTGTTTTAGTGTATTCTTTTCGCC-3' /5' -ATATGCTAGCTTATCATGAGGAAGTTTCCATTAAACGGG-3') (SEC ID N°: 9 y SEQ ID N°: 10). Este fragmento de PCR se movió después a los fagémidos pSEX81 (SEC ID N°: 2) y pSEX81ΔL de los sitios RE compatibles, intercambiando por ello la región de pIII de codificación en ambos, y dando como resultado una fusión de N-terminal en marco de pIX del casete de NcoI/NotI definido en el pSEX81 original (SEC ID N°: 2). Las nuevas construcciones fueron confirmadas por secuenciación de ADN y designadas pGALD9 y pGALD9ΔL respectivamente. Para conmutar la unidad de anti-phOx (SEC ID N°: 11) de scFv de los diversos fagémidos descritos anteriormente, con la unidad de anti-NIP (SEC ID N°: 3) de scFv de pSG1, esto se hizo como intercambio de casete definido NcoI/NotI RE usando técnicas estándar. Todos los fagémidos que se describen en este documento se introdujeron en *E. coli* XL1-Blue mediante electroporación usando técnicas estándar.

Preparación de partículas de fago

15 Rescate de fagémido a partir de *E. coli* XL1-Blue usando fagos auxiliares M13K07, y el montaje de viriones se controló mediante titulación de una sola dilución como se ha descrito (véanse Welschof et al., PMID: 9050877 y Koch et al., PMID: 11126120).

Ensayos de inmunoabsorción de enzima de captura de fagos enlazadas con (ELISA)

20 phOx-BSA o NIP-BSA fueron absorbidos a pocillos de placas de microtitulación MaxiSorp™ (Nunc, Roskilde, Dinamarca) con 5 µg/ml en PBS, pH 7,4 durante la noche a 4 ° C. Los pocillos se bloquearon con BSA al 2% en PBS (w/v) durante 1 h a TA, donde después las preparaciones de virión se añadieron y se dejaron reaccionar de 1 a 2 horas a TA antes de que los viriones capturados fueran detectados con anti-M13-HRP (1:5.000) durante 1 h a TA. Entre cada paso, los pocillos se lavaron 3 veces con PBST (PBS/0,05% de Tween 20). Los pocillos se desarrollaron con sustrato soluble TMB, y se detuvieron con HCl de 1M después de 30 min y se leyó la absorbancia a A_{450nm}. Para cuantificar la reactividad de Ag como una función de las proteínas de fusión de exposición por virión, el desarrollo ELISA se detuvo antes de que se observara la saturación de la señal para cualquier muestra mediante la adición de HCl de 1M y las lecturas de absorbancia se transformaron de acuerdo con la siguiente fórmula: nivel relativo de exposición = (A_{450nm}/ título de fagémido) x 10¹².

Selección agregada de phOx-/NIP-BSA

35 Se prepararon muestras frescas de virión, ya sea con o sin inducción de IPTG de 1 mM, PEG precipitado y titulado como se ha descrito.

Se agregó después la entidad específica del objetivo en un fondo irrelevante a un nivel 1:10⁷ dando una diversidad conocida de 10⁷, correspondiente a una biblioteca combinatoria de tamaño mediano.

40 Para la selección de NIP-BSA, se agregó el anti-NIP de scFv a al homólogo del anti-phOx de scFv y viceversa. La entrada inicial fue 1x 10¹⁰ cfu^{amp^R}, resultando en un nivel de complejidad de 10³ en ronda panorámica 1 para la totalidad de las 12 bibliotecas de modelos.

45 En resumen, el objetivo se inmovilizó sobre pocillos de placas de microtitulación MaxiSorp™ (Nunc, Roskilde, Dinamarca) por triplicado en la misma placa usando volúmenes de 100 µl, de 1 µg/ml y de 0.1µg/ml para mover panorámicamente las rondas 1 y 2, respectivamente.

50 Antes del movimiento panorámico, los pocillos se bloquearon con PBSTM por 1-2 h a TA, antes de que 100 µl de las respectivas preparaciones de virión prebloqueado (en PBSTM) se añadieran y se dejaran reaccionar durante 1,5 h a TA con agitación.

55 Los pocillos se lavaron 9 veces en PBST seguido de 5 veces en dH₂O usando un lavador de microtitulación antes de que el objetivo unido a los viriones (en pocillos, por triplicado) se eluyeran ya fuera mediante 1) la adición de 100 µl/pocillo de 100 mM de TEA (pH 12) durante 5 min a TA seguida de la neutralización por transferencia del pocillo fresco que contiene 100 µl/pocillo de Tris-HCl, pH 6,8; 2) la adición de 100 µl/pocillo de tripsina/EDTA durante 10 min/TA seguida por transferencia a los pocillos frescos; 3) la adición de 200 µl/pocillo de *E. coli* XL1-Blue de fase de registro (A_{600nm} ~ 0,5, que corresponde a ≥ 5 x 10⁷ células) durante 30 min a 37 ° C con agitación, seguida por transferencia a 10 ml de YT-TAG precalentado (2 x YT que contiene 30 µg/ml de tetraciclina, 100 µg/ml de ampicilina y 0,1 M de glucosa) complementado con fago auxiliar M13K07 en MOI10.

60 La incubación se continuó durante 15 min a 37 ° C con agitación bajo, seguida por 30 min a 37 ° C con alta agitación. Paralelamente, se usaron muestras eluidas de TEA y tripsina para infectar los cultivos XL1 -Blue de la fase de registro de *E. coli* en 9 ml de YT-TAG, se incubaron con baja agitación durante 15 minutos a 37 ° C, y se añadió antes 1 ml de YT-TAG complementado con el fago auxiliar M13K07 en MOI10.

65 La incubación se continuó durante 15 min a 37 ° C con agitación bajo seguida por 30 min a 37 ° C con alta agitación.

Todas las muestras fueron después centrifugadas a 3000-g/10 min/TA, los sobrenadantes fueron descartados y los pellets se resuspendieron suavemente en 10 ml de 2x YT precalentado conteniendo 100 µg/ml de ampicilina y 50 µg/ml de kanamicina.

- 5 Las muestras adecuadas se complementaron con 1 mM de IPTG y todas las muestras se incubaron en ON a 30 ° C con alta agitación. El día después, los cultivos se centrifugaron a 4000-g/10 min/TA y el sobrenadante se filtró estéril en tubos frescos de 15 ml a través de filtros 0,2 µm.

- 10 Estos sobrenadantes fueron después canalizados en la siguiente ronda de movimiento panorámico como se ha descrito, usando 50 µl de volumen/muestra correspondientes a una entrada de al menos 10^9 cfu^{amp^R}/muestra. A continuación de la segunda ronda de selección, el virión que contiene los sobrenadantes se canaliza en un ELISA específico de antígeno como se describió anteriormente.

15 RESULTADOS

- 20 Se sabe que la totalidad de las cinco proteínas de la cubierta estructural del fago filamentosos (fd, M13 y f1) son proteínas integrales de membrana que se encuentran en la membrana interna del huésped gram negativo antes de incorporarse al virión que sobresale (véase Endeman y Model, PMID: 7616570). Este informe también concluye que a pesar de que pIX no permitía ninguna modificación del N-terminal de fusión, la propia proteína de la cápside era solvente accesible en el virión intacto. Tanto Gao et al. (PMID: 10339535 y 12239343) como Khalil et al. (PMID: 17360403) han demostrado más tarde que la exposición de N-terminal de pIX de fusión se permite cuando se expresa a partir de fagémidos y se usa en combinación con la secuencia de señal dependiente de orientación periplásmico. En estos sistemas, la complementación tiene lugar a medida que se dona wt pIX desde el genoma del fago auxiliar en el rescate de fagémido. Para probar si dicha exposición también se permitiría sin ninguna secuencia de señal dependiente de la orientación al periplasma, hemos construido dos fagémidos nuevos denominados pGALD9 y pGALD9ΔL, lo que permite la exposición del N-terminal de pIX, ya sea con o sin tal secuencia de de señal, respectivamente (véase la figura 2).

- 30 Se eligieron dos fusiones de pIX diferentes para analizar usando estos nuevos fagémidos y compararlas con sus homólogas usando exposición estándar de pIII. Ambas fusiones eran de fragmentos de anticuerpos scFv, basados o bien en segmentos de anticuerpos humanos de genes variables específicos para el hapteno conjugado phOx-BSA (anti-phOx de scFv), o en segmentos de anticuerpos murinos de genes variables específicos para el hapteno conjugado NIP-BSA (anti-NIP de scFv). En especial, el anti-phOx de scFv (SEQ ID N°: 11) ha sido seleccionado de una biblioteca de anticuerpos humanos de scFv y se sabe que se expresa bastante bien en *E. coli* (véase Marks et al., PMID: 1.748.994). Por el contrario, es bien sabido que muchos genes variables de hibridoma murino no se expresan bien en *E. coli* y tampoco en la exposición en fagos (véase Krebber et al., PMID: 9032408).

- 40 La exposición de pIX de los scFv no debe interferir con el montaje normal de virión. Por lo tanto, comparamos la efectividad de estos fagémidos de exposición de scFv con y sin secuencia de señal, y también con exposición estándar de pIII (que tiene un requisito absoluto para la señal secuenciada dependiente de la orientación periplásmica), usando rescate y titulación estándar de fagémido como se describe en materiales y métodos (véase la figura 3).

- 45 El resultado de la titulación mostró de sobra que los viriones que contenían fagémido fueron hechos en todos los casos (véanse las figuras 3A y 3C). Cuando las fusiones de scFv se expresan a partir del lac PO sin inducción de promotor (expresión basal), ambas versiones de exposición de pIX y el control de pIII producen títulos comparables para el anti-phOx de scFv (véase la figura 2A). Por el contrario, hay un título de 5 a 10 veces más alto de doblado en la exposición de señal de secuencia independiente de pIX de anti-NIP de scFv en comparación con el de pIII y con el de la exposición dependiente de secuencia de señal de pIX, respectivamente (véase la figura 3C). Cuando la expresión aumentada de fusión de scFv se ve obligada a inducción de IPTG de la lacPO, se adosa una reducción de 10 veces de doblado en los títulos de ambas exposiciones dependientes de secuencia de señal de pIX y pIII. Por el contrario, hubo sólo efectos menores en ambas variantes de exposición dependiente de secuencia de señal de pIX (véanse las figuras 3A y 3C). Como la complementación wt de pIX está presente a partir del fago auxiliar en este sistema, este hallazgo fue tan sorprendente como importante, porque muestra que las exposiciones dependientes de secuencia de señal de pIX y pIII interfieren con el proceso de montaje del virión, mientras que este efecto es sólo menor en el caso de la exposición independiente de secuencia de señal de pIX incluso bajo inducción de IPTG. El efecto es más notable cuando se compara el resultado del anti-NIP de scFv expuesto en pIX con o sin la secuencia de señal, donde el anterior exhibe una reducción de 100 veces de doblado en el título. También es digno de mención el hecho de ver que para ambos scFvs, el montaje del virión es tan bueno o mejor que en pIII cuando se hace en la versión independiente de secuencia de señal de pIX.

- 65 El núcleo de cualquier plataforma de selección combinatoria es el acoplamiento físico fenotípico-genotípico que permite la recuperación del genotipo través de la selección fenotípica. Si este enlace físico se ve comprometido o se pierde, el sistema se vuelve no funcional. Traducido para la exposición de fagémido, significa que es vital para cualquier selección que sea el fagémido, y no el genoma de fago auxiliar, el que se encapsula en los viriones en el rescate de fago auxiliar. Como el fagémido y el fago auxiliar albergan diferentes marcadores de selección de

antibióticos, esta noción puede ser fácilmente evaluada durante la titulación infecciosa mediante el cálculo de la relación entre el fagémido y el fago auxiliar sobre la base de sus respectivas unidades formadoras de colonias (ufc) resultantes del crecimiento selectivo apropiado (ampicilina (ampR), o kanamicina (kanR)). La relación debe entonces estar por encima de 1 para que cualquier selección eficiente corriente abajo sea viable.

5 Al evaluar las proporciones de fagémido y fago auxiliar en las preparaciones de viriones descritos anteriormente (véanse las figuras 3B y 3D), se revelaron diferencias significativas entre las tres rutas de exposición. Usando empaquetamiento estándar de viriones sin inducción de promotor (expresión basal), la totalidad de las tres rutas son viables para el anti-phOx de scFv (véase la figura 2B), mientras que para el anti-NIP de scFv (véase la figura 3D) esto sólo fue cierto para la variante independiente de secuencia de pIX. Tras la inducción de promotor (inducción de IPTG), ambas variantes de pIII y de dependientes de señal de pIX exhibían pérdida severa de la vinculación fenotipo-genotipo, y el efecto era más notable en la fusión de anti-NIP de scFv. Por el contrario, este efecto no estaba presente (anti-phOx de scFv) o era leve (anti-NIP de scFv) para ambas variantes de la exposición independiente de secuencia de señal de pIX. De este modo, los resultados muestran claramente que la exposición independiente de secuencia de señal de pIX alberga una vinculación fenotípica-genotípica superior en comparación tanto con la pIII estándar como con la exposición dependiente de secuencia de señal de pIX.

20 Sobre la base de las muestras anteriores, evaluamos después la exposición funcional de scFv en estos viriones en un ELISA de antígeno específico (véase la figura 4). El resultado mostró claramente la exposición funcional de scFv a partir de las tres rutas de exposición (véanse las figuras 4A y 4B). Como las muestras no se normalizaron de acuerdo con el título de fagémido, las intensidades de señal no son directamente comparables. Lo que es más, se observó saturación de la señal en varias muestras. Para evaluar adecuadamente las diferencias funcionales entre las tres rutas de exposición, se determinaron los niveles relativos de exposición (unidades funcionales de exposición por virión) en un nuevo ELISA de antígeno específico como se describe en materiales y métodos (véanse las figuras 25 4C y 4D). Mientras que el nivel de exposición era comparable entre pIII y la variante dependiente de secuencia de señal de pIX, la exposición independiente de secuencia de señal de pIX era significativamente menor. Esto es cierto para ambos scFvs y tanto en la expresión basal como tras la inducción de IPTG. Como era de esperar, la totalidad de las tres rutas de exposición, y para ambos scFvs, exhibieron una exposición más alta con la inducción de IPTG. Sin embargo, es de la máxima importancia ver los resultados de las figuras 4C y 4D a la luz de las relaciones 30 indicadas en las figuras 3B y 3D. Por ejemplo, está claro que tanto pIII como la exposición dependiente de secuencia de señal de pIX de la unidad anti-NIP de scFv exhibe de unas 10 a 20 (expresión basal) y ~ 25 (inducción de IPTG) veces de plegado más altas de exposición en comparación con su homóloga independiente de secuencia de señal de pIX. Sin embargo, las dos rutas anteriores tienen ambas un enlace fenotípico-genotípico muy débil o perdido, lo que en un régimen de selección combinatoria las haría no funcionales ya que su genotipo se perdería tras la selección fenotípica. Este efecto es también cierto para la unidad de anti-phOx de scFv, pero sólo con la inducción de IPTG. Lo que es más, el nivel de exposición de la unidad anti-phOx en la variante independiente de secuencia de señal de pIX con IPTG inducida es comparable al de las variantes pIII y dependiente de secuencia de señal de pIX en la expresión basal. A la vista de estos datos, es interesante ver que el único informe que explota la pIX (dependiente de secuencia de señal) para la exposición de scFv (véase Gao, PMID: 12239343) siempre usa la 40 inducción de IPTG con empaquetamiento de viriones, pero nunca ha informado de las relaciones entre fagémido y fago auxiliar.

Aunque el formato de scFv se usa a menudo debido a los perfiles favorables de expresión en *E. coli* (véase Bradbury y Marks, PMID: 15261570), varios informes señalan la ventaja de los formatos de exposición de nivel más bajo, como, por ejemplo, fragmentos fab de anticuerpos, en la recuperación de ligantes de alta afinidad en la selección por afinidad (véanse de Haard et al., PMID: 10373423, Hoogenboom, PMID: 16151404 y Rothe y col, PMID: 18191144).

50 De este modo, a pesar incluso de que exposición independiente de secuencia de señal de scFv-pIX parezca producir una exposición de bajo nivel, este efecto, esto puede de hecho tornarse altamente ventajoso cuando se aplica para la selección de alta afinidad.

Por lo tanto, para evaluar cómo la exposición independiente de secuencia de señal de pIX actúa en la selección de afinidad, la comparamos con la exposición convencional de pIII.

55 Los viriones se produjeron en presencia o ausencia de inducción de IPTG, y las proteínas de interés fueron o bien anti-NIP o bien anti-phOx de scFv.

60 De este modo, se evaluaron un total de 4 poblaciones de fagos para los dos objetivos phOx- y NIP-BSA, respectivamente. En cada caso, el objetivo específico de scFv se mezcló con el scFv irrelevante de especificidad en una proporción de 1:107.

Es importante destacar que los dos scFvs no reaccionan de forma cruzada. Dos rondas de selección por afinidad se llevaron después a cabo.

65 Se emplearon tres diferentes estrategias de elución, ya fuera infección directa, de alto pH o proteolítica. El

enriquecimiento fue verificado mediante ELISA de antígeno específico policlonal de fago a continuación de la segunda ronda de selección (véase la figura 5).

5 Cuando la proteína de interés fue expuesta en pIX, la selección fue aproximadamente igual de eficiente y, en la mayoría de los casos, más eficiente que cuando el POI se muestra en PIII. En particular, la ruta estándar de exposición de pIII que emplea un pH alto (TEA) o una elución proteolítica (tripsina) exhibió un enriquecimiento pobre en comparación con la de pIX.

10 La selección fue más eficiente sin que con inducción de IPTG, independientemente de la ruta de exposición y de las condiciones de elución, y el efecto negativo aparecido resultó ser más grave para la ruta de exposición de pIII.

15 De este modo, la baja propensión a la exposición independiente de secuencia de señal de pIX no se tradujo en una selección pobre. Al dejar pIII inalterada y expuesta totalmente a la solvencia, se pudo efectivamente efectuar el rescate de virión seguido del paso de selección de biblioteca sin romper la unión virión-objetivo, convirtiendo el paso de elución en redundante y acelerando altamente los protocolos establecidos.

Lo último puede también facilitar el aislamiento de ligantes de alta afinidad, la elución de los cuales puede ser resistente a una variedad de estrategias (véase Balass et al., PMID: 8954559).

20 Referencias

1. Endemann, H. y Model, P. Location of Filamentous Phage Minor Coat Proteins in Phage and in Infected Cells. *Journal of Molecular Biology* 250, 496-506 (1995) (PMID: 7616570).
- 25 2. Gao, C. et al. Making artificial antibodies: A format for phage display of combinatorial heterodimeric arrays. *PNAS* 96, 6025-6030 (1999) (PMID: 10339535).
- 30 3. Gao, C. et al. A method for the generation of combinatorial antibody libraries using pIX phage display. *PNAS* 2002 Oct 1; 99 (20): 12612- 6. Epub 2002 Sep 18 (PMID: 12239343).
4. WO 2000/071694. Janda, Kim, D.
5. Khalil AS, Ferrer JM, Brau RR, Kottmann ST, Noren CJ, Lang MJ, Belcher AM. Single M13 bacteriophage tethering and stretching. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007 Mar 20; 104 (12): 4892- 7. Epub 2007 Mar 13 (PMID: 17360403).
- 35 6. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*. 1990 Oct 5; 215 (3): 403- 10 (PMID: 2231712).
7. Baneyx F, Mujacic M. Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. *Nat Biotechnol*. 2004 Nov; 22 (11): 1399- 408 (PMID: 15529165).
8. Sambrook et al., *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- 45 9. Michaelsen TE, Aase A, Westby C, Sandlie I. Enhancement of complement activation and cytolysis of human IgG3 by deletion of hinge exons. *Scand J Immunol*. 1990 Nov; 32 (5): 517- 28 (PMID: 2125362).
10. Näkelä O, Kaartinen M, Pelkonen JL, Karjalainen K. Inheritance of antibody specificity V. Anti- 2-phenyloxazolone in the mouse. *J Exp Med*. 1978 Dic 1; 148 (6): 1644- 60 (PMID: 722243).
- 50 11. Kipriyanov SM, Moldenhauer G, Little M. High level production of soluble single chain antibodies in small- scale *Escherichia coli* cultures. *J Immunol Methods*. 1997 Ene 15; 200 (1- 2): 69- 77 (PMID: 9005945).
12. Norderhaug L, Olafsen T, Michaelsen TE, Sandlie I. Versatile vectors for transient and stable expression of recombinant antibody molecules in mammalian cells. *J Immunol Methods*. 1997 May 12; 204 (1): 77- 87 (PMID: 9202712).
- 55 13. Welschof M, Terness P, Kipriyanov SM, Stanescu D, Breitling F, Dörsam H, Dübel S, Little M, Opelz G. The antigen- binding domain of a human IgG- anti- F (ab')₂ autoantibody. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997 Mar 4; 94 (5): 1902- 7 (PMID: 9050877).
- 60 14. Koch J, Breitling F, Dübel S. Rapid titration of multiple samples of filamentous bacteriophage (M13) on nitrocellulose filters. *Biotechniques*. 2000 Dic; 29 (6): 1196- 8, 2002 (PMID: 11126120).
- 65 15. Marks JD, Hoogenboom HR, Bonnert TP, McCafferty J, Griffiths AD, Winter G. By- passing immunization. Human antibodies from V- gene libraries displayed on phage. *J Mol Biol*. 1991 Dic 5; 222 (3): 581- 97 (PMID: 1748994).

16. Krebber A, Bornhauser S, Burmester J, Honegger A, Willuda J, Bosshard HR, Plückthun A. Reliable cloning of functional antibody variable domains from hybridomas and spleen cell repertoires employing a reengineered phage display system. *Immunol Methods*. 1997 Feb 14; 201 (1): 35- 55 (PMID: 9032408).
- 5 17. Bradbury AR, Marks JD. Antibodies from phage antibody libraries. *J Immunol Methods*. 2004 Jul; 290 (1- 2): 29-49 (PMID: 15261570).
- 10 18. de Haard HJ, van Neer N, Reurs A, Hufton SE, Roovers RC, Henderikx P, de Bruïne AP, Arends JW, Hoogenboom HR. A large non-immunized human Fab fragment phage library that permits rapid isolation and kinetic analysis of high affinity antibodies. A large non-immunized human Fab fragment phage library that permits rapid isolation and kinetic analysis of high affinity antibodies (PMID: 10373423).
- 15 19. Hoogenboom HR. Selecting and screening recombinant antibody libraries. *Nat Biotechnol*. 2005 Sep; 23 (9): 1105- 16 (PMID: 16151404).
- 20 20. Rothe C, Urlinger S, Löhning C, Prassler J, Stark Y, Jäger U, Hubner B, Bardroff M, Pradel I, Boss M, Bittlingmaier R, Bataa T, Frisch C, Brocks B, Honegger A, Urban M. The human combinatorial antibody library HuCAL GOLD combines diversification of all six CDRs according to the natural immune system with a novel display method for efficient selection of high- affinity antibodies. *J Mol Biol*. 2008 Feb 29; 376 (4): 1182- 200. Epub 2007 Dic 15 (PMID: 18191144).

Listado de secuencias

- 25 <110> Bio-Medisinsk Innovasjon AS Løset, Geir Åge
 <120> Exposición en fagos independiente de secuencia de señal de pIX
 <130> 45365PC01
 <150> 61/155437
 <151> 2009-02-25
 30 <160> 11
 <170> PatentIn versión 3.5
 <210> 1
 <211> 32
 <212> PRT
 35 <213> Bacteriófago M13
 <400> 1
- | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Ser | Val | Leu | Val | Tyr | Ser | Phe | Ala | Ser | Phe | Val | Leu | Gly | Trp | Cys |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | |
-
- | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Leu | Arg | Ser | Gly | Ile | Thr | Tyr | Phe | Thr | Arg | Leu | Met | Glu | Thr | Ser | Ser |
| | | | 20 | | | | | 25 | | | | | 30 | | |
- <211> 4860
 <212> ADN
 40 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Fagémido
 <400> 2
- | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---------|-------|---------|-------|---------|-------|----------|-------|--------|--------|--------|-------|--------|----|--|-----|
| tggcgt | taata | gcgaag | agggc | ccgcacc | gat | cgccctt | ccc | aacagt | ttgcg | cagcct | gaat | | | | 60 |
| ggcgaat | ggg | acgcgcc | ctg | tagcgg | cgcga | ttaagc | gcgg | cgggt | gtggt | ggttac | gcgc | | | | 120 |
| agcgtga | accg | ctacact | tcg | cagcgc | cccta | gcgccc | gctc | ctttag | cttt | cttcc | cttcc | | | | 180 |
| tttctcg | ccca | cgttgc | ccgg | ctttccc | cg | caagct | tetaa | atcg | gggg | ct | cc | tttag | gg | | 240 |
| ttccgat | tta | gtgctt | taag | gcacct | cgac | ccccaaaa | aac | ttgatt | agg | tgat | ggtt | ca | | | 300 |
| cgtagt | gggc | catcgcc | ctg | atagac | gggt | tttcg | ccctt | tgac | gttga | gtcca | cg | gtt | c | | 360 |
| tttaata | g | gactct | gtt | ccaaact | gga | acaac | actca | acc | tatctc | ggtct | attct | | | | 420 |
| tttgatt | t | aaggg | attt | gccgatt | tcg | gcctatt | ggt | t | aaaaa | atga | g | ctgatt | ta | | 480 |
| caaaa | attta | acgcga | attt | taacaaa | ata | ttaac | getta | caatt | taggt | ggcact | tttc | | | | 540 |
| ggggaa | atgt | gcgcgga | aacc | cctatt | gtt | t | ttttt | tcta | aatac | attca | aatat | gtatc | | | 600 |

ES 2 438 783 T3

cgctcatgag acaataaacc tgataaatgc ttcaataata ttgaaaaagg aagagtatga 660
 gtattcaaca ttcccggtgc gcccttattc ccttttttgc ggcattttgc cttectgttt 720
 ttgctcacc agaaacgctg gtgaaagtaa aagatgctga agatcagttg ggtgcacgag 780
 tgggttacat cgaactggat ctcaacagcg gtaagatcct tgagagtttt cgccccgaag 840
 aacgttttcc aatgatgagc acttttaaaag ttctgctatg tggcgcggtg tttatcccgtg 900
 ttgacgcccg gcaagagcaa ctcggtcgcc gcatacacta ttctcagaat gacttggttg 960
 agtactcacc agtcacagaa aagcatctta cggatggcat gacagtaaga gaattatgca 1020
 gtgctgccat aacctagagt gataaactg cggccaactt acttctgaca acgatcggag 1080
 gaccgaagga gctaaccgct tttttgcaca acatggggga tcatgtaact cgccttgatc 1140
 gttgggaacc ggagctgaat gaagccatac caaacgacga gcgtgacacc acgatgcctg 1200
 tagcaatggc aacaacgctg cgcacaactat taactggcga actacttact cttagcttccc 1260
 ggcaacaatt aatagactgg atggaggcgg ataaagtgc aggaccactt ctgcgctcgg 1320
 cecttccggc tggctggttt attgctgata aatctggagc cggtgagcgt gggctctcgg 1380
 gtatcattgc agcactgggg ccagatggta agccctcccg tatcgtagtt atctacacga 1440
 cggggagtca ggcaactatg gatgaacgaa atagacagat cgctgagata ggtgcctcac 1500
 tgattaagca ttggtaaactg tcagaccaag tttactcata tatactttag attgatttaa 1560
 aacttcattt ttaatttaa aggatctagg tgaagatcct ttttgataat ctcatgacca 1620
 aaatccctta acgtgagttt tcgttccact gagcgtcaga ccccgtagaa aagatcaaag 1680
 gatcttcttg agatcctttt tttctgcgcg taatctgctg cttgcaaaca aaaaaaccac 1740
 cgctaccagc ggtggtttgt ttgccggatc aagagctacc aactcttttt ccgaaggtaa 1800
 ctggcttcag cagagcgcag ataccaaata ctgtccttct agttagccg tagttaggcc 1860
 accacttcaa gaactctgta gcaccgccta ctaacctcgc tctgctaate ctgttaccag 1920
 tggctgctgc cagtggcgat aagtcgtgtc ttaccgggtt ggactcaaga cgatagttac 1980
 cggataaggc gcagcggctg ggctgaacgg ggggttcgtg cacacagccc agcttgagc 2040
 gaacgaccta caccgaactg agatacctac agcgtgagct atgagaaagc gccacgcttc 2100
 ccgaagggag aaagcgggac aggtatccgg taagcggcag ggtcggaaaca ggagagcgca 2160
 cgagggagct tcagggggga aacgcctggt atctttatag tcctgtcggg ttctgccacc 2220
 tctgacttga gcgtcgatgt ttgtgatgct cgtcaggggg gcggagccta tggaaaaacg 2280
 ccagcaacgc ggccttttta cggttcctgg ccttttctg gccttttct cacatgttct 2340
 ttctgcggtt atcccctgat tctgtggata accgtattac cgcctttgag tgagctgata 2400

ES 2 438 783 T3

ccgctcgcg cagccgaacg accgagcgca gcgagtcagt gagcgaggaa gcggaagagc 2460
 gcccaatacg caaacccgct ctccccgcgc gttggccgat tcattaatgc aggtatcacg 2520
 aggccttttc gtcttcacct cgagagcggg cagtgcgcgc aacgcaatta atgtgagtta 2580
 gtcactcat taggcacccc aggctttaca ctttatgctt ccggctcgta tgttgtgtgg 2640
 aattgtgagc ggataacaat ttcacacaga attcattaa gaggagaaat taacatgaa 2700
 atacctattg cctacggcag ccgctggctt gctgctgctg gcagctcagc cggccatggc 2760
 gcaagttagc ctgcagcagt ctggggctga actggtgagg cctggggctc cagtgaagat 2820
 ttctgcaag ggtctggct acaaatcac tgattatgct acgcactggg tgaacagag 2880
 tcatgcaag agtctagagt ggattggagt tattagtact tactatggtg atactactta 2940
 taaccagaag tcaagggca agccacaat gactgtcgac aaatcctcca gcacagccta 3000
 tatggaactt cccagactga catctgatga ttctgccatc tattattgtg ccctgttacg 3060
 cccctttgct tactggggcc aaggggaccac ggtcaccgta tcctcagga gtgcatccgc 3120
 cccaagctt gaagaagggt aattttcaga agcacgcgta gatatcgtgc tgaccaatc 3180
 tccaactcct ctgagtgtg cagcaggaga gaaggctact atgagctgca agtccagtca 3240
 gagtctgta aacagtggaa atcaaaaata cgacttggcc tggtagcagc agaaaccagg 3300
 gcaactcct aaactgttga tctacggggc atccactagg gaactctggg tccctgatcg 3360
 ctctcacagg agtgatctg gaaccgattt cactcttacc atcagcagtg tgcaggctga 3420
 agacctggca gtttattact gtcagaatga tcatagtat ccgttaacgt tcgggtgctgg 3480
 caccaagctg gaaatcaaac gggcgccgc tggatccaaa gatcagag ctgaaactgt 3540
 tgaaagttgt ttagcaaat cccatacaga aaattcattt actaacgtct ggaagacga 3600
 caaaacttta gatcgttacg ctaactatga gggctgtctg tggaaatgcta caggcgttgt 3660
 agtttgtact ggtgacgaaa ctacagtgtta cggtagatgg gttcctattg ggcttctat 3720
 ccctgaaat gaggtgtgtg gctctgaggg tggcggttct gaggtggcg gttctgaggg 3780
 tggcggtagt aaactcctg agtacgggta tacacctatt ccgggctata cttatatcaa 3840
 ccctctcgac ggcaattatc cgctgtgac tgagcaaac ccgctaato ctaatcctc 3900
 tcttgaggag tctcagcctc ttaatacttt catgtttcag aataataggt tccgaaatag 3960
 gcagggggca ttaactgttt atacgggac tgttactcaa ggcaactgacc ccgttaaac 4020
 ttattaccag tacactcctg tatcatcaaa agccatgat gacgcttact ggaacggtaa 4080
 attcagagac tgcgctttcc attctggctt taatgaggat ttatttgttt gtgaatatca 4140
 aggccaatcg tctgacctgc ctcaacctcc tgtcaatgct ggcggcggct ctggtgtgtg 4200

 ttctggtggc ggctctgagg gtggtggctc tgagggtggc ggttctgagg gtggcggctc 4260
 tgagggaggc ggttcgggtg gtggtctctg ttccggatgat ttgattatg aaaagatggc 4320
 aaacgctaata aggggggcta tgaccgaaa tgccgatgaa aacgcgctac agtctgacgc 4380
 taaaggcaaa cttgattctg tcgctactga ttacgggtgct gctatogag gtttcattgg 4440
 tgacgtttcc ggccttctga atggtaatgg tgctactggt gatcttctg gctctaattc 4500
 ccaaatggct caagtcgggt acgggtgataa ttcaccttta atgaataatt tccgtcaata 4560
 ttaacctcc ctccctcaat cgggtgaatg tcgccctttt gtctttggcg ctggtaaacc 4620
 atatgaattt tctattgatt gtgacaaaat aaacttatc cgtggtgtct ttgcgtttct 4680
 tttatattgt gccaccttta tgtatgtatt ttctacgttt gctaacatc tgcgtaataa 4740
 ggagctctaa tgatctagag gcctgtgcta atgatcagct agottgaggc atcaataaaa 4800
 cgaaaggctc agtcgaaaga ctgggccttt cgttttatct gttgtttgct ggtaacgctc 4860

<210> 3
 <211> 249
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> fragmento de scFv
 <400> 3

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Arg Ile Asp Pro Asn Ser Gly Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60
 Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Pro Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Tyr Asp Tyr Tyr Gly Ser Ser Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Leu Glu Gly Gly Gly Ser Gly
 115 120 125
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Leu Gln Ala Val Val Thr
 130 135 140
 Gln Glu Ser Ala Leu Thr Thr Ser Pro Gly Glu Thr Val Thr Leu Thr
 145 150 155 160
 Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn Trp
 165 170 175
 Val Gln Glu Lys Pro Asp His Leu Phe Thr Gly Leu Ile Gly Gly Thr
 180 185 190
 Asn Asn Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Leu Ile
 195 200 205
 Gly Asp Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Thr Gln Thr Glu Asp Glu
 210 215 220
 Ala Met Tyr Phe Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn His Trp Val Phe Gly
 225 230 235 240
 Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 245

- <210> 4
- <211> 22
- 5 <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> secuencia de señal
- <400> 4

Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala
 1 5 10 15

- 10 Ala Gln Pro Ala Met Ala
 20
- <210> 5
- <211> 39
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- 15 <220>
- <223> Cebador
- <400> 5
- agaggagaaa ttaacatgg aatacctatt gcctacggc 39
- <210> 6

<211> 39
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 5 <223> Cebador
 <400> 6
 gccgtaggca ataggtattc catgggtaaat ttctcctct 39
 <210> 7
 <211> 21
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 7
 15 tagctcactc attaggcacc c 21
 <210> 8
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> Cebador
 <400> 8
 tttggatcca gcggccgc 18
 <210> 9
 25 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 30 <400> 9
 atatgatatc agaatgagtg ttttagtgta ttcttcgcc 40
 <210> 10
 <211> 39
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 10
 atatgctagc ttatcatgag gaagttcca ttaaacggg 39
 40 <210> 11
 <211> 253
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 45 <223> scFv
 <400> 11

ES 2 438 783 T3

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30

Gly Ile Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Trp Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Tyr Lys Ser Tyr Ala Gln Asn Phe
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Phe Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Thr Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Val Arg Leu Val Pro Lys Arg Thr Ala Thr Leu His Tyr Tyr Ile Asp
 100 105 110

Val Trp Gly Lys Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Ser Ala Ser
 115 120 125

Ala Pro Lys Leu Glu Glu Gly Glu Phe Ser Glu Ala Arg Val Gln Ser
 130 135 140

Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Ala Ala Pro Gly Gln Lys Val
 145 150 155 160

Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn Tyr Val
 165 170 175

Ser Trp Tyr Val Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 180 185 190

Asp Asn Asn Lys Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser
 195 200 205

Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Gly Ile Thr Gly Leu Gln Thr Gly
 210 215 220

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Ala Trp Asp Gly Ser Leu Arg Glu
 225 230 235 240

Ala Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly
 245 250

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un genoma de fago o un fagémido que comprende un ácido nucleico que codifica una proteína pIX de fusión procedente de un fago filamentoso, en el que la proteína de fusión no comprende una secuencia de señal de N-terminal de procarionota.
- 10 2. El genoma de fago o el fagémido de la reivindicación 1, en el que la proteína pIX de fusión comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la posición 1-32, 2-32, 3-32, 4-32 y 5-32 de la SEC ID N°: 1 (MSVLVYSFASFVLGWCLRSIGI-TYFTRLMETSS).
- 15 3. El genoma de fago o el fagémido de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el péptido exógeno está fusionado directamente con el extremo N-terminal de la secuencia de pIX.
- 20 4. El genoma de fago o el fagémido de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el péptido exógeno se selecciona de entre el grupo que consiste en anticuerpos o fragmentos de ellos, que cubre Fv, scFv, Fab, dominios individuales, dominio Z de la proteína A o fragmentos de él (affibody), ankyrin o fragmentos de ella, DARPin o fragmentos de ella, receptor de células T o fragmentos de él, CMH de clase I o II o fragmentos de él, fibronectina o fragmentos de ella, Anticalins o fragmentos de ellas, dominios PDZ o fragmentos de ellos, IgNAR o fragmentos de él, CTLA4 o fragmentos de él, ImmE7 o fragmentos de ella, knottins o fragmentos de ellos, avimer o fragmentos de ella, GFP o fragmentos de ella y otros fluoróforos biológicos codificados por genes.
- 25 5. El genoma de fago o el fagémido de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el péptido exógeno es un miembro de la biblioteca.
- 30 6. Un fago filamentoso que comprende un genoma de fago o un fagémido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5.
- 35 7. El fago filamentoso de acuerdo con la reivindicación 6, que comprende adicionalmente un gen que codifica wt pIX y/o proteína de wt pIX.
- 40 8. El fago filamentoso de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el fago no comprende un gen que codifica wt pIX y/o proteína de wt pIX.
- 45 9. El fago filamentoso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6-8, que comprende adicionalmente uno o más del grupo seleccionado a partir de la proteína pIII de fusión, de la proteína pVII de fusión y de la proteína pVIII de fusión.
10. Un sistema de exposición en fagos que comprende un genoma de fago o un fagémido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5 y un fago auxiliar.
11. Un estuche que comprende el sistema de exposición en fagos de la reivindicación 10.
12. Una biblioteca de fagos que comprende dos o más fagos filamentosos que exponen diferentes proteínas, en la que al menos una de estas proteínas es la proteína pIX de fusión expresada a partir del genoma de fago o de un fagémido de acuerdo con la reivindicación 1.

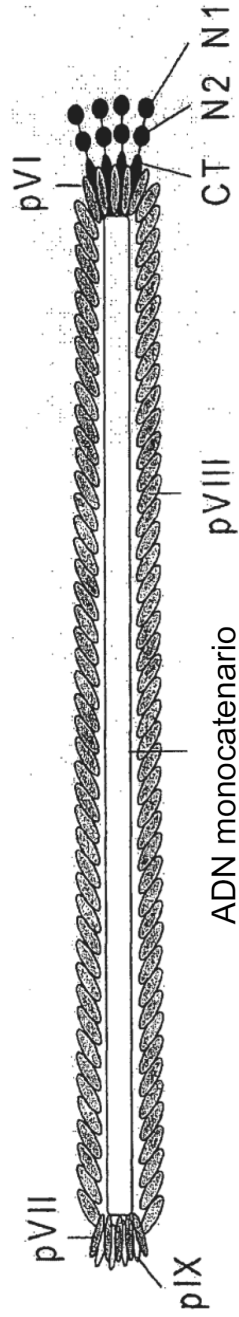


Fig. 1

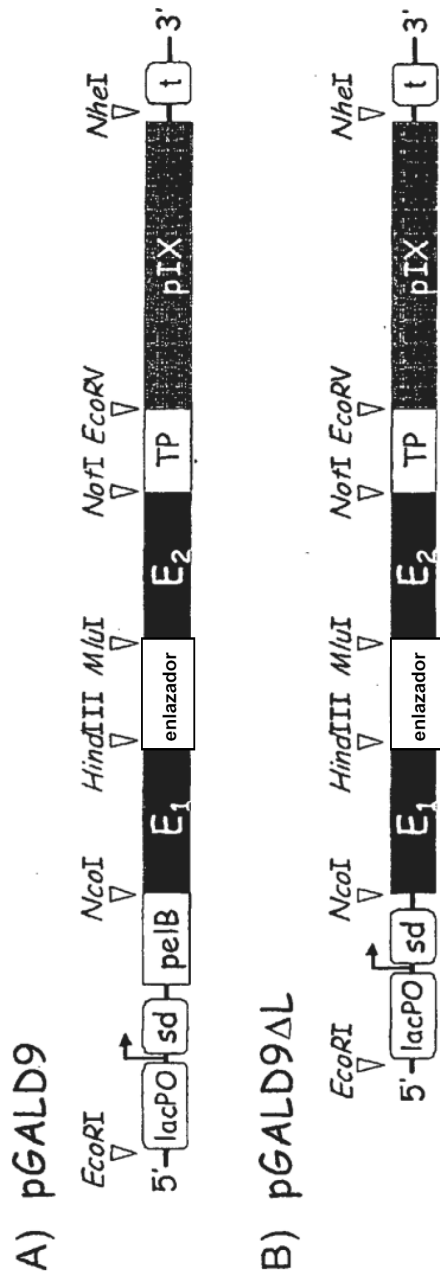
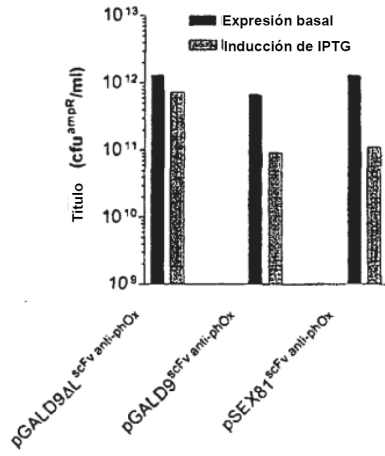
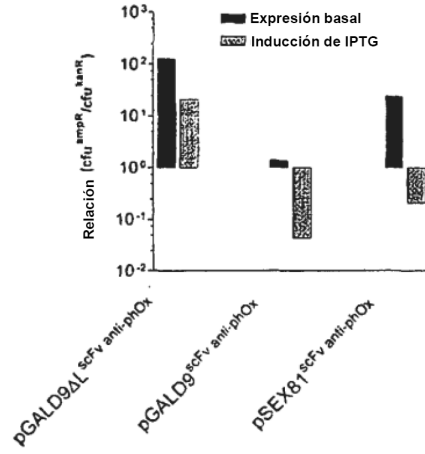


Fig. 2

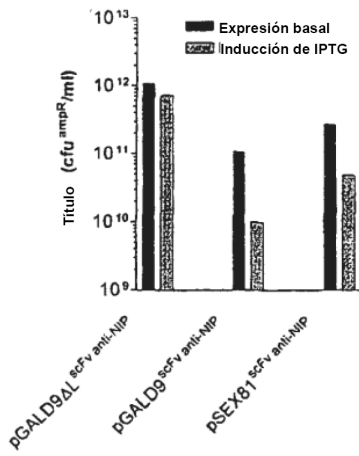
A.



B.



C.



D.

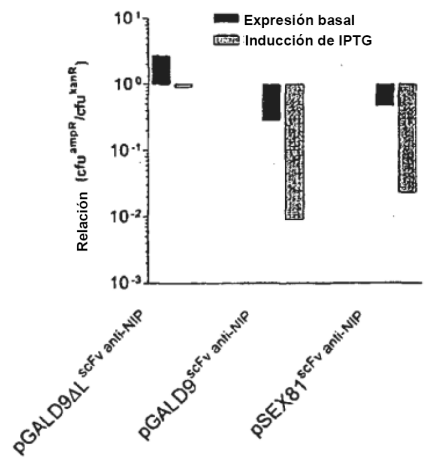


Fig. 3

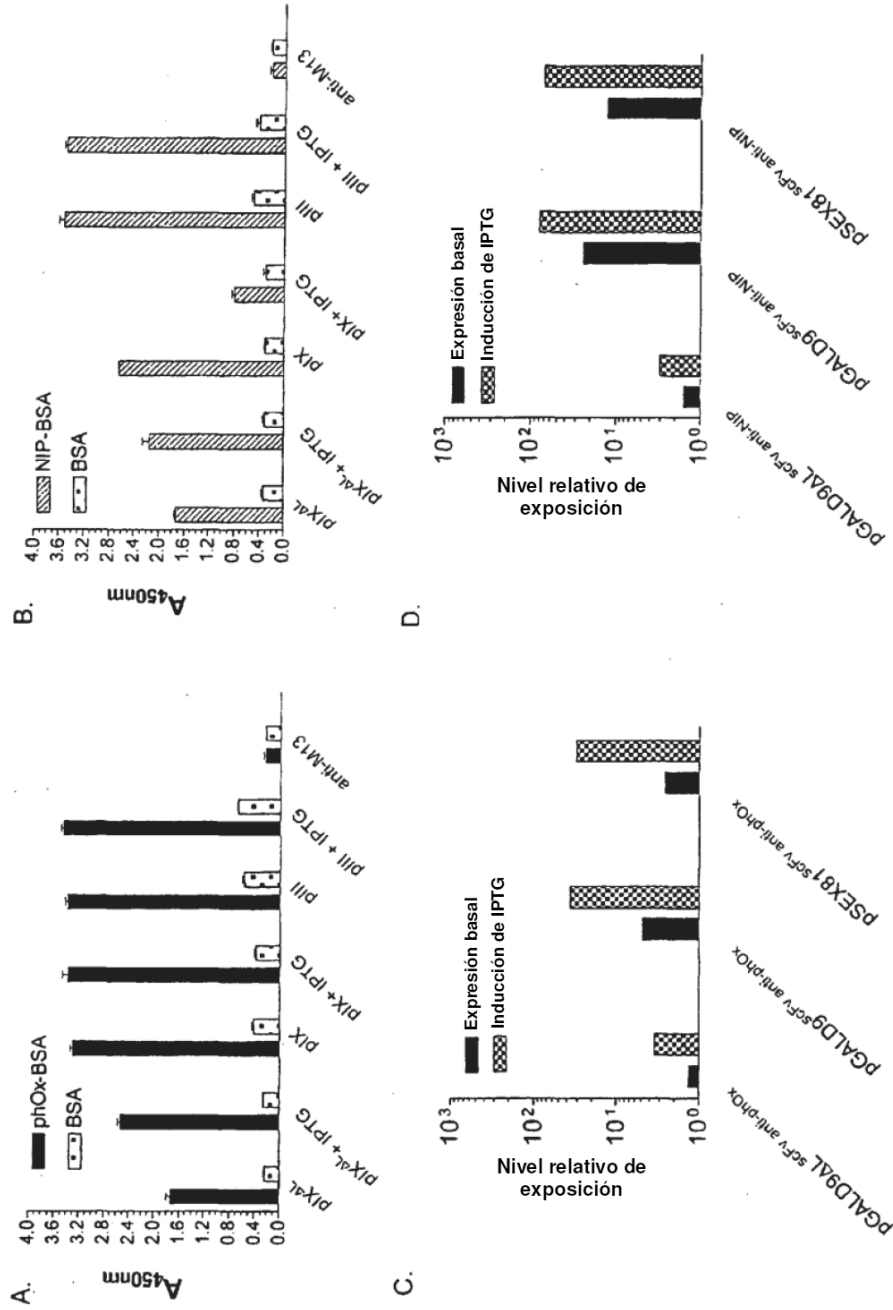


Fig. 4

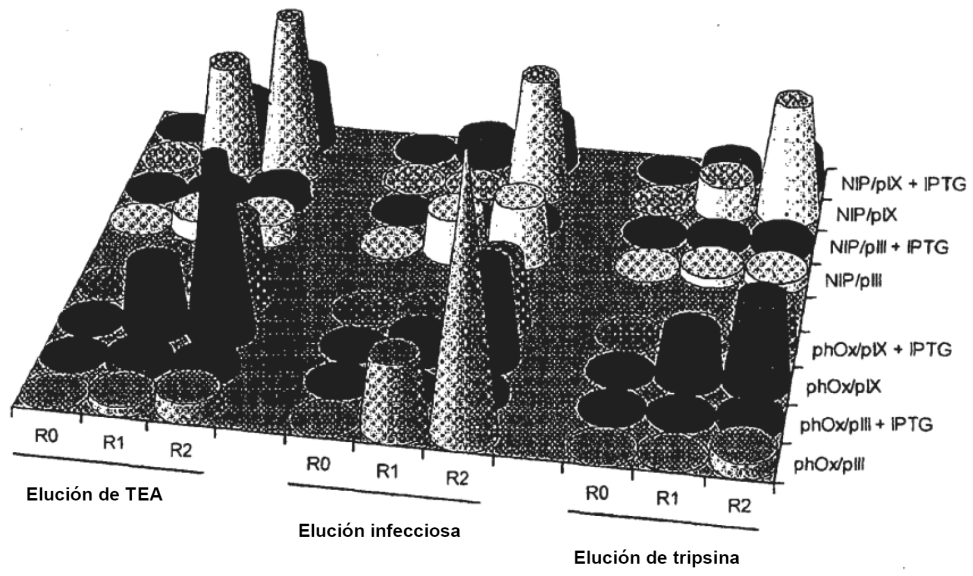


Fig. 5