

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 445 152**

51 Int. Cl.:

C12N 15/10 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.08.2008 E 08787356 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.11.2013 EP 2193199**

54 Título: **Presentación en fagos de pVII**

30 Prioridad:

20.08.2007 US 956871 P
26.11.2007 DK 200701673

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
28.02.2014

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 2 445 152 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

Presentación en fagos de pVII

5 **Antecedentes de la invención**

10 El uso de enfoques combinatorios para la identificación, caracterización y modificación de proteínas, ha sido altamente exitoso tanto en la investigación como en el desarrollo académico y comercial. A este respecto, la tecnología de presentación en bacteriófagos filamentosos, o fagos, ha preparado el terreno siendo la primera plataforma de colecciones y todavía rige como la tecnología dominante. Por tanto, la presentación en fagos se aplica ampliamente tanto en el descubrimiento de proteínas básico como aplicado, así como en el desarrollo tanto de diagnósticos basados en proteínas novedosos como de tratamientos, ya que son la clase de compuestos que crecen más rápidamente en todo el mundo.

15 El principio de la tecnología de presentación en fagos se basa en la unión de genotipo - fenotipo ofrecida por la propiedad de que cada virión sólo presentará sobre su superficie las mismas proteínas que se codifican por el genoma encapsulado por su cubierta proteica. La propia partícula de fago es altamente resistente a una variedad de condiciones fisicoquímicas; por tanto la presentación en fagos ofrece una versatilidad superior en muchos regímenes de selección en comparación con las tecnologías combinatorias competitivas.

20 Se ha logrado la presentación en fagos de polipéptidos heterólogos usando las cinco proteínas estructurales de la cubierta de fagos filamentosos, pero sólo la presentación en pIII y en cierta medida en pVIII han alcanzado un uso generalizado (Figura 1).

25 Cuando la fusión heteróloga es sólo un péptido corto, se prefieren los sistemas de presentación multivalentes que usan vectores basados en genoma de fago, mientras que para fusiones más grandes que requieren dominios plegados la mayoría de las aplicaciones se beneficiarán de los sistemas fagémidos. En el último caso, la presentación en fagos de pIII-anticuerpo está dominando, con mucho, el campo, pero están emergiendo estructuras alternativas en la actualidad, continuando con la necesidad de expansión de las herramientas de ingeniería de proteínas del futuro. Para muchas aplicaciones, será altamente ventajoso poder fabricar, específicamente y de manera controlada, partículas de fagos biespecíficas en las que más de una de las proteínas de la cubierta presente un péptido de fusión en el contexto de la misma partícula de virus. Además, un sistema de este tipo no debe interferir con los enfoques de presentaciones ya establecidos y en particular con la presentación en pIII y pVIII.

35 Endemann y Model, 1995 (PMID: 7616570), informaron de que la proteína de la cubierta menor pVII no estaba accesible en el fago intacto y que pVII no era funcional con otra proteína fusionada a su extremo N-terminal. Por tanto, este informe concluyó que pVII no se puede usar para la presentación en fagos.

40 Gao et al, 1999 (PMID: 10339535) y la solicitud de patente WO0071694, describen la presentación en fagos de péptidos heterólogos en pVII usando la marca de octapéptido FLAG, así como presentación en fagos simultánea en pVII y pIX para generar polipéptidos heterodiméricos funcionales que albergan topologías de plegado complejo (anticuerpo Fv). Estos autores quisieron desarrollar un medio alternativo para la presentación de anticuerpos. Las proteínas de fusión pVII y pIX se expresaron a partir de un fagémido empleando una constelación bicistrónica, por lo que las partículas de fagos funcionales resultantes contuvieron inevitablemente varias cantidades de proteínas de fusión pVII y pIX debido a la complementación por la proteína pVII y pIX natural donada desde el genoma del fago colaborador. Como se menciona anteriormente, se había sugerido previamente que pVII y pIX no eran funcionales con otra proteína fusionada a sus extremos N-terminales, y Gao et. al. dieron dos posibles motivos para su éxito, solas o por la combinación de ambas.

50 Un posible motivo era que una secuencia líder procariota (secuencia señal) se unió de forma N-terminal a las proteínas de fusión, garantizando así la dirección de la proteína recombinante al espacio periplásmico y de este modo evitó la acumulación en el citoplasma. Otro posible motivo era que las proteínas recombinantes se expresaron a partir de un fagémido, no de un genoma de fago como por Endemann y Model, por tanto las pVII y pIX naturales del fago colaborador que necesitaban inevitablemente un rescate de fagémido complementaron las proteínas de fusión pVII y pIX recombinantes, preservando así la funcionalidad natural que de otro modo se podía haber perdido debido a la modificación recombinante. Es decir, los fagos comprenderían una mezcla de proteínas de fusión y naturales. Los autores mencionan que el formato de presentación de pVII-pIX sería particularmente útil para la presentación combinatoria de las matrices heterodímeras, que, por motivos desconocidos, parece proporcionar un enriquecimiento de gran alcance particular durante los protocolos de fijación. Los autores no prevén el uso de pVII como única proteína de presentación (como genoma de fago o fagémido) o el uso de la presentación de pVII en combinación con la presentación de otra proteína de la cubierta (diferente de pIX) para lograr una presentación biespecífica.

65 Kwasnikowski et al. (PMID: 16277988) describió una fusión genéticamente estable de fragmentos de scFv al gen VII directamente en el genoma del fago. Es decir, los fagos resultantes no comprendían proteína pVII nativa, y la presentación de pVII era multivalente. Los autores especularon que uno de los motivos para una presentación de

pVII exitosa en el formato de genoma de fago es que soportaban el gen de fusión con una secuencia señal procariota que dirige la proteína de fusión al espacio periplásmico. Los autores argumentaron que la única característica de su sistema es que los fagos que presentan pVII llevan la proteína de la cubierta menor pIII natural, no modificada. Puesto que se ha informado de que se requieren múltiples copias de pIII funcional para una infección de células huésped, la presencia de pIII natural de la superficie del fago puede facilitar la recuperación de los anticuerpos seleccionados con mayor diversidad. Por tanto, los autores no prevén la presentación biespecífica, ni prevén la presentación de pVII sin una secuencia señal procariota dirigida al espacio periplásmico.

Khalil et al (PMID: 17360403) describe una aplicación que se aprovecha de la característica de un virión de fago filamentoso biespecífico en el que se presenta un péptido exógeno en cada punta distal del mismo virión. Lograron esto usando la combinación de un vector de genoma de fago pIII común que complementa un fagémido de presentación de pIX. En este ajuste, el vector de genoma de fago sirvió como fago colaborador en el rescate del fagémido, recordando de este modo el enfoque descrito en el presente documento de crear un virión de fagémido biespecífico rescatando un fagémido de presentación de pIII por el uso de un genoma de fago colaborador modificado pVII. Además, los viriones biespecíficos de Khalil et al presentan una fusión de péptido-pIII que permite una biotilación controlada de su virión. Sin embargo, existen varias características que diferencian entre estas dos vías de obtención de un virión biespecífico, así como de obtención de una biotilación de virión definida, lo que las hace únicas entre sí.

El documento WO 2004/050871 divulga una mezcla de proteínas de fusión que contienen dominios de interacción mutua, usados para identificar los agentes de unión específicos donde cada proteína incluye una secuencia de localización para translocación a través de la membrana citoplásmica. La cápside del fago de la mezcla se elige de las cápsides de M13 pIII, pVI, VII y pVIII.

En primer lugar, el enfoque de Khalil et al no se puede usar en combinación con la presentación de fagémido de pIII, ya que el su vector de genoma de fago el que porta su fusión de pIII, por tanto no se puede obtener biespecíficamente en el rescate de fagémido y también sería muy probablemente perjudicial para la funcionalidad de ambas fusiones de pIII.

En segundo lugar, y como también señalaron los propios autores, las modificaciones de pIX genómicas no se consideran como una estrategia viable debido a la superposición de genes en el genoma del fago, por tanto no prevén ni especulan sobre realizar ningún genoma de fago colaborador modificado que se pueda usar para el rescate de fagémido pIII (o pVIII) y de este modo donar una característica fenotípica definida a ambas puntas distales del mismo virión. Khalil et al no mencionan nunca el uso de pVII modificada en presentación del genoma de fago o bien de fagémido.

En tercer lugar, Khalil et al no especulan en la modificación de un único genoma de fago para lograr un virión biespecífico, aprovechando la modificación simultánea de más de un gen de cápside dentro del mismo genoma. Simplemente usan una presentación de péptidos pIII estándar a través de un vector de genoma de fago comercialmente disponible.

En cuarto lugar, Khalil et al sólo preparan viriones biespecíficos que presentan péptidos cortos, no dominios plegados, y nunca especulan sobre aprovechar dicha presentación en, o ambas proteínas de cápside modificadas.

En quinto lugar, Khalil et al logran una biotilación específica de sitio de su péptido presentado pIII a través de una conjugación química *in vitro*, no por una reacción enzimática *in vitro* o bien *in vivo*. Los autores nunca previeron una biotilación mediada por enzimas de un resto presentado presentando un sustrato enzimático tal como AviTag.

Finalmente, Khalil et al. no muestra ningún tipo de presentación sin el uso de una secuencia señal N-terminal.

Sumario de la invención

Un objetivo de la presente invención es proporcionar una estructura alternativa para péptidos presentados en fagos filamentosos.

Un primer aspecto de la invención es un genoma de fago o un fagémido que comprende un ácido nucleico que codifica una proteína de fusión que comprende la proteína de la cubierta menor del fago filamentoso pVII, dicha proteína de fusión no comprende una secuencia señal N terminal y por tanto es una fusión directa a un péptido exógeno.

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

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 colección de fagos filamentosos.

Un aspecto de la invención se refiere a un sistema de presentación en fagos que comprende un fagémido y un fago colaborador, en el que el fago colaborador comprende un ácido nucleico que codifica las proteínas de fusión pVII de la invención.

- 5 Otro aspecto de la invención se refiere a un sistema de presentación en fagos que comprende un fagémido y un fago colaborador, en el que el fagémido comprende un ácido nucleico que codifica las proteínas de fusión pVII de la invención.

- 10 Un aspecto se refiere a un kit que comprende un sistema de presentación en fagos que comprende un fagémido y un fago colaborador, en el que el fago colaborador comprende un ácido nucleico que codifica las proteínas de fusión pVII de la invención.

Breve descripción de las figuras

- 15 Figura 1

Dibujo esquemático de la estructura del fago filamentoso. El virión se construye por cinco proteínas estructurales que cubren una molécula de ADN monocatenaria. En el fago natural (wt) existen aproximadamente 2700 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 es dependiente del tamaño del genoma en aprox. 2,3 nucleótidos por proteína de la cubierta pVIII y por tanto la longitud de la partícula se acomoda por un incremento o una disminución en las copias insertadas de pVIII. De forma notable, las estructuras de pIII y pVIII se han caracterizado por difracción de rayos X de fibras, cristalografía y RMN. La proteína de la cubierta menor pIII contiene tres dominios distintos separados por regiones ricas en glicina: N1 (se une a TolA), N2 (se une al pilus F) y CT (integrado en el virión y es importante para un ensamblaje de virión normal).

Figura 2

30 Optimización de codón K12 de *E. coli* de AviTag™, marca HIS6 y marca FLAG. (A) Comparación de la secuencia de ADN AviTag™ comercialmente disponible con el uso del codón K12 de *E. coli*. Las columnas en rojo son la secuencia presentada y las columnas en negro son los ajustes de referencia. (B) La línea superior muestra la AviTag™ original, mientras que la línea inferior muestra la secuencia modificada ajustada de acuerdo con el resultado en A. (C) péptido FLAG de codón optimizado. (D) péptido HIS6 de codón optimizado.

- 35 Figura 3

Valoración de fagos colaboradores modificados comparados con fago colaborador wt.

Figura 4

- 40 Análisis ELISA M13K07 AviTag-pVII

Las preparaciones de fago normalizado se mezclaron con perlas de estreptavidina (SA) para absorber viriones biotinilados y se realizó un ELISA como se describe en el ejemplo 1.

- 45 Figura 5

Análisis ELISA que muestra la accesibilidad de la marca FLAG como fusión de pVII en M13K07. Las preparaciones de fago normalizadas se usaron en el ensayo ELISA. Hay una detección de marca FLAG específica sólo de M13K07-FLAG tanto para M2 como para M5 MAb. Hay una detección más fuerte de la marca FLAG por el M5 MAb.

- 50 Figura 6

Análisis que muestra la accesibilidad de la marca HIS como fusión de pVII tanto para M13K07 (SEQ ID NO: 31) como para VCSM13 (SEQ ID NO: 32). Las preparaciones de fago normalizadas se mezclaron con Talon Dynabeads para absorber los viriones marcados con HIS6 y se realizó un ELISA como se describe en el ejemplo 1.

Figura 7

- 60 (A) valoraciones de fagémido de fagémidos que presentan scTcR y scFv-pIII mostradas como $\text{cfu}^{\text{ampR}}/\text{ml}$. (B): proporciones de fagémido con respecto a fago colaborador como la proporción de la valoración de fagémido ($\text{cfu}^{\text{ampR}}/\text{ml}$) dividida entre la valoración del fago colaborador ($\text{cfu}^{\text{kanR}}/\text{ml}$).

Figura 8

- 65 Análisis de ELISA de AviTag de fagémido scTCR que muestra la accesibilidad específica de AviTag después del

rescate de fago por Dynabeads recubiertas con estreptavidina. El recuadro muestra el valor de la señal del fago colaborador M13K07-AviTag. Se usaron preparaciones de fago normalizadas.

Figura 9

5 Análisis ELISA que muestra la accesibilidad de la marca FLAG como fusión de pVII en dos fagémidos diferentes, pFKPDNscTCR Vaβ4B2A1 (A) y pSEX-scFv anti-phOx (B) por captura de viriones de fagémido por dos anticuerpos anti FLAG, M2 y M5. Se usaron preparaciones de fago normalizadas.

10 Figura 10

Análisis ELISA que muestra la funcionalidad de scTCRpIII (A) y scFvpIII (B) presentada en viriones derivados de fagémido con pVIIAviTag. Se usaron preparaciones de fago normalizadas.

15 Figura 11

Análisis que muestra la funcionalidad de scTCR (A) y scFv (B) presentada en viriones derivados de fagémido con marca FLAG y marca HIS6. Se usaron preparaciones de fago normalizadas.

20 Figura 12

Valoración de fago genómico fUSE5-scTCRpIII con y sin pVIIAviTag.

Figura 13

25 Análisis ELISA que muestra la funcionalidad de preparaciones de fago fUSES-AviTag genómicas por captura de fagos por perlas de estreptavidina seguido de detección de fagos unidos por anticuerpos anti M13. Se usaron preparaciones de fago normalizadas.

30 Figura 14

Análisis ELISA que muestra la funcionalidad de pIII que presenta scTCR en fago genómico fUSE5 con Avitag-pVII. Se usaron preparaciones de fago normalizadas.

35 Figura 15

40 Dibujo esquemático de los fagémidos de presentación de pVII novedosos pGALD7 (A) y pGALD7ΔL (B). El esqueleto del vector de ambos fagémidos se basó en pSEX81 (SEQ ID NO:29), secuencia a la que se puede acceder a partir del GenBank con n.º de acceso: Y14584, y los detalles sobre la construcción se describen en Material y procedimientos. Ambos fagémidos pueden acomodar casetes de secuencias exógenas *en marco* (denominadas E₁ y E₂) por medio de un intercambio de casetes sencillo de las porciones NcoI/HindIII y MluI/NotI respectivamente. Los casetes se conectan por una secuencia enlazadora sintética que varía entre las diferentes construcciones descritas en el presente documento. Abreviaturas: lacPO, promotor lac; sd, secuencia Shine-Dalgarno; pelB, secuencia señal de peptato liasa bacteriana; TP, sitio de proteasa tripsina; t, T7 terminador transcripcional.

Figura 16

50 Valoraciones de fagémidos de scFv anti-phOx (SEQ ID NO:26) presentadas de pGALD7ΔL (pVII^{ΔL}), pGALD7 (pVII), pSEX81 (pIII) y pSEX81ΔL (pIII^{ΔL}).

Todos los fagémidos albergan un marcador de resistencia a ampicilina, por tanto las valoraciones se muestran como unidades formadoras de colonias resistentes a ampicilina por milímetro de solución (cfu^{amp^R}/ml).

55 Figura 17

60 ELISA específica de antígeno (phOx-BSA) que compara la presentación funcional de scFv anti-phOx (SEQ ID NO:26) entre pVII y pIII, y con y sin secuencia señal (ΔL). Se llevó a cabo el ELISA como se describe en materiales y procedimientos y la entrada de la valoración fue de 2x 10¹⁰ cfu^{amp^R}/ml para todas las muestras, excepto para pGALD7 (pVII), para la que se usó no diluido (correspondiente a 1,1x 10⁷ cfu^{amp^R}/ml). El anti-M13^{HRP} es un control negativo en adsorción inespecífica de la detección del virión MAb para el antígeno y bloque.

Figura 18

65 (A) valoraciones de fagémidos de scFv anti-phOx presentadas de pGALD7ΔL (pVII^{ΔL}), pGALD7 (pVII), pSEX81 (pIII)

y pSEX81ΔL (pIII^{AL}) mostradas como cfu^{amp^R}/ml. (B). proporciones de fagémido con respecto a fago colaborador como la proporción de la valoración de fagémido (cfu^{amp^R}/ml) dividida entre la valoración del fago colaborador (cfu^{kan^R}/ml). En empaquetado del virión se realizó como un rescate de fagémido estándar como se describe en materiales y procedimientos (-), o con una concentración final de IPTG 0,1 mM presente después de superinfección en ambos A y B.

Figura 19

ELISA específico de antígeno (phOx-BSA) que compara la presentación funcional de scFv anti-phOx pVII con y sin secuencia señal (ΔL) y con y sin inducción de IPTG (0,1 mM) de la expresión de la fusión de pVII. Se llevó a cabo el ELISA como se describe en materiales y procedimientos y la entrada de la valoración fue de 2×10^{10} cfu^{amp^R}/ml para pGALD7ΔL (pVIIΔL), mientras que se usó el pGALD7 (pVII) no diluido (correspondiente a $2,0 \times 10^9$ y $1,1 \times 10^7$ cfu^{amp^R}/ml sin y con IPTG, respectivamente). El anti-M13^{HRP} es un control negativo en adsorción inespecífica de la detección del virión MAb para el antígeno y bloque.

Figura 20

ELISA específico de antígeno que compara la presentación funcional de scTCR (A) y scFv-anti-NIP (B) pVII con y sin secuencia señal (ΔL). Se llevó a cabo el ELISA como se describe en materiales y procedimientos usando volúmenes iguales en sobrenadante aclarado no diluido. El anti-M13^{HRP} es un control negativo en adsorción inespecífica de la detección del virión MAb para el antígeno y bloque. En (A), se usó el anticuerpo GB113 específico de clon para el receptor de linfocitos T 4B2A1 (Bogen et al, PMID: 1700755) como antígeno sustituto que sustituye el ligando afín I-E^d/λ2³¹⁵ al scTCR Vαβ4B2A1 (Løset et al, PMID: 17925331).

Figura 21

(A) valoraciones de fagémidos del scTCR Vαβ4B2A1 y el scFv anti-NIP (SEQ ID NO: 27) presentadas de pGALD7ΔL y pGALD7 usando un rescate de fagémido estándar como se describe en materiales y procedimientos. (B) proporciones de fagémido-a-fago colaborador de las mismas muestras que en (A).

Figura 22

(A) Densidad celular de los respectivos cultivos de *E. coli* al final de la medida de protocolo de empaquetado del virión como densidad óptica (DO) a A_{600nm}. De forma notable, todos los cultivos se iniciaron a una densidad idéntica de A_{600nm} 0,025 y se superinfectaron con M13K07 a MOI5 cuando se alcanzó A_{600nm} 0,1. A continuación, se dejó que prosiguiera el empaquetado ON a 30 °C antes de medir la DO del cultivo final.

Descripción detallada de la invención

Cabe destacar que los modos de realización y las características descritas en el contexto de uno de los aspectos de la presente invención también se aplica a los otros aspectos de la invención.

Aquí se presenta un concepto novedoso, en el que la proteína de la cubierta estructural pVII del virión del fago filamentoso fago se altera genéticamente de modo que la versión modificada codifique una marca de secuencia N terminal. Dependiendo de qué tipo de marca esté fusionada a pVII, a los viriones se les da la propiedad de detección de marca específica, así como de vías de purificación e inmovilización flexibles como propiedad inherente del sistema. El enfoque es directamente compatible con todos los sistemas de presentación de pIII y pVIII existentes donde se aplican vectores de fagémidos basados en genoma de fagos, incluyendo una nueva generación de colección en pVII. Por lo tanto, el concepto ofrece una expansión sin precedentes de la ya alta versatilidad de la tecnología de presentación en fagos.

El informe actual muestra por primera vez que el genoma del fago filamentoso tolera una modificación de péptido N terminal, que no alberga una secuencia señal, de pVII sin interferir con la viabilidad y funcionalidad del fago. Esto era cierto para ambos genomas M13K07 (SEQ ID NO: 31), VCSM13 (SEQ ID NO: 32) y fUSES (SEQ ID NO: 30) así como los fagémidos y puesto que la secuencia y la conservación fenotípica entre las diversas cepas de fago son muy altas, esto se aplica de la forma más probable a todos los fagos filamentosos.

Una de las fusiones pVII elegidas fue una versión optimizada de codón procariota de la AviTag, un péptido que es el sustrato BirA más eficaz informado hasta la fecha. Combinando esta presentación peptídica de pVII con la presentación de pIII, se muestra que se producen viriones biespecíficos. Esto es cierto para el vector basado en el genoma de fago fUSE5 (SEQ ID NO: 30) y de la presentación basada en fagémidos cuando se rescata con un fago colaborador modificado M13K07. Es fácilmente concebible que esta naturaleza biespecífica se pueda usar en combinación con la presentación de pVIII. En particular en el caso de viriones derivados de fagémidos, el nivel de biotinylación endógena era muy bajo.

Sin embargo, si son deseables niveles altos de biotinylación, esto se puede lograr fácilmente por biotinylación *in vitro* de este virión, así como por el uso de biotinylación *in vivo* por medio del uso de la cepa AVB100FmkII de *E. coli* F-positiva novedosa.

5 Por tanto, el concepto actual permite la combinación de tecnología de avidina-biotina (y otros sistemas de captura) tanto con plataformas de presentación en fagos dominantes (fago y fagémido) como con sistemas de presentación (pIII y pVIII). Permite una unión específica de sitio, controlada, del resto de biotina a la partícula de fago sin interferir con la fusión de pIII y/o pVIII, garantizando por tanto la preservación de la funcionalidad. El sistema es directamente compatible con las plataformas existentes sin modificaciones adicionales, dando solo la opción de uso o no.

10 En conclusión, los viriones tanto derivados de genoma como derivados de fagémido pueden tolerar la modificación de pVII, proporcionando viriones con funcionalidad y viabilidad aparentemente normales.

Proteína de fusión pVII

15 En un aspecto, la presente invención proporciona un genoma de fago o un fagémido que comprende un ácido nucleico que codifica una proteína de fusión que comprende la proteína de la cubierta menor de fago filamentoso pVII, comprendiendo dicha proteína de fusión una fusión de un péptido exógeno al extremo N terminal de pVII. Una proteína de fusión de este tipo es útil, por ejemplo, en el contexto de presentación en fagos.

20 Cuando se hace referencia a un péptido exógeno, lo que quiere decir es un péptido que no es parte originalmente de la proteína pIII, pVII o pVIII con o sin cualquier aminoácido enlazador al extremo N terminal de la parte de aminoácido de pIII, pVII o pVIII de la proteína de fusión. En un modo de realización preferente, la proteína de fusión no comprende una secuencia señal N terminal. Como se usa en el presente documento, el término péptido engloba tanto péptidos cortos, polipéptidos, proteínas como fragmentos de los mismos.

El término proteína pIII se refiere a la secuencia de aminoácidos divulgada en SEQ ID NO 2.

30 En un modo de realización, la proteína pIII comprende la secuencia de aminoácidos con una identidad de secuencia de al menos un 80% con la de SEQ ID NO 2, al como una identidad de un 80 %, una identidad de un 81 %, una identidad de un 82 %, una identidad de un 83 %, una identidad de un 84 %, una identidad de un 85 %, una identidad de un 86 %, una identidad de un 87 %, una identidad de un 88 %, una identidad de un 89 %, una identidad de un 90 %, una identidad de un 91 %, una identidad de un 92 %, una identidad de un 93 %, una identidad de un 94 %, una identidad de un 95 %, una identidad de un 96 %, una identidad de un 97 %, una identidad de un 98 %, o una identidad de un 99 %.

El término pVIII proteína de fusión se refiere a una proteína pVIII, o fragmentos de la misma, fusionada a un péptido exógeno.

40 El término proteína pVIII se refiere a la secuencia de aminoácidos en SEQ ID NO 3.

45 En un modo de realización, la proteína pVIII comprende la secuencia de aminoácidos con una identidad de secuencia de al menos un 80% con la de SEQ ID NO 3, al como una identidad de un 80 %, una identidad de un 81 %, una identidad de un 82 %, una identidad de un 83 %, una identidad de un 84 %, una identidad de un 85 %, una identidad de un 86 %, una identidad de un 87 %, una identidad de un 88 %, una identidad de un 89 %, tal como una identidad de un 90 %, una identidad de un 91 %, una identidad de un 92 %, una identidad de un 93 %, una identidad de un 94 %, una identidad de un 95 %, una identidad de un 96 %, una identidad de un 97 %, una identidad de un 98 %, o una identidad de un 99 %.

50 El término proteína pVII se refiere a la secuencia de aminoácidos en SEQ ID NO 1.

55 En un modo de realización, la proteína pVII comprende el aminoácido con una identidad de secuencia de al menos un 80% con la de SEQ ID NO 1, al como una identidad de un 80 %, una identidad de un 81 %, una identidad de un 82 %, una identidad de un 83 %, una identidad de un 84 %, una identidad de un 85 %, una identidad de un 86 %, una identidad de un 87 %, una identidad de un 88 %, una identidad de un 89 %, una identidad de un 90 %, una identidad de un 91 %, una identidad de un 92 %, una identidad de un 93 %, una identidad de un 94 %, una identidad de un 95 %, una identidad de un 96 %, una identidad de un 97 %, una identidad de un 98 %, o una identidad de un 99 %.

Identidad de secuencia

Como se define comúnmente "identidad" se define aquí como identidad de secuencia entre genes o proteínas al nivel de nucleótido o aminoácido, respectivamente.

65 Por tanto, en el presente contexto "identidad de secuencia" es una medida de identidad entre proteínas al nivel de aminoácido y una medida de identidad entre ácidos nucleicos a nivel de nucleótido. La identidad de secuencia de

proteínas se puede determinar comparando la secuencia de aminoácidos en una posición dada en cada secuencia cuando se alinean las secuencias. De forma similar, la identidad de secuencia de ácidos nucleicos se puede determinar comparando la secuencia de nucleótidos en una posición dada en cada secuencia cuando se alinean las secuencias.

5 Para determinar el porcentaje de identidad de dos secuencias de aminoácidos o de dos secuencias de ácidos nucleicos, se alinean las secuencias con fines de comparación óptima (por ejemplo, se pueden introducir huecos en la secuencia de una primera secuencia de aminoácido o de ácido nucleico para una alineación óptima con una segunda secuencia de aminoácido o de ácido nucleico). A continuación, se comparan los residuos de aminoácidos o nucleótidos en las posiciones de aminoácidos o de nucleótidos correspondientes. Cuando una posición en la primera secuencia está ocupada por el mismo residuo de aminoácido o 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 = $n.^{\circ}$ de posiciones idénticas/ $n.^{\circ}$ total de posiciones (por ejemplo, posiciones superpuestas) x 100). En un modo de realización, las dos secuencias son de la misma longitud.

Se pueden alinear manualmente las secuencias y contar el número de aminoácidos idénticos. De forma alternativa, la alineación de dos secuencias para la determinación del porcentaje de identidad se puede llevar a cabo usando un algoritmo matemático. Un algoritmo de este tipo se incorpora en los programas NBLAST y XBLAST de (Altschul et al. 1990). Las búsquedas de nucleótidos con BLAST se pueden realizar con el programa NBLAST, puntuación = 100, longitud de la palabra = 12, para obtener secuencias de nucleótidos homólogas a las moléculas de ácido nucleico de la invención. Las búsquedas de proteínas con BLAST se pueden realizar con el programa XBLAST, puntuación = 50, longitud de palabra = 3 para obtener secuencias de aminoácidos homólogas a una molécula de proteína de la invención. Para obtener alineaciones con huecos con fines de comparación, se puede utilizar el programa Gapped BLAST. De forma alternativa, se puede usar PSI-Blast para realizar una búsqueda iterada que detecte las relaciones distantes entre moléculas. Cuando se utilicen 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>. De forma alternativa, la identidad de secuencia se puede calcular después de que las secuencias se hayan alineado, por ejemplo, por el programa BLAST en la base de datos EMBL (www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST). En general, para la alineación se pueden usar los ajustes por defecto con respecto a, por ejemplo "matriz de puntuación" y "penalización por hueco". En el contexto de la presente invención, los ajustes por defecto BLASTN y PSI BLAST pueden ser ventajosos.

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

Proteínas plegadas

40 En un modo de realización preferente, el término péptido se refiere exclusivamente a proteínas plegadas tales como los dominios derivados de anticuerpos. El destinatario experto reconocerá que las proteínas plegadas pueden ser anticuerpos o fragmentos de los mismos, que cubren Fv, scFv, Fab, dominios individuales, dominio Z de proteína A (Affibody), anquirina o fragmentos de la misma, receptor de linfocitos T o fragmento del mismo, MHC clase I y II, fibronectina o fragmento de la misma, avímeros, anticalinas, dominios PDZ, IgNAR o fragmento del mismo, CTLA4 o fragmento del mismo, Imme7, Knotinas, GFP y otros fluoróforos biológicos codificados por genes.

En principio, se puede realizar una colección de cualquier cosa siempre y cuando se pueda presentar, por tanto, al más alto nivel sólo se puede separar entre algo que sólo tiene una configuración no estructurada, en comparación con una estructura ordenada, esto es, un pliegue.

50 En otro modo de realización preferente, el término péptido se refiere exclusivamente a péptidos cortos entre de 2 a 50 aa. En cierta extensión, un péptido helicoidal aleatorio corto será lo suficientemente largo para adoptar un pliegue secundario o terciario definido y por tanto, entra en la definición de dominio plegado. Obviamente, esto dependerá de la composición química, por tanto, un péptido de 20 aa aún será una espiral aleatoria, mientras que otro péptido de 20 aa puede estar plegado y por tanto entrar en la definición de dominio plegado.

En otro modo de realización preferente, la proteína de fusión pVII de la invención comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en pos. 1-33, 2-33, 3-33, 4-33 y 5-33 de SEQ ID NO:1.

60 SEQ ID NO:1 (MEQVADFDTIYQAMIQISVVLFCFALGIAGGQR) es la secuencia de aminoácidos de la proteína de cubierta estructural pVII del fago filamentoso (pVII natural). Lo más preferentemente, la proteína de fusión pVII comprende las posiciones 1-33 de SEQ ID NO:1.

Secuencia señal

65 Preferentemente, el péptido exógeno se fusiona directamente con o sin cualquier aminoácidos enlazador al extremo

N terminal de la secuencia pVII de la proteína de fusión. Aún en otro modo de realización preferente, la proteína de fusión pVII no comprende una secuencia líder N terminal.

5 El término "secuencia líder" se usa de manera intercambiable con los términos "péptido señal" y "secuencia señal", y se refiere a una secuencia de aminoácidos que dirige la proteína (de la que es parte la secuencia líder) al espacio de membrana periplásmica de bacterias gram negativas. Son ejemplos de secuencias líder usadas pelBss, OmpAss, TorAss, malEss, phoAss, lamBss, Blass, y DspAss, mglBss, sfmCss, tolBss y TorTss. Se sabe que dichas secuencias señal dirigen la proteína completa hacia la maquinaria secretora de *E.coli* que se sabe que incluye al menos la translocación dependiente de SRP, dependiente de SEC, dependiente de TatABC o dependiente de YidC
10 desde el citosol al espacio periplásmico (Baneyx et al. PMID: 15529165). Por tanto, el término secuencia señal N terminal se refiere a una secuencia señal que está en la parte N terminal de la proteína.

15 Las secuencias señal que albergan la propiedad de dirigir una proteína (de la que es parte) a la maquinaria secretora de *E. coli* y por lo tanto translocarla del compartimento citosólico al periplásmico se pueden identificar parcialmente por medio de firmas, o motivos, definidos por la propiedad química de su composición de aminoácidos.

20 Sin embargo, la variedad de la secuencia señal funcional existente es hasta el momento superior al conocimiento actual en su identificación, por tanto el estado de la técnica actual al definir un péptido como una secuencia señal afín se realiza típicamente por medio de extracción de datos usando datos basados en el conocimiento basados como moldes por, por ejemplo, metodología heurística o red neuronal. Existen varias de dichas herramientas disponibles para la comunidad por medio de canales de acceso abiertos como los actuales, tales como SignalP, PPSEARCH de PROSITE (EMBL-EBI), SecretomeP, TatP.

25 El reto es aún mayor con la clase de proteínas secretoras, en el sentido de que se exportan del compartimento citosólico, que se desvía de las normas de modo que no se puede identificar ningún motivo de secuencia señal, pero a través de la extracción de datos también se pueden definir aquí características de secuencia señal u obtener la probabilidad de la capacidad secretora de la proteína eucariota en cuestión. Hasta el momento, no existe dicha herramienta para los taxones procariotas.

30 El único procedimiento actualmente disponible que identificó de forma irrevocable un péptido como secuencia señal es, por tanto, por medios experimentales para validar la propiedad de un péptido para establecer si es o no una secuencia señal real. También es evidente que se puede realizar ingeniería en dichos péptidos de modo que se puedan alterar las posiciones de aminoácidos dadas en la secuencia señal, mientras se retiene su función como péptido señal, por funcionalidad nativa, o bien por funcionalidad alterada, tal como un incremento en la capacidad de transporte. También se puede emplear delección o adición de aminoácidos. De hecho, dichos análisis e ingeniería se han realizado con la secuencia señal de Ff pVIII, g8pss dirigiendo la ruta Sec, y TorAss dirigiendo la ruta Tat. En especial, los resultados de Shen et al. pueden servir como directrices bien fundadas para la ingeniería de mutantes funcionales, pero alterados, de la secuencia señal de pIII y de la secuencia señal de la pectato liasa bacteriana.

40 La funcionalidad de una secuencia señal también se puede subdividir en las dos propiedades siguientes:

45 1. Dirigir una proteína (de la que es parte) a la maquinaria secretora de *E. coli* y de este modo translocarla del compartimento citosólico al periplásmico y en el transcurso de este proceso, separar proteolíticamente desde la proteína restante por proteasas específicas, tales como peptidasa señal de lipoproteína, o peptidasas líder.

2. Dirigir una proteína (de la que es parte) a la maquinaria secretora de *E. coli* y de este modo translocarla desde el compartimento citosólico al periplásmico y después de la translocación permanecer aún como parte de la proteína.

50 Aunque la gran mayoría de las secuencias señal se asignan a la situación 1) dada anteriormente, queda claro que estas proteínas se pueden modificar fácilmente a la situación 2). Por lo tanto, cualquier secuencia señal actualmente conocida, por ejemplo, una pelBss mutante y otra que pertenezca originalmente a la situación 1), pero que se alteran a la situación 2), aún se considera una secuencia señal afín.

55 Además, se puede concebir que se altere una secuencia señal de la situación 1) a la situación 2), o bien que se elija directamente una secuencia señal que se asigne a la situación 2) y a continuación, después de la translocación retire la secuencia señal. Esto se puede realizar por proteasas endógenas del huésped y/o bien en el caso de, por ejemplo, presentación en fagos, cuando la proteína se fusiona con una proteína de la cápside. A continuación, se podría modificar en la región apropiada de la secuencia señal, o la proteína de la que es parte, un sitio de proteasa artificial, de modo que se puede realizar una escisión definida. Aquí se pueden prever dos tipos diferentes de sitios de proteasa elegidos:

60 A. El sitio de proteasa no escinde la proteína de interés, sólo el sitio predicho, tal como, por ejemplo, el sitio carboxipeptidasa A, o proteasa 3C de rinovirus en combinación con anticuerpos u otras estructuras de interés, tales como moléculas del complejo principal de histocompatibilidad o receptores de linfocitos T. Usando este enfoque, se puede prever, por ejemplo, la presentación en fagos de la proteína de interés por el uso de una secuencia señal que se asigna a la situación 2) anterior y antes de usar en la selección, etc, retirar artificialmente el péptido señal para

obtener la funcionalidad y homogeneidad para la fusión de cápside.

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

5 Ambas situaciones aún se considerarán como presentación de fagos dependiente de secuencia señal.

Complementación natural

10 Hasta ahora, se que las fusiones de pVII sin secuencia señal no eran funcionales con respecto a la producción sostenida de partículas de fago (Endeman et al, 1995; Gao et al, 1999). Por lo tanto, las proteínas de fusión pVII con un péptido exógeno fusionado directamente a su extremo N terminal tenían que estar más complementados por la proteína wt pVII desde un segundo gen en el genoma del fago o bien por donación de un fago colaborador.

15 El término natural, a veces escrito "wildtype" o wt, es la forma típica de un organismo, cepa, gen, o característica como se produce en la naturaleza. Natural (wildtype) se refiere al fenotipo más común en la población natural. Natural también se refiere al alelo en cada locus requerido para producir el fenotipo natural. Natural es el estándar de referencia para el genotipo y el fenotipo. En biología, se refiere específicamente a la diferencia ente un organismo que se produce de forma natural, y uno que se ha mutado deliberadamente. Mutagénesis dirigida a sitio es la técnica de búsqueda que permite la mutación de nucleótidos específicos en la secuencia génica de un gen natural. Las
20 proteínas naturales se escriben como wt-(nombre de la proteína) por ejemplo una proteína pVII natural se escribe wt pVII, wt-pVII o pVII natural.

Los presentes inventores han descubierto que dichas proteínas de fusión pVII son, de hecho funcionales y no necesitan complementarse necesariamente por la proteína wt pVII.

25 Por tanto, un aspecto de la invención se refiere a proteínas de fusión pVII que son funcionales en una presentación en fagos sin complementación por la proteína wt pVII.

30 Kwasnikowski et al. informaron de proteínas de fusión pVII que no tenían que complementarse por la proteína pVII natural. Sin embargo, las proteínas de fusión pVII de Kwasnikowski et al., comprendían un péptido señal en el extremo N terminal del péptido exógeno. Se asumió que dicho péptido señal era necesario para dirigir la proteína de fusión pVII N terminal en el espacio periplásmico y evitar su acumulación en el citoplasma.

35 La ausencia de un péptido señal en el extremo N terminal de la proteína de fusión pVII tiene varias ventajas. Normalmente, los péptidos señal se retiran proteolíticamente y a menudo este proceso no se completa, lo que genera extremos N terminales diferentes de la proteína procesada cuando se expresa una colección de proteínas, introduciendo así una heterogeneidad aleatoria en el sistema, que puede afectar a la funcionalidad de las proteínas que aún albergan el péptido líder lo que da lugar a errores no deseados en la proteína procesada. Esto se previene cuando no está presente ningún péptido señal.

40 Además, cuando se presenta una colección de péptidos, algunos de los péptidos pueden evitar o afectar la proteólisis, que a su vez afectará a la actividad de la proteína presentada y por tanto a la diversidad de la colección funcional. Otra ventaja sorprendente de no incluir un péptido señal es que la viabilidad y la funcionalidad del fago no se ven afectadas, al contrario que cuando se usa un péptido señal. Kwasnikowski et al., informaron de una valoración reducida para fagos con la proteína de fusión pVII que comprende una secuencia líder (péptido señal) en los extremos N terminales.

Péptido exógeno

50 En un modo de realización, el péptido exógeno es una marca de afinidad que se une a un objetivo predeterminado. La marca de afinidad se puede unir, por ejemplo, a un anticuerpo predeterminado. Los pares de marcas de afinidad y objetivos predeterminados son bien conocidos para el experto en la técnica.

55 Las marcas de proteínas son secuencias peptídicas injertadas genéticamente sobre una proteína recombinante. A menudo, estas marcas se pueden retirar por agentes químicos o por medios enzimáticos, tales como proteólisis o empalme de inteína. Las marcas se unen a proteínas para varios fines.

Las marcas de afinidad se añaden a las proteínas de modo que se pueden purificar a partir de su fuente biológica en
60 bruto usando una técnica de afinidad.

Una característica del uso de una marca FLAG N terminal no procesada es que tiene su residuo formil-Met intacto y por tanto permite la interacción dependiente de Ca²⁺ con el anti-FLAG MAb M1. Por tanto, el virión se puede unir (es decir, inmovilizar) en M1 y liberar, simplemente quelando del catión, por ejemplo, por EDTA, ofreciendo de este modo una elución muy leve sin pH extremo que desnaturalice la(s) fusión/fusiones heteróloga(s). Al usar el M1
65 también significa que se puede usar el sistema con otras fusiones de FLAG presentes (C terminal o N terminal procesado, interno) sin interferencia ya que no se reconocen por M1, o manteniendo simplemente la [Ca²⁺] baja.

En un modo de realización preferente, el péptido exógeno de la proteína de fusión pVII se selecciona del grupo que consiste en Avitag (SEQ ID NO:A), marca FLAG (SEQ ID NO:9), marca HIS (SEQ ID NO:12), marca HAT, marca HA, marca c-Myc, marca Strep, marca V5ag, anticuerpo o fragmento del mismo, receptor de linfocitos T o fragmento del mismo, MHC clase I y II, anquirina, IgNAR o fragmento del mismo, fibronectina o fragmento de la misma, dominio Z de proteína A, CTLA4 o fragmento del mismo, ImmE7, GFP y otros fluoróforos biológicos codificados por genes.

SEQ ID NO:2 (MSGLNDIFEAQKIEWHE) es una secuencia de sustrato de la secuencia del enzima BirA de E.coli que permite el acoplamiento específico de sitio mediado por enzima de un resto de biotina a la secuencia del sustrato. Por tanto, se combinan los recursos de la tecnología de presentación en fagos y la tecnología de avidina-biotina. Cualquier colección de fusión en la que la colección no se presente en pVII, por ejemplo, se puede fraccionar en primer lugar frente a un objetivo para la identificación miembros de la colección con alta afinidad y a continuación inmovilizarse usando unión de biotina a avidina, o una matriz de tipo avidina por medio de la inclusión adicional de la fusión de pVII en los viriones. De forma alternativa, cualquier colección de fusión en la que la colección no esté en pVII, por ejemplo, en primer lugar se puede inmovilizar, de forma aleatoria o bien en una matriz predefinida en una matriz de avidina o de tipo avidina, de manera direccional, controlada seguido de rastreo del objetivo tal como, por ejemplo, en SEREX, por medio de la inclusión adicional de la fusión de pVII en los viriones. De forma similar, se puede detectar cualquier miembro de una colección de fusión pIII o pVIII de este tipo, en lote o bien como clones individuales, antes o después de la interacción del objetivo por el uso de cualquier complejo indicador de avidina o de tipo avidina, el término indicador en el presente documento describe, por ejemplo, especie de enzima, de ácido nucleico o fluoróforo sintético o biológico.

En esencia, la misma base que se indica para la AviTag, pero mientras que esta última da como resultado una inmovilización casi irreversible, la HIS6 permite una elución leve usando imidazol. La marca HIS es compatible con todas las matrices IMAC disponibles,

En otro modo de realización preferente, el péptido exógeno de la proteína de fusión pVII es un miembro de la colección. Una colección, 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. Dichas colecciones son de interés porque se pueden usar para identificar nuevos ligandos que se unen a un objetivo dado. Hay varias ventajas del uso de pVII para presentar una colección en comparación con colecciones presentadas usando pIII o pVIII. La presentación de pVII contiene los mismos recursos que la presentación con pIII con respecto a la direccionalidad y valencia, pero no afectará a la infectividad, un fenómeno que se sabe que se produce con la presentación de pIII, lo que introduce heterogeneidad no controlada y no deseada en el sistema, por ejemplo, en el rescate después de la selección de afinidad. Además, se puede lograr la presentación de pVII sin la necesidad de un péptido líder N terminal, lo que es un prerequisite para la presentación tanto de pIII como de pVIII. Finalmente, cualquier especie inmovilizada con el objetivo en la presentación de pIII requiere normalmente la alteración (normalmente por elución competitiva, o de pH alto o bajo) de este enlace objetivo-fago. Por ejemplo, se sabe que esto dificulta gravemente la recuperación de fijadores estables o de alta afinidad en la presentación de pIII. Como la pIII requerida para infección está inalterada y fácilmente disponible para interacciones alternativas en la presentación de pVII incluso después de la interacción fago-objetivo, esto elimina completamente la necesidad de alterar el enlace, por ejemplo por elución ácida, ya que los fagos inmovilizados retienen toda la infectividad y por tanto se pueden recuperar simplemente por infección mientras está unido al objetivo.

45 Ácido nucleico

Un segundo aspecto de la invención es un ácido nucleico que codifica la proteína de fusión de la invención. El ácido nucleico puede estar comprendido dentro de un genoma de fago o dentro de un fagémido.

El término ácido nucleico se refiere a una macromolécula compuesta de cadenas de nucleótidos monoméricos. En bioquímica, estas moléculas portan información genética o forman estructuras dentro de las células. Los ácidos nucleicos más comunes son ácido desoxirribonucleico (ADN) y ácido ribonucleico (ARN). Además, el término ácidos nucleicos incluye ácidos nucleicos artificiales tales como ácido péptidonucleico (APN), morfolino y ácido nucleico bloqueado (ANB), así como ácido nucleico glucólico (ANG) y ácido nucleico treósico (ANT). Cada uno de estos se distingue de ADN o ARN natural por cambios en el esqueleto de la molécula.

Un fagémido o fásmidio es un tipo de vector de clonación desarrollado como un híbrido del fago filamentoso Ff y plásmidos para producir un vector que se puede propagar como un plásmido, y también se empaqueta como ADN monocatenario en partículas víricas. De forma similar a un plásmido, se puede usar un fagémido para clonar fragmentos de ADN e introducirse en un huésped bacteriano por una variedad de técnicas (transformación, electroporación). Sin embargo, la infección de un huésped bacteriano que contiene un fagémido con un fago 'colaborador', por ejemplo VCSM13 o M13K07, proporciona los componentes víricos necesarios para permitir la replicación del ADN monocatenario y el empaquetado del ADN de fagémido en las partículas de fago.

65 Fago filamentoso

Un tercer aspecto de la invención es un fago filamentosos que comprende la proteína de fusión de la invención. El fago filamentosos puede comprender un genoma de fago genoma o un fagémido.

5 Fago, a menudo denominado bacteriófago, quiere decir aquí un virus que infecta, que se replica y que se secreta a partir de una bacteria. Un bacteriófago filamentosos, o fago filamentosos, es un fago con un genoma de ADN monocatenario (genoma de ADNmc) que se empaqueta con proteínas de la cubierta del fago. La partícula de fago filamentosos secretada tiene fenotípicamente una estructura filamentosos.

10 El término fago filamentosos, como se usa en el presente documento, engloba tanto viriones derivados de genoma del fago como viriones derivados de fagémido.

En un modo de realización, el fago filamentosos no comprende un gen que codifique la proteína de fusión, ya que la proteína de fusión puede haber sido donada por un fago colaborador.

15 El término fago colaborador se refiere a un virus que ayuda a un virus defectuoso separado y no relacionado 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 al virus defectuoso le faltan y que necesita para formar sus viriones de ciclo de vida completo que contienen el fagémido.

20 En otro modo de realización, el fago filamentosos comprende un ácido nucleico que codifica la proteína de fusión de la invención. El fago filamentosos puede comprender un genoma de fago genoma o un fagémido. Particularmente preferente es un fago que comprende un genoma de fago que comprende el ácido nucleico que codifica la proteína de fusión de la invención.

25 Aún en otro modo de realización, el fago filamentosos de la invención comprende además un gen que codifica la proteína wt pVII y/o wt pVII. Es decir, el número de proteínas de fusión presentadas por el fago filamentosos se puede ajustar modulando la proporción de proteína wt pVII con relación a proteína de fusión pVII. Un sistema de este tipo también se puede denominar sistema 77 o sistema 7+7 dependiendo de si la proteína wt pVII se dona desde el fago colaborador (7+7) o desde un segundo gen en el genoma del fago (77).

Aún en otro modo de realización, el fago filamentosos no comprende el gen de wt pVII y/o la proteína wt pVII. Es decir, el fago filamentosos sólo comprende proteína de fusión pVII y no comprende proteína wt. pVII.

35 En un modo de realización preferente, el fago filamentosos comprende además una proteína de fusión pIII o una proteína de fusión pVIII. Por ejemplo, se puede presentar una colección en pIII o pVIII y la proteína de fusión pVII se puede usar para purificación por afinidad, inmovilización o detección usando, por ejemplo, avidina o una matriz de tipo avidina. Preferentemente, el fago filamentosos comprende solamente proteína pIX en forma natural.

40 Un cuarto aspecto de la invención es una colección de fagos filamentosos de la invención, presentando dichos fagos filamentosos péptidos o proteínas exógenas como fusiones para pIII, pVII o pVIII.

45 Una colección es una colección de fagos filamentosos que presentan péptidos o proteínas como parte de una o más proteínas de cubierta de fago filamentosos. Dichas colecciones pueden comprender dos o más fagos que presentan diferentes péptidos o proteínas.

En un modo de realización preferente, los péptidos se presentan simultáneamente en pVII y pIII o bien pVIII.

50 En otro modo de realización preferente, el péptido exógeno presentado en pVII se selecciona del grupo que consiste en Avitag (SEQ ID NO:4), marca FLAG (SEQ ID NO:9), marca HIS (SEQ ID NO:12), marca HAT, marca HA, marca c-Myc, marca Strep, marca V5, anticuerpo o fragmento del mismo, receptor de linfocitos T o fragmento del mismo, anquirina, IgNAR o fragmento del mismo, fibronectina o fragmento de la misma, MHC clase I y II, dominio Z de proteína A, CTLA4 o fragmento del mismo, ImmE7, GFP y otros fluoróforos codificados por genes biológicos. En este modo de realización, los péptidos presentados en pIII o pVIII son preferentemente miembros de colección. En un modo de realización alternativo, los miembros de la colección se presentan en pVII, mientras que pIII o pVIII presenta un péptido exógeno seleccionado del grupo que consiste en Avitag (SEQ ID NO:4), marca FLAG (SEQ ID NO:9), marca HIS (SEQ ID NO:12), marca HAT, marca HA, marca c-Myc, marca Strep, marca V5, anticuerpo o fragmento del mismo, receptor de linfocitos T o fragmento del mismo, MHC clase I y II, anquirina, IgNAR o fragmento del mismo, fibronectina o fragmento de la misma, dominio Z de proteína A, CTLA4 o fragmento del mismo, ImmE7, GFP y otros fluoróforos codificados por genes biológicos.

Sistema de presentación en fagos

65 Un quinto aspecto de la invención es un sistema de presentación en fagos que comprende un fagémido y un fago colaborador, en el que el fago colaborador comprende un ácido nucleico que codifica la proteína de fusión pVII de la invención.

5 Sistema de presentación en fagos, técnica de presentación en fagos, tecnología de presentación en fagos o simplemente presentación en fagos se refiere a un procedimiento para el descubrimiento y estudio de las interacciones proteína-proteína, proteína-péptido y proteína-ADN que utiliza bacteriófago para conectar proteínas con la información genética que las codifica.

Presentación de proteína o proteína presentada se refiere a una proteína fusionada con una proteína de cubierta de fago que es accesible para la detección o inmovilización por un ligando.

10 Un sexto aspecto de la invención es un sistema de presentación en fagos que comprende un fagémido y un fago colaborador, en el que el fagémido comprende un ácido nucleico que codifica la proteína de fusión pVII de la invención.

Kits

15 Un séptimo aspecto de la invención es un kit que comprende un sistema de presentación en fagos compuesto de un fagémido y un fago colaborador, en el que el fagémido comprende el ácido nucleico que codifica la proteína de fusión pVII de la invención. El kit debe incluir un fagémido con un gen que codifica pVII con un sitio de clonación múltiple de forma N-terminal en la región codificante y un fago colaborador (por ejemplo M13K07, VCSM13 u otro).

20 El kit se debe complementar con protocolos para infección, expresión, inmovilización, selección y detección de clones de fago. Los kits también se deben acompañar con las recetas necesarias para los tampones y los medios para realizar los ensayos específicos.

25 Un kit se refiere aquí a una colección de reactivos para generar partículas de fago con proteínas de fusión individuales o biespecíficas como una colección de presentación en fagos o bien como una partícula de fago individual. Un kit puede incluir fagémidos, fagos colaboradores, cepas bacterianas y un protocolo con recetas para los reactivos y la descripción de ensayo. Se puede usar un kit para el desarrollo de reactivos de búsqueda, diagnóstico y terapéuticos.

30 Un octavo aspecto de la invención es un kit que comprende un sistema de presentación en fagos basado en genoma de fago, en el que el genoma de fago comprende un ácido nucleico que codifica la proteína de fusión pVII de la invención.

35 El kit debe incluir un vector de genoma de fago (M13K07, VCSM13, fUSE5 (SEQ ID NO: 30)) con un gen que codifica pVII con un sitio de clonación múltiple de forma N-terminal en la región codificante. El kit se debe complementar con protocolos para infección, expresión, inmovilización, selección y detección de clones de fago. Los kits también se deben acompañar con las recetas necesarias para los tampones y los medios para realizar los ensayos específicos.

40 Un noveno aspecto de la invención es un kit que comprende un fago colaborador para la producción de colecciones de fagémidos de fusión de pIII o clones de fagémidos de fusión de pIII individuales con una marca como fusión de pVII. El kit debe incluir un fago colaborador (M13K07, VCSM13) con un gen que codifica pVII con secuencia insertada que codifica a péptido corto adecuado para fines de captura y /o detección. El kit se debe complementar con protocolos para infección, expresión, inmovilización, selección y detección de clones de fago. Los kits también se deben acompañar con las recetas necesarias para los tampones y los medios para realizar los ensayos específicos.

50 Un décimo aspecto de la invención es un kit que comprende un vector de genoma de fago para generar una colección de genoma de fago para presentación de proteínas de fusión tanto en pIII como en pVII. Un kit de este tipo debe incluir un vector de genoma de fago (Ff) con genes que codifican tanto PIII como PVII con múltiples sitios de clonación de forma N terminal en cada una de las regiones codificantes. De forma alternativa, el kit debe contener un vector de genoma de fago con secuencia insertada de forma N terminal en pVII que codifica un péptido corto adecuado para captura y /o detección y un sitio de clonación múltiple de forma N terminal en pIII. El kit se debe complementar con protocolos para infección, expresión, inmovilización, selección y detección de clones de fago. Los kits también se deben acompañar con las recetas necesarias para los tampones y los medios para realizar los ensayos específicos.

Un aspecto de la divulgación es un procedimiento que comprende las etapas de

60 a. Proporcionar una colección de presentación en fagos biespecíficos, en la que los fagos comprenden un péptido presentado en una primera posición y una marca de afinidad en una segunda posición

b. Seleccionar la colección de presentación en fagos frente a un objetivo

65 c. Inmovilizar la colección de presentación en fagos frente a un grupo de captura de la marca de afinidad

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

Ejemplos

EJEMPLO 1. FAGOS COLABORADORES MODIFICADOS CON PÉPTIDOS FUSIONADOS A pVII.

5 Los fagos colaboradores modificados M13K07 (SEQ ID NO: 31) y VCSM13 (SEQ ID NO: 32), con FLAG-pVII, HIS6-pVII, y AviTag-pVII pueden mostrar un potencial muy amplio para expandir el uso de tecnología de presentación en fagos, pero es de crucial importancia que los péptidos de fusión no comprometan la funcionalidad del fago colaborador, por lo tanto la valoración de los fagos es un parámetro de verificación importante. Además, los péptidos fusionados a pVII deben ser accesibles para la posterior detección y / o inmovilización. Este ejemplo soporta el hecho de que ambos fagos colaboradores modificados con pVII puedan albergar una variedad de péptidos con fines de detección y / o inmovilización y que estos péptidos de fusión no afectan a la infectividad de los fagos.

15 Aunque los resultados preliminares de Endemann y Model (PMID: 7616570) indicaron que la proteína pVII de la cápside del fago filamentososo (Ff) no tolera las fusiones exógenas, posteriormente se demostró que tanto el péptido basado en fagémido (Gao et al (PMID: 10339535) como el basado en genoma de fago (Kwasnikowski et al (PMID: 16277988) y la presentación del dominio plegado se pueden permitir como fusiones N terminales para pVII. En ambos casos, se enfatiza que la clave para el éxito requirió la dirección periplásmica de la proteína de fusión añadiendo una secuencia señal procariota, o péptido líder, al extremo N terminal de la fusión, dirigiendo así la fusión a la ruta SEC del huésped de *E. coli*.

20 La presentación productiva de pVII sólo se ha mostrado previamente en el contexto de las fusiones N terminales codificadas en un fagémido que alberga un péptido líder N terminal garantizando el transporte de la pVII recombinante al compartimento periplásmico (Endeman et al, 1995; Gao et al, 1999).

25 Sin embargo, se sabe que antes de incorporarse en el virión, wt pVII se encuentra como proteína de membrana integral en la membrana interna del huésped de *E. coli* gram negativa, con su extremo N terminal orientado hacia el espacio periplásmico. Además, como está unida a esta membrana, la wt pVII madura retiene su grupo formilo amino terminal (Simons et al, PMID: 6945579), no parece procesarse de forma N terminal por, por ejemplo, las peptidasas líder periplásmicas, como es el caso con la gran mayoría de las proteínas dirigidas por secuencia señal que se encuentran fuera del compartimento citosólico (Baneyx y Mujacic, PMID: 15529165). Como no se puede identificar un motivo de tipo secuencia señal evidente en el pVII ORF, su modo de translocación desde el citosol al periplasma sigue siendo difícil de alcanzar, pero lo más probablemente no implica las cuatro maquinarias secretoras principales identificadas en *E. coli*, a saber, las rutas SEC, SRP y Tat y YidC (Baneyx y Mujacic, PMID: 15529165; Samuelson et al, PMID: 10949305). La estructura del virión de fago filamentososo se muestra en la figura 1.

Reactivos

40 Se prepararon todos los medios y tampones esencialmente como se describe en Sambrook et al (Molecular cloning: a laboratory manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press)). El anticuerpo anti-M13-HRP y los anticuerpos M2 y M5 se adquirieron de GE Healthcare Bio-Sciences AB (Uppsala, Suecia) y Sigma-Aldrich (Oslo, Noruega), respectivamente. La enzima de restricción (RE) se adquirieron de New England Biolabs (Ipswich, MA, EE.UU.) con la excepción de DpnI, que se obtuvo de Stratagene (LaJolla, CA, EE.UU.). Los oligos de ADN se adquirieron de MWG Biotech AG (Ebersberg, Alemania). Las perlas magnéticas de estreptavidina Dynabeads MyOne™ y las perlas magnéticas de Ni-NTA Talon™ se adquirieron ambas de Invitrogen (Oslo, Noruega). BSA y Tween 20 se adquirieron de Sigma-Aldrich (Oslo, Noruega). Las ADN polimerasas Pfu Ultra y Phusion se adquirieron de Stratagene (LaJolla, CA, EE.UU.) y Sigma-Aldrich (Oslo, Noruega), respectivamente. La TMB soluble fue de Chabiochem.

Cepas bacterianas, fago

50 Las cepas de *E. coli* XL1-Blue se adquirieron de Stratagene (LaJolla, CA, EE.UU.). El fago colaborador M13K07 se adquirió de GE Healthcare Bio-Sciences AB (Uppsala, Suecia) mientras que VCSM13 (SEQ ID NO: 32) se adquirió de Stratagene (LaJolla, CA, EE.UU.).

Diseño y mutagénesis *in vitro* de AviTag™-, HIS₆-, y FLAG-pVII

Se comparó el marco de lectura abierto (ORF) de la AviTag™ (N-MSGLNDIFEAQKIEWHE-C) con el uso de codón en cepas K12 de *E. coli* usando el servidor GCUA (<http://gcuu.schoedl.de/seqoverall.html>). Se unió una versión optimizada de codón procariota de la secuencia peptídica de AviTag™ (SEQ ID NO:4) de forma N terminal al pVII ORF por mutagénesis *in vitro* QuikChange™ de acuerdo con el protocolo de los fabricantes (Stratagene, LaJolla, CA, EE.UU.), usando el par de cebadores BirA-pVII_frwd/BirA-pVII_rev (5'-CCGGCTAAGTAACATGTCCGGCCTGAACGATATCTTTGAAGCGCAGAAAATTGAATGGCA TGAATGGAGCAGGTC-3'/5'-GACCTGCTCCATTTTCATGCCATTCAATTTTCTGCGCTTCAAAGATATCGTTCAGGCCGGAC ATGTTACTTAGCCGG-3') (SEQ ID NO:5 y SEQ ID NO:6, respectivamente). De la misma manera que se describe anteriormente, se unieron las versiones optimizadas del codón K12 de *E. coli* de la marca FLAG (N-DYKDDDDK-C)

(SEQ ID NO:9) y la marca HIS₆ (N-HHHHHH-C) (SEQ ID NO:12) de forma N terminal al pVII ORF usando los pares de cebadores FLAG-pVII-frwd/ (5'-CCGGCTAAGTAACATGGACTACAAAGATGACGATGACAAAATGGAGCAGGTTCG-3'/5'-CGACCTGCTCCATTTTGTATCGTCATCTTTGTAGTCCATGTTACTTAGCCGG-3') (SEQ ID NO:7 y SEQ ID NO:8, respectivamente) y HIS6-pVII-frwd/ (5'-CCGGCTAAGTAACATGCATCACCATCACCATCACCATGAGCAGGTTCG-3'/5'-CGACCTGCTCCATGTGATGGTGTGATGCATGTTACTTAGCCGG-3') (SEQ ID NO:10 y SEQ ID NO:11, respectivamente), respectivamente. Se verificaron las diversas construcciones por secuenciación de ADN (*in-house* ABI lab DNA sequencing core Facility, Dept. Molecular Biosciences, University of Oslo) en todos los casos. Para garantizar un fondo de vector limpio, se movió un fragmento *Bsr*GI/*Sna*BI RE que contenía la pVII modificada en el genoma de M13K07wt o bien VCSM13wt en sitios de RE compatibles usando técnicas estándar. Se introdujeron las construcciones de ADN en los diversos huéspedes de *E. coli* por electroporación. El diseño de cebador se basó en una alineación de secuencia de las secuencias M13K07 (secuencia de New England Biolabs) (SEQ ID NO:31) y VCSM13 (n.º de acceso de GenBank: AY598820) (SEQ ID NO:32) usando ClustalW. La secuencia de las secuencias mostradas AviTag™, HIS₆, y FLAG se muestran en la figura 2.

Preparación de partículas de fago

Se amplificaron los fagos de *E. coli* XL1-Blue transformado con las construcciones M13K07 (SEQ ID NO: 31), VCSM13 (SEQ ID NO: 32) esencialmente como se ha descrito (Scott y Smith, PMID: 1696028).

Captura de perlas de SA de viriones biotinilados

Se transfirieron 10 µl/perlas de estreptavidina tube™ a tubos de 1,5 ml limpios y se añadieron 500 µl de BSA al 2 % en PBS (p/v). Asimismo, se transfirieron 250 µl de sobrenadante aclarado o la cantidad apropiada de fagos a tubos de 1,5 ml y se complementaron con 250 µl de BSA al 2 %. A continuación, se incubaron los tubos durante 1 h a temperatura ambiente (TA) en una rueda giratoria. A continuación, se lavaron las perlas 3x inmovilizando las perlas en primer lugar por el uso de una rejilla magnética de tubos Dynal. Se desechó el sobrenadante y se añadieron 0,5 ml de PBS que contenía Tween 20 al 0,05 % (PBST) a cada tubo. Se sacaron los tubos fuera de la rejilla y se agitaron con vórtex brevemente antes de reintroducirlos en la rejilla. De nuevo se aclaró el sobrenadante y se repitió el lavado dos veces. Se retiraron los tubos de la rejilla y se añadieron 250 µl del fago bloqueado y se añadieron 250 µl de PBST a cada tubo. A continuación, se incubaron los tubos durante 1,5h/TA en una rueda giratoria. Se lavaron los tubos 3x en PBST como se describe anteriormente. A continuación, se añadieron 0,5 ml de PBST que contenía anti-M13 MAb-HRP (1:2000) a cada tubo y se incubaron los tubos durante 1h/TA en una rueda giratoria. Se lavaron los tubos 3x en PBST como se describe anteriormente. A continuación, se añadieron 0,5 ml de ABTS a cada tubo y se dejaron los tubos en la mesa durante 30 min, antes de colocarlos en la rejilla magnética y se transfirieron 100 µl de sobrenadante a cintas de ELISA Maxisorp (Nunc, Roskilde, Dinamarca). A continuación, se midió la absorbancia a A_{405nm} usando un aparato lector de ELISA TECAN.

Ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas de captura de fago (ELISA).

Se absorbieron los anticuerpos M2 y M5 en pocillos de placa de microvaloración MaxiSorp™ (Nunc, Roskilde, Dinamarca) en concentraciones de 2,5 a 5 µg/ml en PBS, pH 7,4 durante la noche a 4 °C. Se bloquearon los pocillos con leche desnatada al 2 % en PBS (p/v) durante 1 h a TA, a continuación se añadieron las preparaciones de viriones y se dejó que reaccionara durante de 1 a 2 h a TA antes de que se detectaran los viriones capturados con anti-M13-HRP (1:5,000) durante 1 h a TA. Entre cada etapa, se lavaron los pocillos 3x con PBST. Se desarrollaron los pocillos con sustrato ABTS y se leyó la absorbancia a A_{405nm} después de 30 min.

Resultados

A - Valoración de fagos colaboradores.

Se inocularon 16 ml de 2x YT con un cultivo recién preparado de XL1-Blue y se incubó a 37 °C/250 rpm a una A_{600nm} 0,4 -0,8. Se transfirieron 10 µl de cada preparación de fago diluido a una placa de microvaloración de 96 pocillos. Se transfirieron 190 µl del cultivo XL1-Blue a cada pocillo con los diluyentes del fago. Se incubó la placa durante 50 min/37 °C. Se cubrió con la membrana BA82/20 una placa de agar LB-kan, se manchó con un volumen de 3 µl/muestra la membrana y se incubó la placa a 37 °C/ON. Se contaron las colonias (fig. 3).

B - Accesibilidad y funcionalidad de los péptidos insertados Avitag:

La enzima BirA es una acetil-CoA-carboxilasa y se encuentra de forma endógena en todas las *E. coli*. De hecho, se ha demostrado que la introducción de AviTag en el contexto de fago en dichas células da como resultado un pequeño nivel (~7 %) de biotinilación dirigida por BirA endógena (Sholle et al, PMID: 16628754). Para probar si en realidad la modificación de pVII N terminal era o no funcional en los viriones que se ensamblaron y funcionaron como sustrato enzimático para BirA, se sometió a prueba si los viriones resultantes se podían capturar a partir de

sobrenadante en bruto usando perlas magnéticas recubiertas con SA.

Captura de M13K07-AviTag pVII por perlas de estreptavidina Dynal.

- 5 Se emplearon dos fagos en este ensayo: M13K07-AviTag que se biotiniló *in vivo* por la BirA- endógena del huésped y M13K07wt. El resultado mostró claramente una captura de SA específica, mientras que el M13K07 (SEQ ID NO: 31) no se unió. Por tanto, la fusión AviTag-pVII, de hecho, debe ser funcional en el sentido de que ambos se acomodan al virión como wt pVII, mientras que la AviTag N terminal es accesible a la enzima BirA y se reconoce como sustrato para biotinilación (fig. 4).

10

Marca FLAG

- 15 Se realizaron ensayos ELISA para mostrar la accesibilidad de la marca FLAG como fusión de pVII en M13K07 (SEQ ID NO: 31) por la captura de fagos por dos anticuerpos anti-FLAG, M2 y M5. En el ensayo se incluyeron M13K07 natural, M13K07-His y M13K07-AviTag (fig.5).

Marca His

- 20 Se sometieron a prueba tanto M13k07-HIS6 como VCSM13-HIS6 para determinar la unión específica a perlas DynalTalon (matriz IMAC).

- 25 En resumen, se bloquearon las perlas Talon por incubación con BSA al 2 % durante 30 minutos con rotación. Se lavaron las perlas y se añadieron 250 µl de sobrenadante de fago bloqueado con BSA combinado para valoración (correspondiente a 2×10^{10} cfu^{kanR}/ml) y se incubaron adicionalmente durante 30 min/TA en una rueda giratoria. Después de lavar las perlas en PBST, se añadió anti-M13 MAb-HRP (diluido 1:2000) a cada tubo y se incubaron adicionalmente los tubos durante 45 min/TA en una rueda giratoria. Después del lavado, se añadió ABTS a cada tubo y se incubó 15 min a TA, antes de colocarlo en la rejilla magnética. Se transfirieron volúmenes de 100 µl de cada solución a cintas de ELISA Maxisorp. Se midió la absorbancia a 405 nm usando un aparato lector de ELISA TECAN. El resultado es un claro indicativo de que los viriones que contienen HIS₆-pVII se unen preferentemente a perlas magnéticas de Ni-NTA. A pesar de las señales bajas, que se pueden superar por una optimización del ensayo, existe, de hecho una unión diferencial de los viriones afines con la matriz Ni-NTA. De las aplicaciones más atractivas de esta fusión pVII particular es la posibilidad de aprovecharse para la purificación de Ni-NTA en combinaciones con, por ejemplo, columnas de centrifugación, así como inmovilización específica de sitio, y por tanto direccional homogénea de las matrices Ni-NTA (fig. 6).

35

EJEMPLO 2. FUNCIONALIDAD DE FAGOS COLABORADORES MODIFICADOS EN EL EMPAQUETADO DE FAGÉMIDOS.

- 40 La promesa de la invención es el uso de fagos colaboradores modificados para el empaquetado funcional de fagémidos que presentan un dominio plegado en una proteína de la cubierta de fago distinta de pVII, preferentemente en pIII o pVIII. Los siguientes ejemplos respaldan que los fagos colaboradores modificados con diferentes péptidos fusionados a pVII pueden realizar el empaquetado de fagémido funcional y que estos fagémidos representan tanto la fusión del péptido pVII funcional así como los dominios empaquetados funcionales fusionados con sus proteínas de la cubierta pIII. De esta manera, los ejemplos también sirven para la presentación biespecífica usando fagémidos.

45

Reactivos

- 50 Se prepararon todos los medios y tampones esencialmente como se describe en Sambrook et al (Molecular cloning: a laboratory manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press)). El anticuerpo anti-M13-HRP y los anticuerpos M2 y M5 se adquirieron de GE Healthcare Bio-Sciences AB (Uppsala, Suecia) y Sigma-Aldrich (Oslo, Noruega), respectivamente, mientras que los anticuerpos F23.2 y GB113 fueron un amable obsequio del profesor B. Bogen (Institute of Immunology, University of Oslo, Noruega). Las perlas magnéticas de estreptavidina Dynabeads MyOne™ se adquirieron de Invitrogen (Oslo, Noruega). BSA y Tween 20 se adquirieron de Sigma-Aldrich (Oslo, Noruega). El hapteno 2-feniloxazol-5-ona (phOx) conjugada con BSA se preparó esencialmente como se describe en otra parte (Makela et al, PMID; 722243).

55

Cepas bacterianas, fago y fagémidos

- 60 La cepa de *E. coli* XL1-Blue se adquirió de Stratagene (LaJolla, CA, EE.UU.). El fago colaborador M13K07 se adquirió de GE Healthcare Bio-Sciences AB (Uppsala, Suecia). El fagémido pSEX81 (SEQ ID NO:29), que alberga un scFv con especificidad frente a 2-feniloxazol-5-ona (phOx) acoplada a seroalbúmina bovina (BSA) se proporcionó amablemente por Affitech AS (Oslo, Noruega). El pFKPDN-scTCR Vαβ4B2A1 se describe en (Løset et al 2007, PMID: 17925331) (SEQ ID NO:28).

65

Preparación de partículas de fago

Se monitorizó el rescate de fagémido de *E. coli* XL1-Blue usando fagos colaboradores M13K07 y ensamblaje de virión por valoración en detalle como se ha descrito (Welschof et al, PMID: 9050877 y Koch et al, PMID: 11126120).

5 Ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas de captura de fago (ELISA)

Se absorbieron los Mab M2, M5, F23.2, GB113, phOx-BSA en pocillos de placa de microvaloración MaxiSorp™ (Nunc, Roskilde, Dinamarca) en concentraciones de 2,5 a 5 µg/ml en PBS, pH 7,4 durante la noche a 4 °C. Se bloquearon los pocillos con leche desnatada al 2 % o BSA al 2 % en PBS (p/v) durante 1 h a TA, a continuación se añadieron las preparaciones de viriones y se dejó que reaccionara durante de 1 a 2 h a TA antes de que se detectaran los viriones capturados con anti-M13-HRP (1:5,000) durante 1 h a TA. Entre cada etapa, se lavaron los pocillos 3x con PBST. Se desarrollaron los pocillos con sustrato ABTS y se leyó la absorbancia a A_{405nm} después de 30 min.

15 Resultados:

A - Empaquetado y valoración de fagémidos por M13K07 modificado.

Se emplearon dos fagémidos con diferentes dominios plegados, pFKPDNscTCR Vαβ4B2A1 pSEX-scFv anti-phOx , presentando scTcR y scFv como fusión de pIII, respectivamente. Se empaquetaron ambos con tres fagos colaboradores modificados y wt M13K07. En resumen, los cultivos durante la noche de los dos clones de fagémido se infectaron con fagos colaboradores modificados y wt. Después de la incubación, se centrifugó el cultivo y se resuspendió el sedimento bacteriano en medio YT con ampicilina y canamicina y se incubó adicionalmente ON a 30 °C. Se usaron sobrenadantes aclarados por centrifugación corriente abajo. Se infectó el XL-1 Blue de *E.coli* con diluciones de fagos y plaqueó sobre placas de ampicilina y canamicina para la valoración de fagémidos y fagos colaboradores, respectivamente. (Fig. 7)

Ambos fagémidos empaquetados muestran altas proporciones, lo que indica un empaquetado exitoso y funcional por los tres formatos de fagos colaboradores modificados de M13K07.

B - Funcionalidad de pVII donada por el fago colaborador en la presentación de pIII de fagémido:

Presentación de pVII-Avitag: Con respecto a la funcionalidad de AviTag-pVII, se llevó a cabo la captura en SA en perlas esencialmente como se describe en el ejemplo 1. Aunque las señales son bajas, existe, de hecho, una captura diferencial específica de los viriones que contienen AviTag-pVII (Fig 8). En comparación con el control positivo (inserción), queda claro que el nivel de biotilación menor en los viriones de fagémido que en los viriones de M13K07 cuando ambos albergan la fusión AviTag-pVII. Sin embargo, se sabe que la biotilación de AviTag endógena en el contexto de fago sólo está en el intervalo de un 7 % a 37 °C (Scolle et al PMID: 16628754). Mientras que, de hecho el M13K07-AviTag se empaqueta a 37 °C, el rescate de fagémido se realiza sólo a 30 °C, lo que sugiere fuertemente que la diferencia observada se debe a una menor actividad de BirA endógena *per se* a la menor temperatura. Por tanto, para un futuro uso, la eficacia de biotilación del virión se debe incrementar para aprovechar esta característica. Esto se puede realizar convenientemente por biotilación *in vitro* de los viriones, lo que debe dar una biotilación próxima al 100 % usando técnicas estándar (Scolle et al PMID: 16628754). De forma alternativa, se puede realizar una biotilación *in vivo* sobreexpresando la enzima BirA. Se sabe que mediante la supertransformación de *E. coli*, de modo que más del vector del genoma de fagémido o fago estén en la misma célula, puede dar lugar al empaquetado del plásmido estándar en el virión y por tanto da lugar a la pérdida de la unión genotipo-fenotipo. Este sería el caso si se sobreexpresara la BirA a partir de un plásmido. Para una evaluación de clon individual esto puede ser aceptable, pero cuando se combina el enfoque con repertorios combinatorios esto es inaceptable ya que puede dar lugar a la pérdida de variantes fenotípicas reparados durante la fijación.

De forma alternativa, se puede sobreexpresar la BirA a partir de una integración cromosómica como se ofrece por la cepa AVB100 derivada de MC1061 *E. coli* (Avidity, CO, EE.UU.). Sin embargo, esta cepa carece del plásmido F que codifica la estructura F de las pilosidades indispensable para el sistema fagémido. Sin embargo, AVB100 es directamente compatible con vectores basados en genoma de fago, que no necesitan complementarse con el fago colaborador. Para adoptar la cepa AVB100 para que también se ajuste a la presentación en fagos basada en fagémido en combinación con el fago colaborador M13K07 modificado, se hizo coincidir, por tanto, AVB100 con XL1-Blue por conjugación estándar (ejemplo 5).

Presentación de pVII-Flag:

Se realizaron ensayos ELISA para mostrar la accesibilidad de la marca FLAG como fusión de pVII en dos viriones derivados de fagémidos diferentes, pFKPDNscTCR Vαβ4B2A1 (Fig 9A) y pSEX-scFv anti-phOx (Fig 9B), capturando los viriones de fagémido por dos anticuerpos anti-FLAG, M2 y M5. En resumen, se recubrieron los anticuerpos en placas de ELISA ON a 4 °C. Se lavaron las placas y se incubaron las preparaciones de fagémido en las placas durante 2 horas a temperatura ambiente. Se lavaron las placas y se incubaron adicionalmente con anticuerpo conjugado con HRP anti-M13. Se desarrollaron las señales después del lavado de las placas añadiendo ABTS

soluble y con incubación a TA/30 min (Fig 9).

Se obtiene la reactividad específica de FLAG para los viriones derivados de fagémido empaquetados con M13K07-FLAG, mientras que todas las demás muestras son negativas. Es decir, los viriones derivados de fagémido empaquetados presentan la marca FLAG como una fusión de pVII funcional.

A. Funcionalidad de presentación de fagémido pIII.

Se sometieron a ensayo dos viriones derivados de fagémido diferentes, pFKPDNscTCR V α 4B2A1 y pSEX-scFv anti-phOx, presentando ambos AviTag (Fig 10), marca FLAG (Fig 11) y marca HIS6 (Fig.11) para determinar la presentación funcional de la fusión de scTCr y scFv pIII, respectivamente.

Se realizaron ensayos ELISA capturando los viriones de fagémido por sus objetivos específicos, MAB GB113 que se une a scTCR y phOx-BSA para el scFv anti-phOx (SEQ ID NO:26). Se usó BSA como bloque y se usó como control los fagémidos rescatados por wt M13K07. En resumen, se recubrieron los objetivos en placas de ELISA ON a 4 °C. Se lavaron las placas y se incubaron las preparaciones de fagémido en las placas durante 2 horas a temperatura ambiente. Se lavaron las placas y se incubaron adicionalmente con anticuerpo conjugado con HRP anti-M13. Se desarrollaron las señales con ABTS y con incubación a TA/30 min, seguido de medida de la absorbancia a A405nm (fig. 10 y 11).

Los resultados muestran que se obtiene reactividad de Ag afin para todos los fagémidos empaquetados. Este análisis confirma, por tanto, que los fagos colaboradores modificados no afectan a la presentación de pIII, sino que simplemente donan un fenotipo definido a la proteína pVII en el mismo virión.

25 EJEMPLO 3. PRESENTACIÓN EN FAGOS GENÓMICA EN PIII Y PVII.

La invención permite la generación de un vector de fago genómico con la presentación de propiedades en las proteínas de cubierta pVII. Dicha presentación no afectará a la infectividad de viriones con presentación de pIII. Además, la invención fomenta la presentación biespecífica en pVII y pIII / pVIII, o incluso en las tres proteínas de la cubierta simultáneamente. El siguiente ejemplo respalda la presentación biespecífica en pIII y pVII en un sistema de presentación en fagos genómico que muestra que la construcción se comporta completamente como los fagos naturales con respecto a la propagación, ensamblaje de viriones, concentración de viriones, fenotipo de presentación de pIII y que, de hecho, se biotinila de forma selectiva *in vivo* en la fusión del péptido pVII.

35 Reactivos

Se prepararon todos los medios y tampones esencialmente como se describe en Sambrook et al (Molecular cloning: a laboratory manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press)). El anticuerpo anti-M13-HRP se adquirió de GE Healthcare Bio-Sciences AB (Uppsala, Suecia) y los anticuerpos F23.2 y GB113 fueron un amable obsequio del profesor B. Bogen (Institute of Immunology, University of Oslo, Noruega). Las enzima de restricción (RE) se adquirieron de New England Biolabs (Ipswich, MA, EE.UU.) con la excepción de DpnI, que se obtuvo de Stratagene (LaJolla, CA, EE.UU.). Los oligos de ADN se adquirieron de MWG Biotech AG (Ebersberg, Alemania). Las perlas magnéticas de estreptavidina Dynabeads MyOne™ se adquirieron de Invitrogen (Oslo, Noruega). dm⁵CTP fue de Fermentas (Burlington, Canadá) BSA y Tween 20 se adquirieron de Sigma-Aldrich (Oslo, Noruega). Las ADN polimerasas Pfu Turbo y Phusion se adquirieron de Stratagene (LaJolla, CA, EE.UU.) y Sigma-Aldrich (Oslo, Noruega), respectivamente. El kit de limpieza de PCR QIAquick fue de Qiagen (Qiagen, Hilden, Alemania).

Cepas bacterianas, fago y fagémidos

50 La cepa XL1-Blue de *E. coli* se adquirió de Stratagene (LaJolla, CA, EE.UU.), mientras que las cepas de *E. coli* MC1061 y K91K fueron amables obsequios del Dr G. P. Smith (Division de Biological Sciences, University of Missouri, EE.UU.) El fagémido pSEX81 (SEQ ID NO:29) que alberga un scFv con especificidad frente a 2-feniloxazol-5-ona (phOx) acoplada a seroalbúmina bovina (BSA) se proporcionó por Affitech AS (Oslo, Noruega). El vector de presentación fUSE5-scTCR V α 4B2A1 pIII se describe en (Løset et al 2007, PMID: 17925331).

55 Diseño y mutagénesis in vitro de AviTag™ -pVII

Se comparó el marco de lectura abierto (ORF) de AviTag™ (N-MSGLNDIFEAQKIEWHE-C) con el uso de codón en cepas de K12 de *E. coli* usando el servidor GCUA (<http://gcu.schoedl.de/seqoverall.html>). Se unió una versión optimizada de codón procarionta de la secuencia peptídica de AviTag™ de forma N terminal al pVII ORF por mutagénesis *in vitro* QuikChange™ de acuerdo con el protocolo de los fabricantes (Stratagen, LaJolla, CA, EE.UU.), usando el par de cebadores BirA-pVII_frwd/BirA-pVII_rev (5'-CCGGCTAAGTAACATGTCCGGCCTGAACGATATCTTTGAAGCGCAGAAAATTGAATGGCA TGAAATGGAGCAGGTC-'3/5'-GACCTGCTCCATTTTCATGCCATTCAATTTTCTGCGCTTCAAAGATATCGTTCAGGCCGGAC ATGTTACTTAGCCGG-3') (SEQ ID NO:5 y SEQ ID NO:6, respectivamente). Para garantizar un fondo de vector

limpio, se clonó un fragmento *BsrGI/SnaBI* RE que contenía el pVII modificada en un genoma de fUSE5-scTCR V α β 4B2A1 no modificado en sitios de RE compatibles usando técnicas estándar. Se introdujo la construcción de ADN en MC1061 de *E. coli* por electroporación. El diseño del cebador se basó en la secuencia fUSE5 publicada (n.º de acceso GenBank: AF218364) (SEQ ID NO: 30).

5

Construcción de los vectores de presentación de pVII genómicos novedosos pGVII y pGVII Δ L

El diseño del cebador y el ensamblaje del vector se realizó esencialmente como se describe en el protocolo SeamLess (Stratagene, LaJolla, CA, EE.UU.). Usando el ADN genómico de VCSM13 (SEQ ID NO: 32) como molde y el par de cebadores VCSM13_F/VCSM13_R (5'-ATCTCTTCCATGGAGCAGGTGCGGATTTGACACAATTTATCAGG-3'/5'-ATCTCTTCCATGTTACTTAGCCGGAACGAGGCGCAGAC-3') (SEQ ID NO:19 y SEQ ID NO: 20, respectivamente), se amplificó por PCR el genoma completo con Pfu Turbo polimerasa esencialmente como se describe en el protocolo SeamLess (Stratagene, LaJolla, CA, EE.UU.). Asimismo, pSEX81 Δ L (el último descrito en el ejemplo 4), y pSEX81 (SEQ ID NO:29) que albergan ambos una unidad scFv anti-phOx (SEQ ID NO:26), se usaron como molde en una PCR estándar usando ADN polimerasa Phusion (Sigma, Oslo, Noruega) con los pares de cebadores pGALDL_F/ pGAL_R (5'-TCTCTTCACATGGCCCAGGTGCAGCTGGTGCAG-3'/5'-ATCTCTTCCCATTCTGATATCTTTGGATCCAGCGGCCGCAC-3') (SEQ ID NO: 22 y SEQ ID NO: 23, respectivamente) y pGAL_F/ pGAL_R (5'-ATCTCTTACATGAAATACCTATTGCCTACGGCAGCCGCTGGC-3'/5'-ATCTCTTCCCATTCTGATATCTTTGGATCCAGCGGCCGCAC-3') (SEQ ID NO: 21 y SEQ ID NO: 23, respectivamente), respectivamente, para amplificar las unidades scFv. Después de la PCR, se purificaron los tres segmentos por un kit de limpieza de PCR (Qiagen, GmbH, Hilden, Alemania) y digerido con RE con Earl. A continuación se ligaron los segmentos purificados con gel digeridos con RE y se sometieron a electroporación en XL1-Blue usando técnicas estándar.

25

Se expandieron las colonias y se verificaron para determinar el tamaño de inserción correcto por rastreo con PCR en una PCR estándar usando el par de cebadores pVII_frwd/pVII_rev (5'-AGCAGCTTTGTTACGTTGATTGG-3'/5'-GCAGCGAAAGACAGCATCG-3') (SEQ ID NO: 24 y SEQ ID NO: 25, respectivamente). Los vectores de presentación de pVII genómicos se indicaron como pGVII (con presentación scFv-pVII dependiente de secuencia señal) y pGVII Δ L (con presentación scFv-pVII sin ninguna secuencia señal). Estos ahora contienen el scFv ORF como una fusión *en-marco* N terminal con pVII y preservan la posición correcta de su codón de inicio para el pV ORF corriente arriba importante para la transcripción y traducción normales. De forma notable, el ensamblaje de estos vectores de genoma de fago puede realizarse simplemente por un ensamblaje de PCR en tres etapas en el que el ORF exógeno se amplifica por PCR con la marca de cebador en 5' que sobresale complementaria al esqueleto del vector, que se puede ajustar por SOEing (*splicing by overlap extension*) de PCR con segmentos complementarios amplificados desde la porción 5' y 3' del vector que cubre el sitio de inserción. Una porción ideal del genoma del fago debería cubrir un segmento que incluya los dos únicos sitios RE *BsrGI/SnaBI* que se encuentran flanqueando el pVII ORF en todos los genomas de Ff. El producto de SOEing digerido con RE se puede insertar convenientemente a continuación en un esqueleto de vector digerido con RE complementario, como se describe, por ejemplo, en el ejemplo 1 y 3. Otra vía de ensamblaje conveniente sería realizar un ensamblaje génico artificial del ORF de fusión apropiado completamente por solapamiento corto de oligonucleótidos que se pueden aparear en un único recipiente, ligar y amplificar por PCR por cebadores flanqueantes. Esta estrategia puede dar un fragmento idéntico como en el enfoque de SOEing, o ser independiente de RE en el que la inserción en del genoma del fago se podía basar, por ejemplo, en la recombinación como se ha descrito (Tillett y Neilan, PMID: 10481038). También se puede prever fácilmente una combinación de las técnicas.

45

Preparación de partículas de fago

Se amplificaron los fagos fUSE5 de *E. coli* MC1061 esencialmente como se ha descrito (Scott y Smith, PMID: 1696028). Se monitorizó el ensamblaje de viriones por valoración en detalle como se ha descrito (Scott y Smith, PMID: 1696028 y Koch et al, PMID: 11126120). En caso aplicable, se purificaron los viriones y se concentraron por precipitación con PEG/NaCl como se ha descrito (Sambrook et al (Molecular cloning: a laboratory manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press)).

50

Ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas de captura de fago (ELISA)

Se absorbieron los anticuerpos F23.2, GB113 en pocillos de placa de microvaloración MaxiSorp™ (Nunc, Roskilde, Dinamarca) en concentraciones de 2,5 a 5 μ g/ml en PBS, pH 7,4 durante la noche a 4 °C. Se bloquearon los pocillos con leche desnatada al 2 % en PBS (p/v) durante 1 h a TA, a continuación se añadieron las preparaciones de viriones y se dejó que reaccionara durante de 1 a 2 h a TA antes de que se detectaran los viriones capturados con anti-M13-HRP (1:5,000) durante 1 h a TA. Entre cada etapa, se lavaron los pocillos 3x con PBST. Se desarrollaron los pocillos con sustrato ABTS y se leyó la absorbancia a A_{405nm} después de 30 min.

60

A - Valoración de fagos genómicos fUSE5-scTCR- Avitag

65

Ni la versión wt, ni la fUSE5-scTCR $V\alpha\beta 4B2A1$ modificada con pVII presentan ninguna toxicidad a huésped. No existe diferencia fenotípica entre las versiones fUSE5-scTCR $V\alpha\beta 4B2A1$ modificadas pVII con relación a la producción de virión y la eficacia de precipitación con PEG. Ambas versiones fUSE5-scTCR $V\alpha\beta 4B2A1$ modificado por pVII proporcionan valoraciones teóricas casi máximas viables con el sistema fUSE5 (fig. 12).

5

B - Funcionalidad del péptido de fusión fUSE5-VII-AviTag

Este análisis ELISA es para probar la funcionalidad de preparaciones de fago genómicas por captura de viriones por perlas de estreptavidina seguido de detección de fagos unidos por anticuerpos anti M13. En resumen, se bloquearon Dynabeads de estreptavidina MyOne con BSA, se lavaron y se incubaron con muestras normalizadas por valoración de fagos fUSE5 con (scTCR/pVII-AviTag) y sin péptidos de fusión pVII-Avitag (scTCR/pVII). Se lavaron las perlas y se detectaron los fagos unidos con anticuerpos conjugados anti-M13-HRP. Se desarrolló una señal por adición de ABTS y se midió a 405nm usando un aparato lector de ELISA TECAN. Los resultados muestran que el péptido pVII-BirA es accesible y se ha biotinilado, y por tanto sirve como una marca de inmovilización y detección para viriones derivados del genoma de fago (fig. 13).

10

15

C -Funcionalidad de la fusión pIII fUSE5- scTCR

Este análisis de ELISA es para probar la funcionalidad de la fusión pIII de preparaciones de viriones derivados de genoma de fago con y sin AviTag-pVII codificado por genoma. Se realizaron ensayos ELISA capturando viriones de fago por dos anticuerpos diferentes que reconocen el scTCR $V\alpha\beta 4B2A1$ (SEQ ID NO: 28); MAB GB113 y F23.2, respectivamente. Se usó leche desnatada como control negativo. En resumen, se recubrieron los anticuerpos en placas de ELISA ON a 4 °C. Se lavaron las placas y se incubaron las preparaciones normalizadas de valoraciones de fagos en las placas durante 2 horas a temperatura ambiente. Se lavaron las placas y se incubaron adicionalmente con anticuerpo conjugado anti-M13 HRP seguido de la adición de 100 μ l de ABTS e incubación a TA. Se midió la absorbancia después de 20 min a 405nm usando un aparato lector de ELISA TECAN. El resultado muestra que el fenotipo de scTCR es indistinguible entre las dos versiones de fUSE5. Por tanto, la modificación pVII no parece que afecte al fenotipo del fago en ningún aspecto (fig. 14).

20

25

EJEMPLO 4: PRESENTACIÓN DE FAGÉMIDO EN PVII

Reactivos

Se prepararon todos los medios y tampones esencialmente como se describe en Sambrook et al (Molecular cloning: a laboratory manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press)). El anticuerpo anti-M13-HRP se adquirió de GE Healthcare Bio-Sciences AB (Uppsala, Suecia) y el anticuerpo GB113 fueron un amable obsequio del profesor B. Bogen (Institute of Immunology, University of Oslo, Noruega). La enzima de restricción (RE) se adquirieron de New England Biolabs (Ipswich, MA, EE.UU.) con la excepción de DpnI, que se obtuvo de Stratagene (LaJolla, CA, EE.UU.). Los oligos de ADN se adquirieron de MWG Biotech AG (Ebersberg, Alemania). BSA y Tween 20 se adquirieron de Sigma-Aldrich (Oslo, Noruega). La ADN polimerasa Pfu Turbo se adquirió de Stratagene (LaJolla, CA, EE.UU.). Los haptenos 2-feniloxazol-5-ona phOx y 5-nitrofenacetilo (NIP) conjugado con BSA se prepararon esencialmente como se ha descrito en otra parte (Makela et al, PMID: 722243 y Michaelsen et al, PMID: 2125362). Isopropil-beta-D-tiogalactopiranosido (IPTG) se adquirió de Fermentas (Burlington, Canadá).

35

40

Cepas bacterianas, fago y fagémidos

La cepa XL1-Blue de *E. coli* se adquirió de Stratagene (LaJolla, CA, EE.UU.). El fago colaborador M13K07 se adquirió de GE Healthcare Bio-Sciences AB (Uppsala, Suecia). El fagémido pSEX81 (SEQ ID NO:29), que alberga un scFv con especificidad frente a 2-feniloxazol-5-ona (phOx) acoplada a seroalbúmina bovina (BSA) se proporcionó amablemente por Affitech AS (Oslo, Noruega). El fagémido de presentación de pIII pFKPDN-scTCR $V\alpha\beta 4B2A1$ se ha descrito en otra parte (Løset et al 2007, PMID: 17925331). El vector de expresión procariota pSG1 que alberga el scFv anti-NIP (SEQ ID NO: 27)(no publicado) se basa en pHOG21 (Kiprianov et al, PMID: 9005945) y se ha fabricado *in-house* a partir de los genes variables de anticuerpos derivados de pLN0H2 y pLNOK (Norderhaug et al, PMID: 9202712).

55

Construcción de los vectores de fagémido de presentación de pVII novedosos pGALD7 y pGALD7 Δ L. Como molde de partida para el esqueleto del vector, se eligió el fagémido pSEX81 (SEQ ID NO:29) descrito anteriormente (n.º de acceso de GenBank: Y14584). En primer lugar, para retirar la secuencia señal de pelB procariota (N-MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMA-C) (SEQ ID NO:33) que codifica un tramo en este vector, se introdujo un sitio NcoI RE en el extremo N terminal por mutagénesis *in vitro* QuikChange™ usando el par de cebadores a41g-frwd/a41g-rev (5'-AGAGGAGAAATTAACCATGGAATACCTATTGCGCTACGGC-3'/5-GCCGTAGGCAATAGGTATTCCATGGTTAATTTCTCCTCT-3') (SEQ ID NO:13 y SEQ ID NO: 14, respectivamente), cambiando de este modo el primer nucleótido en el segundo codón del pelB ORF de A a G. Después de la mutagénesis, se digirió el vector por NcoI, se religó y se usó como molde en una segunda PCR recuperando la parte relevante del vector usando el par de cebadores pHOG_EcoRI_frwd/scTCR_rev (5'-

60

65

TAGCTCACTCATTAGGCACCC-3'/5'-TTTGGATCCAGCGGCCGC-3') (SEQ ID NO:15 y SEQ ID NO: 16, respectivamente). Este fragmento de PCR se movió a continuación en el pSEX81(SEQ ID NO:29) original en los sitios *EcoRI/HindIII* RE compatibles usando técnicas estándar y se confirmó por secuenciación de ADN. Esta etapa retiró completamente la porción que codifica la secuencia señal pelB, pero preservó el codón de partida y su posición relativa hacia la secuencia lacPO y Shine-Dalgarno (SD) importante para la transcripción y traducción normales, así como añade sólo un residuo Ala antes de la secuencia exógena definida por los sitios *NcoI/NotI* RE hallados en el pSEX81 original (SEQ ID NO:29). La nueva construcción se indicó como pSEX81ΔL. En segundo lugar, se amplificó la secuencia que codifica pVII de M13K07 usando el par de cebadores marcados con RE en el extremo 5' pVII_EcoRV/ pVII_NheI (5'-ATATGATATCAGAATGGAGCAGGTTCGCGGATTTTCG-3'/5'-ATATGCTAGCTTATCATCTTTGACCCCCAGCGATTATACC-3') (SEQ ID NO:17 y SEQ ID NO: 18, respectivamente). Este fragmento de PCR se movió a continuación en ambos fagémidos pSEX81 (SEQ ID NO:29), y pSEX81ΔL en los sitios de RE compatibles, intercambiando de este modo la región que codifica pIII en ambos y dando como resultado una fusión de pVII *en-marco* N terminal del casete definido con *NcoI/NotI* en el pSEX81original (SEQ ID NO:29). Se confirmaron las nuevas construcciones por secuenciación de ADN y se indicaron como pGALD7 y pGALD7ΔL, respectivamente. Para intercambiar la unidad scFv anti-phOx (SEQ ID NO:26) en los diversos fagémidos descritos anteriormente, con las unidades scTCR Vαβ4B2A1 y scFv anti-NIP (SEQ ID NO: 27) de pFKPDN y pSG1, respectivamente, se realizó como un intercambio de casete definido con RE *NcoI/NotI* usando técnicas estándar. Todos los fagémidos describe en el presente documento se introdujeron en *E. coli* XL1-Blue por electroporación usando técnicas estándar.

Preparación de partículas de fago

Se monitorizó el rescate de fagémido de *E. coli* XL1-Blue usando fagos colaboradores M13K07 y ensamblaje de virión por valoración en detalle como se ha descrito (Welschof et al, PMID: 9050877 y Koch et al, PMID: 11126120).

Ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas de captura de fago (ELISA)

Se absorbieron los MAb GB113, phOx-BSA o NIP-BSA en pocillos de placa de microvaloración MaxiSorp™ (Nunc, Roskilde, Dinamarca) en concentraciones de 2,5 a 5 μg/ml en PBS, pH 7,4 durante la noche a 4 °C. Se bloquearon los pocillos con leche desnatada al 2 % o BSA al 2 % en PBS (p/v) durante 1 h a TA, a continuación se añadieron las preparaciones de viriones y se dejó que reaccionara durante de 1 a 2 h a TA antes de que se detectaran los viriones capturados con anti-M13-HRP (1:5,000) durante 1 h a TA. Entre cada etapa, se lavaron los pocillos 3x con PBST. Se desarrollaron los pocillos con sustrato ABTS y se leyó la absorbancia a A_{405nm} después de 30 min.

Resultados

Debido a los resultados de los fagos colaboradores modificados descritos anteriormente, también se evaluó la presentación de pVII de dominios plegados. Como tanto Gao et al como Kwasnikowski et al han mostrado que se permite dicha presentación cuando se usa en combinación con la dirección periplásmica dirigida por secuencia señal, se construyeron dos fagémidos novedosos denominados pGALD7 y pGALD7ΔL, permitiendo una presentación de pVII N terminal con y sin una secuencia señal de este tipo , respectivamente (figura 15).

Las construcciones iniciales contenían una unidad de scFv basada en segmentos variables de anticuerpo humano y son específicas para el conjugado hapteno phOx-BSA. Como con los fagos colaboradores modificados con pVII descritos previamente, la presentación de pVII del scFv no deben interferir con el ensamblaje de virión normal. Por lo tanto, se compararon el rendimiento de estos fagémidos con presentación de pVII scFv anti-phOx con y sin secuencia señal y también con presentación de pIII estándar con y sin secuencia señal, usando rescate de fagémido estándar y valoración como se describe en materiales y procedimientos. (Fig. 16)

De hecho, el resultado de la valoración mostró que se produjeron los viriones que contenían fagémido en todos los casos. Sin embargo, mientras que el fagémido pVIIΔL proporcionó valoraciones aproximadamente 30 veces menores que la presentación de pIII estándar, hubo una reducción enorme de 10⁵ veces en la presentación de pVII dirigida con secuencia señal. Como la complementación wt de pVII está presente del fago colaborador en este sistema, este hallazgo fue tanto sorprendente como importante, debido a que muestra que la presentación de pVII dirigida con secuencia señal (pVII) interfiere gravemente con el proceso de ensamblaje del virión, mientras que este efecto sólo es menor en el caso con presentación de pVII sin secuencia señal (pVII^{ΔL}). En comparación, la diferencia de valoración entre la presentación de pIII con y sin secuencia señal, sólo fue menor.

Basándose en las valoraciones determinadas anteriormente, a continuación se evaluó la presentación de scFv funcional en estas muestras de virión en un ELISA específico de phOx-BSA usando entradas normalizadas de valoraciones, excepto para la muestra derivada de pGALD7 que se usó sin diluir ya que la valoración de fagémido era muy baja. (Fig.17).

El resultado claramente mostró la presentación de scFv funcional tanto de la versión pVII sin secuencia señal como de pIII estándar, mientras que las otras muestras fueron negativas. Se esperaba que la presentación de pVII dirigida

con secuencia señal proporcionara resultados negativos debido a la entrada de virión menor de 2000 veces. Se sabe que pIII se exporta al periplasma por medio de la ruta SEC, por tanto la versión de pIII sin secuencia señal proporciona fusiones de pIII defectuosas en la dirección periplásmica, lo que es un prerrequisito para la incorporación de virión. Los viriones de esta muestra, por tanto, contienen sólo pIII derivado de fago colaborador (pérdida de la unión física de fenotipo-genotipo), aunque la eficacia de empaquetado de fagémido es casi normal y da como resultado valoraciones normales (como se ve en la figura 16). Aunque tanto la versión pVII sin secuencia señal como la presentación de pIII estándar proporcionaron una presentación funcional, queda claro que la capacidad de unión a antígeno parece más fuerte con pIII. Esto no refleja necesariamente una mayor funcionalidad de la versión pIII, ya que está bien documentado que la presentación de pIII estándar hace que una mezcla de presentación mono- a oligovalente de unidades scFv provoque efectos de avidez (Bradbury y Marks, PMID: 15261570). Dichos efectos enmascaran la verdadera afinidad inherente de la interacción, y aunque a menudo se prefiere la unidad scFv debido al perfil de expresión superior, está extensamente documentado que, por ejemplo, el menor formato Fab expresado, con el significado de menor unidades por virión, da como resultado uniones mucho más fuertes en la selección de afinidad (de Haard, et al, PMID: 10373423 y Hoogenboom, PMID: 16151404). Por lo tanto, puede ser que la señal menor de pGALD7ΔL refleje una presentación scFv casi monovalente, lo que podría ser ventajoso para muchas aplicaciones.

Los casetes de expresión scFv-pVII/pIII en todos los fagémidos empleados aquí se controlan por el promotor lac y el empaquetado de virión se realizó usando el protocolo estándar sin inducción IPTG (Welschof et al, PMID: 9050877). Por tanto, deber ser posible incrementar la presentación de scFv forzando una expresión más fuerte usando IPTG durante el empaquetado. Además, una característica importante de presentación en fagos de fagémido es el hecho de que la presentación funcional es dependiente del rescate mediado por fago colaborador del fagémido. Por lo tanto, en contraste con la presentación basada en genoma de fago, hay dos fuentes de ADNmc que se pueden empaquetar en el virión desde una célula dada (el fagémido o el genoma de fago colaborador). De forma importante, ambos tipos de viriones tendrán acceso al mismo conjunto de proteínas de la cápside, ya que se producen y se encuentran dentro de la misma célula huésped. Para garantizar la preservación de la unión física de genotipo-fenotipo que forma la base para la tecnología combinatoria de presentación en fagos, por lo tanto, de de mayor importancia que la proporción de fagémido-a-fago colaborador esté a favor del fagémido. En un nuevo experimento, se prepararon las mismas muestras derivadas de fagémido como se describe anteriormente, pero ahora comparando el ensamblaje de virión con y sin IPTG incluido durante el empaquetado. Durante la valoración, esta vez también se mapearon las valoración de genoma de fago colaborador por medio de la resistencia a canamicina hallada en el genoma del fago colaborador.

El resultado de la valoración actual (Fig. 18A) presentó la misma tendencia que en el empaquetado inicial (Fig. 16), con respecto a las valoraciones de fagémido en comparación con diferentes fagémidos en condiciones estándar, pero esta vez ambos pGALD7ΔL (pVII^{ΔL}) y pGALD7 (pVII) tuvieron valoraciones algo mayores. En la inducción de IPTG de la expresión de pVII, o pIII todos los fagémidos presentan una reducción en la valoración, pero el efecto es el más grave para el fagémido pGALD7 de pVII dirigido con secuencia señal. Cuando se mapean las proporciones de fagémido-a-fago colaborador (Fig. 18B) y se comparan los diferentes fagémidos en condiciones estándar (sin IPTG presente), todas las muestras presentan proporciones en el intervalo normal y a favor del fagémido, excepto para el fagémido pGALD7 de pVII dirigido con secuencia señal, que presenta una pérdida completa de la unión de fenotipo-genotipo. En la inducción de IPTG, el desacoplamiento del fenotipo-genotipo fue aún más pronunciado para el fagémido pGALD7, y ahora también pIII sin secuencia señal (pIII^{ΔL}) presentó esta característica en menor medida (proporción 0,5). Sin embargo, la última construcción es, sin embargo, no funcional con respecto a la presentación pIII y sólo se incluyó como control.

Basándose en las valoraciones de fagémido mostradas en la Fig. 18A, se ensayó entonces la presentación de scFv funcional de los viriones pGALD7DL y pGALD7 en un ELISA específico phOx-BSA similar al mostrado en la Fig. 17. Usando entradas de valoraciones normalizadas.

El resultado, de hecho, mostró que la presentación de scFv-pVII funcional se logró de nuevo con pGALD7ΔL sin secuencia señal y la reactividad de phOx-BSA se incrementó significativamente en la expresión de la fusión de pVII forzada IPTG. Este incremento en la reactividad del antígeno refleja más probablemente un incremento en el número de fusión pVII por virión así como un incremento en el número de viriones que albergan una fusión pVII *per se*. Esto último es probable ya que se sabe que en la presentación de pIII estándar sólo entre un 1 a un 10 % de los viriones que contienen fagémido contiene realmente una fusión (Bradbury y Marks, PMID: 15261570). Por otra parte, de nuevo la presentación de pVII dirigida con secuencia señal no mostró unión phOx-BSA funcional. Basándose en la Fig. 18B, la reactividad de antígeno débil observada en la muestra no inducida con IPTG, se debe asignar a viriones que contienen fago colaborador que albergan la fusión de pVII a nivel bajo.

Hasta este momento, se ha mostrado claramente la presentación basada en fagémido de pVII funcional de la unidad anti-phOx (SEQ ID NO:26) scFv, y que esta construcción es comparable con la presentación de pIII del mismo scFv, presentando sólo una reducción menor en las valoraciones de fagémido y en la capacidad de unión a antígeno.

El scFv anti-phOx (SEQ ID NO:26) se ha seleccionado para una colección de scFv de anticuerpo humano y se sabe que se expresa bastante bien en *E. coli* (Marks et al., PMID: 1748994). Para ver si la presentación de pVII presenta

o no la capacidad para presentación funcional de compañeros de fusión más difíciles, se subclonó por tanto, un scFv anti-NIP (SEQ ID NO: 27) basado en los genes variables de anticuerpo de un hibridoma murino, así como un scTCR basado en los genes variables del clon de linfocito T murino 4B2A1 (Løset et al, PMID: 17925331) en ambos pGALD7ΔL y pGALD7. Es bien conocido que muchos genes variables de hibridoma no se expresan bien en *E. coli* y también cuando los fagos presentados (Krebber et al, PMID: 9032408) y los receptores de linfocitos T son de la clase de proteínas plegadas que se ha probado que son especialmente difíciles de acomodar a la presentación en fagos (Li et al, PMID: 15723046, y Løset et al, PMID: 17925331).

Se prepararon viriones de estos nuevos fagémidos por rescate de fagémido estándar y se sometieron a prueba para determinar la capacidad de unión a antígeno en ELISA (figura 20).

El resultado, de hecho, mostró que se logró la presentación de pVII funcional con ambos scFv anti-NIP (SEQ ID NO: 27) y scTCR Vαβ4B2A1 y en contraste con lo que se observó previamente con el scFv anti-phOx (SEQ ID NO:26), este era el caso tanto con como sin presentación de pVII dirigida con secuencia señal. Las señales observadas en la figura 20 no se compararon directamente porque valoraciones de virión no se normalizaron antes del ensayo. En vista la naturaleza no funcional completa de la presentación de pVII dirigida con secuencia señal del scFv anti-phOx (SEQ ID NO:26), se valoraron las muestras anteriores y se determinaron las proporciones de fagémido-a-fago colaborador (figura 21).

Las valoraciones de fagémido de nuevo mostraron que la presentación de pVII sin secuencia señal (pGALD7ΔL) presentaron un rendimiento superior en comparación con la presentación de pVII dirigida con secuencia señal (figura 21A). Esto, de hecho era cierto para ambos scTCR y scFv anti-NIP, pero la diferencia era menos obvia que con las valoraciones observadas para scFv anti-phOx (véanse las figuras 6 y 8). Cuando se comparan las proporciones de fagémido-a-fago colaborador, el pGALD7ΔL de nuevo mostró un rendimiento excelente con proporciones muy a favor del fagémido tanto en el caso de scTCR como de scFv anti-NIP (SEQ ID NO: 27) (figura 21B). La grave pérdida de la unión de genotipo-fenotipo vista con scFv anti-phOx (SEQ ID NO:26) no se observó para scTCR ni scFv anti-NIP (SEQ ID NO:27), a partir de esas proporciones (figura 18 frente a figura 21B). Sin embargo, pGALD7ΔL fue claramente superior.

En vista de los resultados anteriores, cabe destacar el hecho de que hubo una diferencia bastante marcada entre scTCR y scFv anti-NIP con respecto a la proliferación en células huésped durante el empaquetado del virión (figura 22).

De la figura 22 es evidente que mientras que los cultivos que contenían pGALD7ΔL sólo tienen un efecto menor en la proliferación en células huésped, se inhibió significativamente el crecimiento por los clones que contenían el fagémido pGALD7. Esto es un indicativo convincente de la toxicidad del huésped del fagémido de presentación de pVII dirigida con secuencia señal, mientras que no se observa o se observa muy poca toxicidad tan pronto como se retira la secuencia señal.

EJEMPLO 5. CONSTRUCCIÓN DE LA CEPA DE *E. COLI* AVB100FMKII

Reactivos y cepa bacteriana

Se prepararon todos los medios y tampones esencialmente como se describe en Sambrook et al (Molecular cloning: a laboratory manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press)). Las cepas de *E. coli* XL1-Blue y AVB100 (basadas en MC1061) se adquirieron de Stratagene (LaJolla, CA, EE.UU.) y Avidity (Denver, CO, EE.UU.), respectivamente.

Resultados

Para obtener AVB100 de *E. coli* positivo de plásmido F (Str^R cromosómico) se hicieron coincidir las células con XL1-Blue (Tet^R plásmido F) como sigue. Se inocularon colonias individuales de cada cepa en 5 ml de medio LB complementado con el antibiótico apropiado y se incubó durante la noche a 37 °C con agitación rigurosa. Al día siguiente, se iniciaron cultivos de 5 ml recién preparados a una A_{600nm} de 0,1 y se hicieron crecer en fase semilogarítmica a 37 °C con agitación rigurosa antes de que se mezclaran 1 ml de cada uno y se incubó de forma estacionaria a 37 °C durante 1 h. A continuación, se transfirieron 10 µl de esta mezcla a 5 ml de medio LB recién preparado que contenía 100 µg/ml de Str y 30 µg/ml de Tet y se incubó durante la noche a 37 °C con agitación rigurosa. Al día siguiente, se pulverizaron diluciones de este cultivo en placas de agar que contenían 100 µg/ml de Str y 30 µg/ml de Tet y se usaron las colonias resultantes como fuente de la nueva cepa AVB100 positiva de plásmido F, denominada AVB100FmkII.

Referencias

1. Endemann, H. y Model, P. Loccoation of Filamentous Phage Minor Coat Proteins in Phage and in Infected Cells. Journal of Molecular Biology 250, 496-506 (1995).

2. Gao, C. et al. Making artificial antibodies: A format for phage display of combinatorial heterodimeric arrays. PNAS 96, 6025-6030 (1999).
- 5 3. Kwaśnikowski P, Kristensen P, Markiewicz WT. Multivalent display system on filamentous bacteriophage pVII minor coat protein. J Immunol Methods. 20 dic. 2005;307(1-2):135-43. Epub 28 oct. 2005.
4. Khalil AS, Ferrer JM, Brau RR, Kottmann ST, Noren CJ, Lang MJ, Belcher AM. Single M13 bacteriophage tethering and stretching. Proc Natl Acad Sci U S A., 20 mar. 2007;104(12):4892-7. Epub 2007 Mar 13.
- 10 5. Baneyx F, Mujacic M. Recombinant protein folding and misfolding in Escherichia coli. Nat Biotechnol. Nov 2004;22(11):1399-408.
6. Simons GF, Konings RN, Schoenmakers JG. Genes VI, VII, and IX of phage M13 code for minor capsid proteins of the virion. Proc Natl Acad Sci U S A. Jul. 1981;78(7):4194-8.
- 15 7. Scott JK, Smith GP. Searching for peptide ligands with an epitope library. Science. 27 jul. 1990;249(4967):386-90.
8. Koch J, Breitling F, Dübel S. Rapid titration of multiple samples of filamentous bacteriophage (M13) on nitrocellulose filters. Biotechniques. Dic. 2000;29(6):1196-8, 2002.
- 20 9. Kipriyanov SM, Moldenhauer G, Little M. High level production of soluble single chain antibodies in small-scale Escherichia coli cultures. J Immunol Methods. 15 ene. 1997;200(1-2):69-77.
10. 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 U S A., 4 mar. 1997;94(5):1902-7.
- 25 11. 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. Nov. 1990;32(5):517-28.
- 30 12. Näkelä O, Kaartinen M, Pelkonen JL, Karjalainen K. Inheritance of antibody specificity V. Anti-2-phenyloxazolone in the mouse. J Exp Med. 1 dic. 1978;148(6):1644-60.
13. Løset GA, Lunde E, Bogen B, Brekke OH, Sandlie I. Functional phage display of two murine alpha/beta T-cell receptors is strongly dependent on fusion format, mode and periplasmic folding assistance. Protein Eng Des Sel. Sep 2007;20(9):461-72. Epub 9 oct. 2007.
- 35 14. 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. 12 may. 1997;204(1):77-87.
- 40 15. Bradbury AR, Marks JD. Antibodies from phage antibody libraries. J Immunol Methods. Jul. 2004;290(1-2):29-49.
16. de Haard HJ, van Neer N, Reurs A, Hufton SE, Roovers RC, Henderix 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.
- 45 17. Hoogenboom HR. Selecting and screening recombinant antibody libraries. Nat Biotechnol. Sep. 2005;23(9):1105-16.
- 50 18. 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. 5 dic. 1991;222(3):581-97.
19. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment_ search tool. J Mol Biol. 5 oct. 1990;215(3):403-10.
- 55

Listado de secuencias

- 60 <110> Bio-Medisinsk Innovasjon AS Løset, Geir Åge
 <120> Presentación en fagos de pVII
 <130> 42621PC01
 <160> 33
 <170> PatentIn versión 3.3
 <210> 1
 65 <211> 33
 <212> PRT

ES 2 445 152 T3

<213> Bacteriófago M13

<400> 1

Met Glu Gln Val Ala Asp Phe Asp Thr Ile Tyr Gln Ala Met Ile Gln
1 5 10 15

Ile Ser Val Val Leu Cys Phe Ala Leu Gly Ile Ile Ala Gly Gly Gln
20 25 30

Arg

<210> 2

5 <211> 424

<212> PRT

<213> Bacteriófago fd

<400> 2

Met Lys Lys Leu Leu Phe Ala Ile Pro Leu Val Val Pro Phe Tyr Ser
1 5 10 15

His Ser Ala Glu Thr Val Glu Ser Cys Leu Ala Lys Pro His Thr Glu
20 25 30

Asn Ser Phe Thr Asn Val Trp Lys Asp Asp Lys Thr Leu Asp Arg Tyr
35 40 45

Ala Asn Tyr Glu Gly Cys Leu Trp Asn Ala Thr Gly Val Val Val Cys
50 55 60

Thr Gly Asp Glu Thr Gln Cys Tyr Gly Thr Trp Val Pro Ile Gly Leu
65 70 75 80

ES 2 445 152 T3

Ala Ile Pro Glu Asn Glu Gly Gly Gly Ser Glu Gly Gly Gly Ser Glu
85 90 95

Gly Gly Gly Ser Glu Gly Gly Gly Thr Lys Pro Pro Glu Tyr Gly Asp
100 105 110

Thr Pro Ile Pro Gly Tyr Thr Tyr Ile Asn Pro Leu Asp Gly Thr Tyr
115 120 125

Pro Pro Gly Thr Glu Gln Asn Pro Ala Asn Pro Asn Pro Ser Leu Glu
130 135 140

Glu Ser Gln Pro Leu Asn Thr Phe Met Phe Gln Asn Asn Arg Phe Arg
145 150 155 160

Asn Arg Gln Gly Ala Leu Thr Val Tyr Thr Gly Thr Val Thr Gln Gly
165 170 175

Thr Asp Pro Val Lys Thr Tyr Tyr Gln Tyr Thr Pro Val Ser Ser Lys
180 185 190

Ala Met Tyr Asp Ala Tyr Trp Asn Gly Lys Phe Arg Asp Cys Ala Phe
195 200 205

His Ser Gly Phe Asn Glu Asp Pro Phe Val Cys Glu Tyr Gln Gly Gln
210 215 220

Ser Ser Asp Leu Pro Gln Pro Pro Val Asn Ala Gly Gly Gly Ser Gly
225 230 235 240

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Gly Gly Gly Ser Glu Gly Gly Gly
245 250 255

Ser Glu Gly Gly Gly Ser Glu Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly
260 265 270

Ser Gly Asp Phe Asp Tyr Glu Lys Met Ala Asn Ala Asn Lys Gly Ala
275 280 285

Met Thr Glu Asn Ala Asp Glu Asn Ala Leu Gln Ser Asp Ala Lys Gly
290 295 300

Lys Leu Asp Ser Val Ala Thr Asp Tyr Gly Ala Ala Ile Asp Gly Phe

ES 2 445 152 T3

305 310 315 320

Ile Gly Asp Val Ser Gly Leu Ala Asn Gly Asn Gly Ala Thr Gly Asp
 325 330 335

Phe Ala Gly Ser Asn Ser Gln Met Ala Gln Val Gly Asp Gly Asp Asn
 340 345 350

Ser Pro Leu Met Asn Asn Phe Arg Gln Tyr Leu Pro Ser Leu Pro Gln
 355 360 365

Ser Val Glu Cys Arg Pro Tyr Val Phe Gly Ala Gly Lys Pro Tyr Glu
 370 375 380

Phe Ser Ile Asp Cys Asp Lys Ile Asn Leu Phe Arg Gly Val Phe Ala
 385 390 395 400

Phe Leu Leu Tyr Val Ala Thr Phe Met Tyr Val Phe Ser Thr Phe Ala
 405 410 415

Asn Ile Leu Arg Asn Lys Glu Ser
 420

- <210> 3
- <211> 73
- <212> PRT
- 5 <213> Bacteriófago M13
- <400> 3

Met Lys Lys Ser Leu Val Leu Lys Ala Ser Val Ala Val Ala Thr Leu
 1 5 10 15

Val Pro Met Leu Ser Phe Ala Ala Glu Gly Asp Asp Pro Ala Lys Ala
 20 25 30

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

Trp Ala Met Val Val Val Ile Val Gly Ala Thr Ile Gly Ile Lys Leu
 50 55 60

Phe Lys Lys Phe Thr Ser Lys Ala Ser
 65 70

- 10 <210> 4
- <211> 17
- <212> PRT
- <213> Artificial
- <220>
- <223> péptido sintético
- <400> 4

Met Ser Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His
 1 5 10 15

- 15 Glu
- <210> 5
- <211> 76
- <212> ADN
- <213> Artificial
- 20 <220>

ES 2 445 152 T3

<223> oligonucleótido
 <400> 5
 ccggctaagt aacatgtccg gcttgaacga tatctttgaa ggcgagaaaa ttgaatggca 60

 tgaaatggag caggtc 76
 <210> 6
 5 <211> 76
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido
 10 <400> 6
 gacctgctcc atttcatgcc attcaatttt ctgctgttca aagatattcg ttaggcccga 60

 catgttactt agccgg 76
 <210> 7
 <211> 53
 <212> ADN
 15 <213> Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido
 <400> 7
 ccggctaagt aacatggact acaaagatga cgatgacaaa atggagcagg tcg 53
 20 <210> 8
 <211> 53
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 25 <223> oligonucleótido
 <400> 8
 cgacctgctc cattttgca tcgtcatctt ttagtccat gttacttagc cgg 53
 <210> 9
 <211> 9
 30 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> péptido sintético
 <400> 9

 Met Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
 35 1 5
 <210> 10
 <211> 47
 <212> ADN
 <213> Artificial
 40 <220>
 <223> oligonucleótido
 <400> 10
 ccggctaagt aacatgcatc accatcacca tcatatggag caggctcg 47
 <210> 11
 45 <211> 47
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido
 50 <400> 11
 cgacctgctc catgtgatgg ttagtggtgat gcatgttact tagccgg 47
 <210> 12
 <211> 7
 <212> PRT
 55 <213> Artificial
 <220>
 <223> péptido sintético
 <400> 12
 Met His His His His His His
 60 1 5

<210> 13
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Artificial
 5 <220>
 <223> oligonucleótido
 <400> 13
 agaggagaaa ttaacatgg aatacctatt gcctacggc 39
 <210> 14
 10 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido
 15 <400> 14
 gccgtaggca ataggattc catggtaat ttctcctc 39
 <210> 15
 <211> 21
 <212> ADN
 20 <213> Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido
 <400> 15
 tagctcactc attaggcacc c 21
 25 <210> 16
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 30 <223> oligonucleótido
 <400> 16
 tttgatcca gcggccgc 18
 <210> 17
 <211> 35
 35 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido
 <400> 17
 40 atatgatatc agaatggagc aggtcgcgga ttctc 35
 <210> 18
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Artificial
 45 <220>
 <223> oligonucleótido
 <400> 18
 atatgctagc ttatcatctt tgacccccag cgattatacc 40
 <210> 19
 50 <211> 46
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido
 55 <400> 19
 atctctcca tggagcaggc cgcggttc gacacaattt atcagg 46
 <210> 20
 <211> 38
 <212> ADN
 60 <213> Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido
 <400> 20
 atctctcca tttacttag ccggaacgag gcgcagac 38
 65 <210> 21
 <211> 43

ES 2 445 152 T3

<212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido
 5 <400> 21
 atctcttcac atgaaatacc tattgcttac ggcagccgct ggc 43
 <210> 22
 <211> 33
 <212> ADN
 10 <213> Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido
 <400> 22
 tctcttcaca tggcccaggt gcagctgggtg cag 33
 15 <210> 23
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 20 <223> oligonucleótido
 <400> 23
 atctcttccc attctgatatt ctttggatcc agcggccgca c 41
 <210> 24
 <211> 24
 25 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido
 <400> 24
 30 agcagctttg ttacgttgat ttgg 24
 <210> 25
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Artificial
 35 <220>
 <223> oligonucleótido
 <400> 25
 gcagcgaaag acagcatcg 19
 <210> 26
 40 <211> 253
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> anticuerpo scFv
 45 <400> 26
 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

ES 2 445 152 T3

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

<210> 27

<211> 249

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> anticuerpo scFv

<400> 27

ES 2 445 152 T3

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 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> 28

<211> 248

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> anticuerpo scTCR

<400> 28

ES 2 445 152 T3

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

Ala Met Thr Ser Leu Asn Cys Thr Phe Ser Asp Ser Ala Ser Gln Tyr
 20 25 30

Phe Ala Trp Tyr Arg Gln Gln Ser Gly Lys Ala Pro Lys Ala Leu Met
 35 40 45

Ser Ile Phe Ser Asn Gly Glu Lys Glu Glu Gly Arg Phe Thr Ile His
 50 55 60

Leu Asn Lys Ala Ser Leu His Phe Ser Leu His Ile Arg Asp Ser Gln
 65 70 75 80

Pro Ser Asp Ser Ala Leu Tyr Leu Cys Ala Val Arg Gly Pro Asn Thr
 85 90 95

Gly Asn Tyr Lys Tyr Val Phe Gly Ala Gly Thr Arg Leu Lys Val Ile
 100 105 110

Ala Lys Leu Ser Gly Ser Ala Ser Ala Pro Lys Leu Glu Glu Gly Glu
 115 120 125

Phe Ser Glu Ala Arg Val Glu Ala Ala Val Thr Gln Ser Pro Arg Asn
 130 135 140

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

Asn Asn His Asn Asn Met Tyr Trp Tyr Arg Gln Asp Thr Gly His Gly
 165 170 175

Leu Arg Leu Ile His Tyr Ser Tyr Gly Ala Gly Ser Thr Glu Lys Gly
 180 185 190

Asp Ile Pro Asp Gly Tyr Lys Ala Ser Arg Pro Ser Gln Glu Asn Phe
 195 200 205

Ser Leu Ile Leu Glu Leu Ala Thr Pro Ser Gln Thr Ser Val Tyr Phe
 210 215 220

Cys Ala Ser Gly Asp Ala Gly Gln Gly His Ser Asp Tyr Thr Phe Gly
 225 230 235 240

Ser Gly Thr Arg Leu Leu Val Ile
 245

<210> 29

<211> 4864

5 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> vector pSEX81-215

<400> 29

ES 2 445 152 T3

tggcgtaata gcgaagaggg ccgcaccgat cgcccttccc aacagttgcg cagcctgaat	60
ggcgaatggg acgcgccttg tagcggcgca ttaagcgcgg cgggtgtggt ggttacgcgc	120
agcgtgaccg ctacacttgc cagcgcacct ggcgccgctc ctttcgcttt cttcccttcc	180
tttctcgcca cgttcgcggg ctttccccgt caagctctaa atcgggggct cccttaggg	240
ttccgattta gtgctttacg gcacotcgac cccaaaaaac ttgattaggg tgatggttca	300
cgtagtgggc catcgccctg atagacgggt tttcgccctt tgacgttggg gtccacgttc	360
tttaatagtg gactcttggt ccaaactgga acaaacctca accctatctc ggtctattct	420
tttgatttat aagggatttt gccgatttcg gcctattggt taaaaaatga gctgatttaa	480
caaaaattta acgcgaattt taacaaaata ttaacgctta caatttaggt ggcacttttc	540
ggggaaatgt gcgcggaacc cotatttggt tatttttcta aatacattca aatatgtatc	600
cgctcatgag acaataacc tgataaatgc ttcaataata ttgaaaagg aagagtatga	660
gtattcaaca tttccgtgtc gcccttattc cttttttgc ggcattttgc cttcctgttt	720

ES 2 445 152 T3

ttgctcacc agaaaacgctg gtgaaagtaa aagatgctga agatcagttg ggtgcacgag 780
 tgggttacat cgaactggat ctcaacagcg gtaagatcct tgagagtttt cgccccgaag 840
 aacgttttcc aatgatgagc actttttaaag ttctgctatg tggcgcggtta ttatcccgta 900
 ttgacgccgg gcaagagcaa ctcggtcgcc gcatacacta ttctcagaat gacttggttg 960
 agtactcacc agtcacagaa aagcatctta cggatggcat gacagtaaga gaattatgca 1020
 gtgctgccat aaccatgagt gataacactg cggccaactt acttctgaca acgatcggag 1080
 gaccgaagga gctaaccgct tttttgcaca acatggggga tcatgtaact cgccttgatc 1140
 gttgggaacc ggagctgaat gaagccatac caaacgacga gcgtgacacc acgatgctg 1200
 tagcaatggc aacaacgttg cgcaaactat taactggcga actacttact ctacttccc 1260
 ggcaacaatt aatagactgg atggaggcgg ataaagttgc aggaccactt ctgcgctcgg 1320
 cccttccggc tggctggttt attgctgata aatctggagc cggtgagcgt gggctctcgg 1380
 gtatcattgc agcactgggg ccagatggta agccctcccg tatcgtagtt atctacacga 1440
 cggggagtca ggcaactatg gatgaacgaa atagacagat cgctgagata ggtgcctcac 1500
 tgattaagca ttggttaact tcagaccaag ttactcata tatactttag attgatttaa 1560
 aacttcattt ttaatttaaa aggatctag tgaagatcct ttttgataat ctcatgacca 1620
 aatccctta acgtgagttt tcgttccact gagcgtcaga ccccgtagaa aagatcaaag 1680
 gatcttcttg agatcctttt tttctgcgcg taatctgctg cttgcaaaca aaaaaaccac 1740
 cgctaccagc ggtggtttgt ttgccggatc aagagctacc aactcttttt ccgaaggtaa 1800
 ctggcttcag cagagcgcag ataccaaata ctgtccttct agtgtagccg tagttaggcc 1860
 accacttcaa gaactctgta gcaccgccta catacctcgc tctgctaatac ctgttaccag 1920
 tggctgctgc cagtggcgat aagtcgtgtc ttaccgggtt ggactcaaga cgatagttac 1980
 cggataaggc gcagcggtcg ggctgaacgg ggggttcgtg cacacagccc agcttgagc 2040
 gaacgacct aaccgaactg agatacctac agcgtgagct atgagaaagc gccacgcttc 2100
 ccgaagggag aaaggcggac aggtatccgg taagcggcag ggtcggaca ggagagcga 2160
 cgagggagct tccaggggga aacgcctggt atctttatag tctgtcggg tttcgcacc 2220
 tctgacttga gcgtcgattt ttgtgatgct cgtcagggg gcggagccta tggaaaaacg 2280
 ccagcaacgc ggcttttta cggttcctgg ccttttgctg gccttttgct cacatgttct 2340
 ttctgcggt atcccctgat tctgtggata accgtattac cgcctttgag tgagctgata 2400
 ccgctcgcgg cagccgaacg accgagcga gcgagtcagt gagcaggaa gcggaagagc 2460

ES 2 445 152 T3

gcccaatacg caaacgcct cccccgcgc gttggccgat tcattaatgc aggtatcacg 2520
 aggccctttc gtcttcacct cgagagcggg cagtgagcgc aacgcaatta atgtgagtta 2580
 gctcactcat taggcacccc aggctttaca ctttatgctt ccggetcgtc tgttggtggg 2640
 aattgtgagc ggataacaat ttcacacaga attcattaaa gaggagaaat taaccatgaa 2700
 atacctattg cctacggcag ccgctggcct gctgctgctg gcagctcagc cggccatggc 2760
 gcaagttcag ctgcagcagt ctggggctga actggtgagg cctggggtct cagtgaagat 2820
 ttctgcaag ggttctggct acaaatcac tgattatgct acgcaactggg tgaacacagag 2880
 tcatgcaaag agtctagagt ggattggagt tattagtact tactatggtg atactactta 2940
 taaccagaag ttcaagggca aggccacaat gactgtcgac aaatcctcca gcacagccta 3000
 tatggaactt ccagactga catctgatga ttctgccatc tattattgtg ccctggtacg 3060
 cccctttgct tactggggcc aaggaccac ggtcaccgta tcctcagga gtgcatccgc 3120
 cccaaagctt gaagaagggt aatttcaga agcagcgtc gatatcgtgc tgaccaatc 3180
 tccactctcc ctgagtgtgt cagcaggaga gaagtcact atgagctgca agtccagtca 3240
 gagtctgtta aacagtggaa atcaaaataa cgacttgccc tgggtaccagc agaaaccagg 3300
 gcaacgtcct aaactgttga tctacggggc atccactagg gaatctgggg tccctgatcg 3360
 cttcacaggc agtggatctg gaaccgattt cactcttacc atcagcagtg tgcaggctga 3420
 agacctggca gtttattact gtcagaatga tcatagttat ccgttaacgt tcggtgctgg 3480
 caccaagctg gaaatcaaac gggcggccgc tggatccaaa gatatcagag ctgaaactgt 3540
 tgaagttgt ttagcaaaat cccatacaga aaatcattt actaacgtct ggaaagacga 3600
 caaaacttta gatcgttacg ctaactatga gggctgtctg tggaatgcta caggcgttgt 3660
 agtttgact ggtgacgaaa ctcaagtgtta cggatcatgg gttcctattg ggcttgctat 3720
 ccctgaaaat gagggtggtg gctctgaggg tggcggttct gaggggtggc gttctgaggg 3780
 tggcgggtact aaacctctg agtacggtga tacacctatt ccgggtata cttatatcaa 3840
 ccctctcgac ggcacttate cgctgtgac tgagcaaac cccgtaatc ctaatccttc 3900
 tcttgaggag tctcagcctc ttaatacttt catgtttcag aataatagg tccgaaatag 3960
 gcagggggca ttaactgttt atacgggcac tgttactcaa ggcactgacc ccgttaaac 4020
 ttattaccag tacactcctg tatcatcaaa agccatgtat gacgcttact ggaacggtaa 4080
 attcagagac tgcgctttcc attctggctt taatgaggat ttatttgttt gtgaatatca 4140
 aggccaatcg tctgacctgc ctcaacctcc tgtcaatgct ggcggcggct ctggtggtgg 4200
 ttctggtggc ggcctctgagg gtggtggctc tgaggggtggc ggttctgagg gtggcggctc 4260

ES 2 445 152 T3

```

tgagggaggc ggttccggtg gtggctctgg ttccggtgat tttgattatg aaaagatggc 4320
aaacgctaata aagggggcta tgaccgaaaa tgccgatgaa aacgcgctac agtctgacgc 4380
taaaggcaaaa cttgattctg tcgctactga ttacgggtgct gctatcgatg gtttcattgg 4440
tgacgtttcc ggccttgcta atggtaatgg tgctactggt gattttgctg gctctaattc 4500
ccaaatggct caagtccggtg acggtgataa ttcaccttta atgaataatt tccgtcaata 4560
tttaccttcc ctccctcaat cggttgaatg tcgccctttt gtctttggcg ctggtaaacc 4620
atatgaattt tctattgatt gtgacaaaaa aaacttattc cgtgggtgtct ttgcgtttct 4680
tttatatggt gccaccttta tgtatgtatt ttctacgttt gctaacatac tgcgtaataa 4740
ggagtcttaa tgatctagag gcctgtgcta atgatcagct agcttgaggc atcaataaaa 4800
cgaaaggctc agtcgaaaga ctgggccttt cgttttatct gttgtttgtc ggtaaacgtc 4860
gacc 4864

```

```

<210> 30
<211> 9206
<212> ADN
5 <213> Artificial
<220>

```

```

<223> Vector de presentación en fagos filamentosos fUSE5, secuencia completa

```

```

<400> 30
aacgctacta ccattagtag aattgatgcc accttttcag ctccgcgccc aatgaaaaat 60
atagctaaac aggttattga ccatttgcga aatgtatcta atggtcaaac taaatctact 120
cgttcgcaga attgggaatc aactgttaca tgggaatgaaa cttccagaca ccgtacttta 180
gttgcataatt taaaacatgt tgaactacag caccagattc agcaattaag ctctaagcca 240
tccgcaaaaa tgacctotta tcaaaaggag caattaaagg tactgtctaa tcctgacctg 300
ttggaatttg ctcccggtct ggttcgcttt gaggctcgaa ttgaaacgcg atatttgaag 360
tctttcgggc ttctctttaa tctttttgat gcaattcgct ttgcttctga ctataataga 420
cagggtaaaag acctgatttt tgatttatgg tcattctcgt tttctgaact gtttaaagca 480
tttgaggggg attcaatgaa tatttatgac gattccgcag tattggacgc tatccagtct 540
aaacatttta caattacccc ctctggcaaa acttcctttg caaaagcctc tcgctatfff 600
ggtttctatc gtcgtctggt taatgagggg tatgatagtg ttgctcttac catgcoctgt 660
aattcctfff ggcgttatgt atctgcatta gttgagtggt gtattcctaa atctcaattg 720
atgaatcttt ccacctgtaa taatgttggt ccgtagttc gttttattaa cgtagatttt 780

```

ES 2 445 152 T3

tcctccaac gtcctgactg gtataatgag ccagttctta aaatcgcata aggtaattca 840
 aaatgattaa agttgaaatt aaaccgtctc aagcgcaatt tactaccctt tctgggtgtt 900
 ctcgtcaggg caagccttat tcaactgaatg agcagctttg ttacgttgat ttgggtaatg 960
 aatatccggt gcttgtcaag attactctcg acgaaggtea gccagcgtat gcgcctggtc 1020
 tgtacaccgt gcatctgtcc tcgttcaaag ttggtcagtt cggttctctt atgattgacc 1080
 gtctgcgcct cgttccggct aagtaacatg gagcaggctg cggatttoga cacaatttat 1140
 caggcgatga taaaaatctc cgttgtactt tgtttcgcgc ttgggtataat cgctgggggt 1200
 caaagatgag tgttttagtg tattctttcg cctctttcgt tttaggttgg tgccttcgta 1260
 gtggcattac gtaattttacc cgtttaatgg aaacttctc atgaaaaagt ctttagtctc 1320
 caaagcctcc gtagccggtg ctaccctcgt tccgatgctg tctttcgtg ctgaggggtga 1380
 cgatcccga aagcggcct ttgactccct gcaagcctca gcgaccgaat atatcggtta 1440
 tgcgtgggcg atggttgttg tcattgtcgg cgcaactatc ggtatcaagc tgtttaagaa 1500
 attcacctcg aaagcaagct gataaaccca tacaattaa ggctcctttt ggagcctttt 1560
 tttttggaga ttttcaacgt gaaaaaatta ttattcgaat ttccttttagt tgttctttc 1620
 tattctcact cggccgacgt ggcttggcct ctggggccga aactggtgaa agttgtttag 1680
 caaaacctca tacagaaaat tcatttacta acgtctggaa agacgacaaa acttttagatc 1740
 gttacgctaa ctatgagggc tgtctgtgga atgctacagg cgttgtgggt tgtactggtg 1800
 acgaaactca gtgttacggt acatgggttc ctattgggct tgctatccct gaaaatgagg 1860
 gtgggtggctc tgaggggtgc ggttctgagg gtggcggttc tgaggggtgc ggtactaaac 1920
 ctctgagta cggtgataca cctattccgg gctatactta tatcaacctc ctcgacggca 1980
 cttatccgcc tggtagctgag caaaaccccg ctaatcctaa tccttctctt gaggagtctc 2040
 agcctcttaa tactttcatg tttcagaata ataggttccg aaataggcag ggtgcattaa 2100
 ctgtttatac gggcactggt actcaaggca ctgacccctg taaaacttat taccagtaca 2160
 ctctgtatc atcaaaagcc atgtatgacg cttactggaa cggtaaattc agagactgag 2220
 ctttccattc tggctttaat gaggatccat tcgtttgtga atatcaaggc caatcgtctg 2280
 acctgcctca acctcctgct aatgctggcg gcgctctggt tgggtggttct ggtggcggtc 2340
 ctgaggggtg cggctctgag ggtggcggtt ctgaggggtg cggctctgag ggtggcggtt 2400
 ccggtggcgg ctccggttcc ggtgattttg attatgaaaa aatggcaaac gctaataagg 2460
 gggctatgac cgaaaatgcc gatgaaaacg cgctacagtc tgacgctaaa ggcaacttg 2520
 attctgtcgc tactgattac ggtgctgcta tcgatggttt cattggtgac gtttccggcc 2580

ES 2 445 152 T3

ttgctaattgg taatgggtgct actgggtgatt ttgctggctc taattcccaa atggctcaag 2640
 tcggtgacgg tgataattca cctttaatga ataatttccg tcaatattta ccttctttgc 2700
 ctgagtcggt tgaatgtcgc ccttatgtct ttggcgctgg taaaccatat gaattttcta 2760
 ttgattgtga caaaaataac ttattccgtg gtgtctttgc gtttctttta tatgttgcca 2820
 cctttatgta tgtattttcg acgtttgcta acatactgcg taataaggag tcttaatcat 2880
 gccagttctt ttgggtattc cgttattatt gcgtttcctc ggtttccttc tggttaacttt 2940
 gttcggctat ctgcttactt tccttaaaaa gggcttcggt aagatagcta ttgctatttc 3000
 attgtttctt gctcttatta ttgggcttaa ctcaattctt gtgggttata tctctgatat 3060
 tagcgcacaa ttaccctctg attttgttca gggcgttcag ttaattctcc cgtctaattgc 3120
 gcttccctgt ttttatgtta ttctctctgt aaaggctgct attttcattt ttgacgttaa 3180
 acaaaaaatc gtttcttatt tggattggga taaataaata tggctgttta ttttgaact 3240
 ggcaaatag gctctggaaa gacgctcgtt agcgttggtta agattcagga taaaattgta 3300
 gctgggtgca aaatagcaac taatcttgat ttaaggcttc aaaacctccc gcaagtcggg 3360
 aggttcgcta aaacgcctcg cgttcttaga ataccggata agccttctat ttctgatttg 3420
 cttgctattg gtcgtggtaa tgattcctac gacgaaaata aaaacggtt gcttgttctt 3480
 gatgaatgcg gtacttgggt taataccctg tcatggaatg acaaggaaag acagccgatt 3540
 attgattggt ttcttcatgc tcgtaaattg ggatgggata ttatttttct tgttcaggat 3600
 ttatctattg ttgataaaca ggcgcgttct gcattagctg aacacgttgt ttattgtcgc 3660
 cgtctggaca gaattacttt accctttgtc ggcactttat attctcttgt tactggctca 3720
 aaaatgcctc tgcctaaatt acatgttgggt gttgttaaata atgggtgattc tcaattaagc 3780
 cctactgttg agcgttggct ttatactggt aagaatttat ataacgcata tgacactaaa 3840
 caggcttttt ccagtaatta tgattcaggt gtttattcat atttaacccc ttatttatca 3900
 cacggtcgggt atttcaaacc attaaattta ggtcagaaga tgaaattaac taaaatatat 3960
 ttgaaaaagt tttctcgcgt tctttgtctt gcgataggat ttgcatcagc atttacatat 4020
 agttatataa cccaacctaa gccggagggt aaaaaggtag tctctcagac ctatgatttt 4080
 gataaattca ctattgactc ttctcagcgt cttaatctaa gctatcgccta tgttttcaag 4140
 gattctaagg gaaaattaat taatagcgac gatttacaga agcaagggtta ttccatcaca 4200
 tatattgatt tatgtactgt ttcaattaaa aaaggtaatt caaatgaaat tgttaaattg 4260
 aattaatttt gtttcttga tgtttgttcc atcatcttct tttgctcaag taattgaaat 4320

ES 2 445 152 T3

gaataattcg cctctgcgcg atttcgtgac ttggtattca aagcaaacag gtgaatctgt 4380
 tattgtctca cctgatgtta aaggtagcag gactgtatat tcctctgacg ttaagcctga 4440
 aaatttacgc aatttcttta tctctgtttt acgtgctaata aattttgata tggttggctc 4500
 aattccttcc ataattcaga aatataaccc aaatagtcag gattatattg atgaattgcc 4560
 atcarctgat attcaggaat atgatgataa ttccgctcct tctggtggtt tctttgttcc 4620
 gcaaaatgat aatgttactc aaacatttaa aattaataac gttcgcgcaa aggatttaata 4680
 aagggttgta gaattgtttg ttaaacttaa tacatctaaa tcctcaaatg tattatctgt 4740
 tgatggttct aacttattag tagttagcgc ccctaaagat attttagata accttccgca 4800
 atttctttct actgttgatt tgccaactga ccagatattg attgaaggat taattttcga 4860
 ggttcagcaa ggtgatgctt tagatttttc ctttctgctt ggctctcagc gcggcactgt 4920
 tgctggtggt gttaatactg accgtctaac ctctgtttta tcttctgcgg gtggttcgtt 4980
 cggatattttt aacggcgatg ttttagggct atcagttcgc gcattaaaga ctaatagcca 5040
 ttcaaaaata ttgtctgtgc ctctgtattct tacgctttca ggtcagaagg gttctatttc 5100
 tgttgccag aatgtccctt ttattactgg tctgttaact ggtgaatctg ccaatgtaaa 5160
 taatccattt cagacgggtg agcgtcaaaa tgttggattt tctatgagtg tttttcccg 5220
 tgcaatggct ggcgtaata ttgttttaga tataaccagt aaggccgata gtttgagttc 5280
 ttctactcag gaagtgatg ttattactaa tcaaagaagt attgcgacaa cggttaattt 5340
 gcgtgatggt cagactcttt tgctcgggtg cctcactgat tacaaaaaca cttctcaaga 5400
 ttctggtgtg ccgttctctg ctaaaatccc tttaatcggc ctctgtttta gctcccgttc 5460
 tgattctaac gaggaagca cgttgtactg gctcgtcaaa gcaaccatag tacgcgcctt 5520
 gtagcggcgc attaagcgcg gcgggtgtgg tggttacgcg cagcgtgacc gctacacttg 5580
 ccagcgcctt agcgcgcgct cctttcgtt tcttcccttc ctttctcgcc acgttctccg 5640
 gctttccccg tcaagctcta aatcggggga tctcgggaaa agcgttggtg accaaagggtg 5700
 ccttttatca tcactttaaa aataaaaaac aattactcag tgctgttat aagcagcaat 5760
 taattatgat tgatgcctac atcacaacaa aaactgattt aacaaatggt tggctctgct 5820
 tagaaagtat atttgaacat tatcttgatt atattattga taataataaa aaccttatcc 5880
 ctatccaaga agtgatgcct atcattggtt ggaatgaact tgaaaaaatt agccttgaat 5940
 acattactgg taaggtaaac gccattgtca gcaaattgat ccaagagaac caacttaaag 6000
 cttatgatga tgatgtgctt aaaaacttac tcaatggctg gtttatgcat atcgcaatac 6060
 atgcgaaaaa cctaaaagag cttgccgata aaaaaggcca atttattgct atttaccgog 6120

ES 2 445 152 T3

gctttttatt gagcttgaaa gataaataaa atagataggt tttatttgaa gctaaatctt 6180
 ctttatcgta aaaaatgccc tcttgggta tcaagagggt cattatattt cgcggaataa 6240
 catcatttgg tgacgaaata actaagcact tgtctcctgt ttactcccct gagcttgagg 6300
 ggtaacatg aaggtcatcg atagcaggat aataatacag taaaacgcta aaccaataat 6360
 ccaaatccag ccatcccaaa ttggtagtga atgattataa ataacagcaa acagtaatgg 6420
 gccataaca cgggttgcac tggttaaggct caccaataat ccctgtaaag caccttgctg 6480
 atgactcttt gtttggatag acatcactcc ctgtaatgca ggtaaagcga tcccaccacc 6540
 agccaataaa attaaaacag ggaaaactaa ccaaccttca gatataaacg ctaaaaaggc 6600
 aatgcaacta ctatctgcaa taaatccgag cagtactgcc gttttttcgc cccatttagt 6660
 ggctattctt cctgccacaa aggcttgaa tactgagtgt aaaagaccaa gaccogctaa 6720
 tgaaaagcca accatcatgc tattccatcc aaaacgattt tcggtaaata gcaccacac 6780
 cgttgccgga atttggccta tcaattgcgc tgaaaaataa ataatacaaa aaatgggcat 6840
 cgttttaaat aaagtgatgt ataccgaatt cgattgcgtc tcaacccta ctteggatc 6900
 tgtattatca cgtgtatfff ttgtttcacg gaacccaaac ataaccacaa ggaaagtac 6960
 aatatttagc aacgcagcga taaaaaggg actatgcggt gaaatctctc ctgcaaac 7020
 accaataata ggccccgcta ttaaaccaag cccaaaactt gccctaacc aaccgaacca 7080
 cttcacgcgt tgagaagctg aggtggtatc ggcaatgacc gatgccgga cagccccagt 7140
 agtcctgtg atccctgaaa gcaaacggcc taaatacagc atccaaagcg cacttgaaaa 7200
 agccagcaat aagtaatcca gcgatgcgcc tattaatgac aacaacagca ctgggccc 7260
 accaaatcgg tcagacattt ttccaagcca aggagcaaag ataacctgca ttaacgcata 7320
 aagtgcaagc aatacgccaa agtgggttagc gatattctcc gaagcaataa attcacgtaa 7380
 taacgttggc aagactggca tgataaggcc aatcccatg gcacgagta acgtaattac 7440
 caatgcgac tttgtogaac tattcatttc acttttctct atcactgata gggagtggta 7500
 aaataactct atcaatgata gagtgtcaac aaaaattagg aattaatgat gtctagatta 7560
 gataaaagta aagtattaa cagcgcatta gagctgctta atgaggtcgg aatcgaaggt 7620
 ttaacaaccc gtaaacctgc ccagaagcta ggtgtagagc agcctacatt gtattggcat 7680
 gtaaaaaata agcgggcttt gctcgacgcc ttagccattg agatgttaga taggcacat 7740
 actcactttt gccctttaga aggggaaagc tggcaagatt ttttacgtaa taacgctaaa 7800
 agttttagat gtgctttact aagtcacgc gatggagcaa aagtacattt aggtacacgg 7860

ES 2 445 152 T3

cctacagaaa aacagtatga aactctcgaa aatcaattag cctttttatg ccaacaaggt 7920
 ttttactag agaatgcatt atatgcactc agcgctgtgg ggcattttac tttaggttgc 7980
 gtattggaag atcaagagca tcaagtcgct aaagaagaaa gggaaacacc tactactgat 8040
 agtatgcgc cattattacg acaagctatc gaattatttg atcaccaagg tgcagagcca 8100
 gccttcttat tggccttga attgatcata tgcggattag aaaaacaact taaatgtgaa 8160
 agtgggtcctt aaaagcagca taaccttttt ccgatgatgg aacttcacgg taaccaagat 8220
 gtcgagttaa ccacccttta gattcataaa gcgaaaataa tgcggctcca acgtaccac 8280
 ctaaattggaa acggogttca ctccaatcta aacacgcaca acagatttta cgtgaatggt 8340
 tggaaagAAC gtcaattccc atttcatgaa aatattgaat accacttaat gtgatcattg 8400
 aaccattttc agtgatecat tgctgttgac aaagggaaac atagatccct ttagggttcc 8460
 gatttagtgc tttacggcac ctgcacctcc aaaaacttga tttgggtgat ggttcacgta 8520
 gtgggccatc gccctgatag acggtttttc gccctttgac gttggagtcc acgttcttta 8580
 atagtggact cttgttccaa actggaacaa cactcacaac taactcggcc tattcttttg 8640
 atttataagg atttttgtca ttttctgctt actggttaaa aaataagctg atttaacaaa 8700
 tatttaacgc gaaatttaac aaaacattaa cgtttacaat ttaaataatt gcttatacaa 8760
 tcatcctggt tttggggctt ttctgattat caatcggggg acatatgatt gacatgctag 8820
 ttttacgatt accgttcacg gattctcttg tttgctccag actttcaggt aatgacctga 8880
 tagcctttgt agacctotca aaaatagcta ccctctccgg catgaattta tcagctagaa 8940
 cggttgaata tcatattgac ggtgatttga ctgtctccgg cctttctcac cgttttgaat 9000
 ctttgcttac tcattactcc ggcattgcat ttaaaatata tgagggttct aaaaattttt 9060
 atccctgcgt tgaaattaag gcttcaccag caaaagtatt acagggatcat aatgtttttg 9120
 gtacaaccga tttagcttta tgctctgagg ctttattgct taattttgct aactctctgc 9180
 cttgcttgta cgatttattg gatggt 9206

<210> 31

<211> 8669

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> Vector de clonación M13KO7, secuencia completa

<400> 31

aacgctacta ctattagtag aattgatgcc accttttcag ctgcgcccc aatgaaaat 60

atagctaaac aggttattga ccatttgcga aatgtatcta atggtcaaac taaatctact 120

ES 2 445 152 T3

cgttcgcaga attggaatc aactggtaca tggaatgaaa cttccagaca ccgtacttta 180
 gttgcatatt taaaacatgt tgagctacag caccagattc agcaattaag ctctaagcca 240
 tccgcaaaaa tgacctctta taaaaggag caattaaagg tactctctaa tctgacctg 300
 ttggagtttg cttccggtct ggttcgcttt gaagctcgaa ttaaaacgag atatttgaag 360
 tctttcgggc tctctcttaa tctttttgat gcaatccgct ttgcttctga ctataatagt 420
 cagggtaaag acctgatttt tgatttatgg tcattctcgt tttctgaact gtttaaagca 480
 tttgaggggg attcaatgaa tatttatgac gattccgag tattggacgc tatccagtct 540
 aacatttta ctattacccc ctctggcaaa acttcttttg caaaagcctc tcgctatttt 600
 ggtttttatc gtcgtctggt aaacgagggg tatgatagtg ttgctcttac tatgcctcgt 660
 aattcctttt ggogttatgt atctgcatta gttgaatgtg gtattcctaa atctcaactg 720
 atgaatcttt ctacctgtaa taatgttgtt ccgtagttc gttttattaa cgtagatttt 780
 tcttcccaac gtcctgactg gtataatgag ccagttctta aaatcgcata aggtaattca 840
 caatgattaa agttgaaatt aaaccatctc aagccaatt tactactcgt tctggtgttt 900
 ctcgtcaggg caagccttat tcaactgaat agcagctttg ttacgttgat ttgggtaatg 960
 aatatccggt tctgtcaag attactcttg atgaaggtca gccagcctat gcgcctggtc 1020
 tgtacaccgt tcactgtcc tctttcaaag ttggtcagtt cggttccctt atgattgacc 1080
 gtctgcgct cgttccggct aagtaacatg gagcaggtcg cggatttcga cacaatttat 1140
 caggcgatga taaaaatctc cgttgtactt tgtttcgagc ttggtataat cgctgggggt 1200
 caaagatgag tgttttagtg tattctttcg cctctttcgt tttaggttg tgcttcgta 1260
 gtggcattac gtattttacc cgtttaatgg aaacttctc atgaaaaagt ctttagtcct 1320
 caaagcctct gtagccggtg ctaccctcgt tccgatgctg tctttcgtg ctgaggggtga 1380
 cgatcccgca aaagcggcct ttaactcctt gcaagcctca gcgaccgaat atacgggta 1440
 tgcgtgggag atggttggtg tcattgtcgg cgcaactatc ggtatcaagc tgtttaagaa 1500
 attcacctcg aaagcaagct gataaacgca tacaattaa ggctcctttt ggagcctttt 1560
 tttttggaga tttcaacgt gaaaaatta ttattcgcaa ttcctttagt tgttctttc 1620
 tattctcact ccgctgaaac tgttgaaagt tgtttagcaa aaccctatc agaaaattca 1680
 tttactaacg tctgaaaga cgacaaaact ttagatcgtt acgctaacta tgagggttgt 1740
 ctgtggaatg ctacagcgt ttagtttctg actggtgacg aaactcagtg ttacggtaca 1800
 tgggttctca ttgggcttgc tatccctgaa aatgaggggt gtggctctga ggggtggcgt 1860

ES 2 445 152 T3

tctgagggtg gcggttctga ggggtggcggg actaaacctc ctgagtacgg tgatacacct 1920
attccgggct atacttatat caaccctctc gacggcactt atccgcctgg tactgagcaa 1980
aaccocgcta atcctaatcc ttctcttgag gagtctcagc ctcttaatac tttcatgttt 2040
cagaataata ggttccgaaa taggcagggg gcattaactg tttatacggg cactgttact 2100
caaggcactg accccggtta aacttattac cagtacactc ctgtatcacc aaaagccatg 2160
tatgacgctt actggaacgg taaattcaga gactgacgct tccattctgg ctttaatgag 2220
gatccattcg tttgtgaata tcaaggcaa tcgtctgacc tgcccaacc tcctgtcaat 2280
gctgacggcg gctctggtgg tggttctggt ggcggctctg aggggtggtg ctctgagggt 2340
ggcggttctg aggggtggcg ctctgagga ggcggttccg gtggtggctc tggttccggt 2400
gattttgatt atgaaaagat ggcaaacgct aataagggg ctatgaccga aaatgccgat 2460
gaaaacgcbc tacagtctga cgctaaaggc aaacttgatt ctgtcgcctac tgattacggt 2520
gctgctatcg atggtttcat tggtgacgtt tccggccttg ctaatggtaa tggtgctact 2580
ggtgattttg ctggtcttaa tccccaaatg gctcaagtcg gtgacgggta taattcacct 2640
ttaatgaata atttccgtca atatttacct tccctccctc aatcggttga atgtcgcctc 2700
littgtctta gcgctggtaa accatattga ttttctattg attgtgacaa aataaactta 2760
ttccgtgggt tctttgcggt tcttttatat gttgccacct ttatgtatgt attttctacg 2820
tttgctaaca tactgcgtaa taaggagtct taatcatgcc agttcttttg ggtattccgt 2880
tattattgcg tttccctcgt ttccttctgg taactttggt cggctatctg cttacttttc 2940
ttaaaaaggg ctccggttaag atagctattg ctatttcatt gtttcttgct cttattattg 3000
ggcttaactc aattcttggt ggttatctct ctgatattag cgctcaatta ccctctgact 3060
ttgttcaggg tgttcagtta attctcccgct ctaatgcgct tccctgtttt tatgttattc 3120
tctctgtaa ggctgctatt ttcatttttg acgttaaaca aaaaatcggt tcttatttgg 3180
attgggataa ataatatggc tgtttatttt gtaactggca aattaggctc tggaaagacg 3240
ctcgttagcg ttggaagat tcaggataaa attgtagctg ggtgcaaaat agcaactaat 3300
cttgatttaa ggcttcaaaa cctcccgcaa gtcgggaggt tcgctaaaac gcctcgcggt 3360
cttagaatac cgataagcc ttctatatct gatttgcttg ctattgggcg cggtaatgat 3420
tcctacgatg aaaataaaaa cggcttgctt gttctcgatg agtgcggtac ttggtttaat 3480
accogttcct ggaatgataa ggaaagacag ccgattattg attggtttct acatgctcgt 3540
aaattaggat gggatattat ttttcttggt caggacttat ctattgttga taaacaggcg 3600
cgttctgcat tagctgaaca tgttgtttat tgtcgtcgtc tggacagaat tactttacct 3660

ES 2 445 152 T3

tttgtcggta ctttatattc tcttattact ggctcgaaaa tgccctctgcc taaattacat 3720
 gttggcggtg ttaaataatgg cgattctcaa ttaagcccta ctggtgagcg ttggctttat 3780
 actggttaaga atttgtataa cgcatatgat actaaacagg ctttttctag taattatgat 3840
 tccgggtgtt attcttattt aacgccttat ttatcacacg gtcggtattt caaaccatta 3900
 aatthaggtc agaagatgaa attaactaaa atatatttga aaaagttttc tcgctgttctt 3960
 tgtcttgcca ttggatttgc atcagcattt acatatagtt atataacca acctaagccg 4020
 gaggttaaaa aggtagtctc tcagacctat gattttgata aattcactat tgactcttct 4080
 cagcgtctta atctaagcta tcgctatggt ttcaaggatt ctaagggaaa attaattaat 4140
 agcgacgatt tacagaagca aggttattca ctcacatata ttgatttatg tactgtttcc 4200
 attaaaaaag gtaattcaaa tgaaattggt aaatgtaatt aattttgttt tcttgatggt 4260
 tgtttcatca tcttcttttg ctcaggtaat tgaaatgaat aattcgctc tcgctgattt 4320
 tgtaacttgg tattcaaagc aatcaggcga atccgttatt gtttctcccg atgtaaaagg 4380
 tactgttact gtatattcat ctgacgttaa acctgaaaat ctacgcaatt tctttatttc 4440
 tgttttacgt gctaataatt ttgatatggt tggttcaatt ccttcataa ttcagaagta 4500
 taatccaaac aatcaggatt atattgatga attgccatca tctgataatc aggaatatga 4560
 tgataattcc gctccttctg gtggtttctt tgttccgcaa aatgataatg ttactcaaac 4620
 ttttaaaatt aataacgttc gggcaaagga ttttaacga gttgtcgaat tgtttgtaaa 4680
 gtctaatact tctaaatcct caaatgtatt atctattgac ggctctaatac tattagttgt 4740
 tagtgcacct aaagatattt tagataacct tcctcaattc ctttctactg ttgatttgcc 4800
 aactgaccag atattgattg agggtttgat atttgaggtt cagcaagggtg atgctttaga 4860
 tttttcattt gctgctggct ctcagcgtgg cactgttgca ggcggtgta atactgaccg 4920
 cctcacctct gttttatctt ctgctgggtg ttcgttcggg atttttaatg gcgatgtttt 4980
 agggctatca gttcgcgcat taaagactaa tagccattca aaaatattgt ctgtgccacg 5040
 tattcttacg ctttcaggtc agaagggttc tatctctggt ggccagaatg tcccttttat 5100
 tactggtcgt gtgactgggtg aatctgcca tgtaataaat ccatttcaga cgattgagcg 5160
 tcaaaatgta ggtatttcca tgagcgtttt tctgttgca atggctggcg gtaatatgt 5220
 tctggatatt accagcaagg ccgatagttt gagttcttct actcaggcaa gtgatgttat 5280
 tactaatcaa agaagtattg ctacaacggt taatttgct gatggacaga ctcttttact 5340
 cgggtggcctc actgattata aaaacacttc tcaagattct ggcgtaccgt tctgtctaa 5400

ES 2 445 152 T3

aatcccttta atcggcctcc tgtttagctc ccgctctgat tccaacgagg aaagcacggt 5460
atacgtgctc gtcaaagcaa ccatagtacg cgcctgtag cggcgcatta agcgcggcgg 5520
gtgtggtggt tacgcgcagc gtgaccgcta cacttgccag cgcctagcg cccgctcctt 5580
tcgctttctt ccttctcttt ctcgccacgt tcgcccgtt tccccgtaa gctctaaatc 5640
gggggctccc tttagggttc cgatttagtg ctttacggca cctcgacccc aaaaaacttg 5700
atgtgggtga tggttcacgt agtgggcat cgcctgata gacggttttt cgcctttga 5760
cgttgaggtc cacgttcttt aatagtgga ctttgttcca aactggaaca aactcaacc 5820
ctatctcggg acggatcgt tcatgtggca ggagaaaaa ggctgcaccg gtgcgtcagc 5880
agaatatgtg atacaggata tattccgctt cctcgtcac tgactcgtc cgtcgtcgtc 5940
ttcgactcg ggcagcggaa atggcttacg aacggggcgg agatttctg gaagatgcca 6000
ggaagatact taacagggaa gtgagagggc cgcggcaaag cggtttttcc ataggctccg 6060
ccccctgac aagcatcacg aaatctgacg ctcaaatcag tgggtggcga acccgacagg 6120
actataaaga taccaggcgt tccccctgg cggctccctc gtgcgctctc ctgttctgc 6180
ctttcggttt accggtgtca ttccgctgtt atggccgctt ttgtctcatt ccacgcctga 6240
cactcagttc cgggtaggca gttcgtcca agctggactg tatgcacgaa cccccgttc 6300
agtccgaccg ctgcgcctta tccggtaact atcgtcttga gtccaaccg gaaagacatg 6360
caaaagcacc actggcagca gccactggta attgatttag aggagttagt cttgaagtca 6420
tgcgccggtt aaggctaac tgaaaggaca agtttgggtg actgcgctcc tccaagccag 6480
ttacctcgtt tcaagagatt ggtagctcag agaaccttcg aaaaaccgcc ctgcaaggcg 6540
gtttttcgt tttcagagca agagattacg cgcagaccaa aacgatctca agaagatcat 6600
cttattaagg ggtctgacgc tcagtggaac gaaaactcac gtttaaggat tttggtcatg 6660
agattatcaa aaaggatctt cacctagatc cttttaaatt aaaaatgaag ttttaaata 6720
atctaaagta tatatgagta aacttggctc gacagttacc aatgcttaat cagtgaggca 6780
cctatctcag cgatctgtct atttcgttca tccatagttg cctgactccc cgtcgtgtag 6840
ataactacga tacgggaggg cttaccatct ggccccagtg ctgcaatgat accgcgagac 6900
ccacgtcac cggctccaga tttatcagca ataaaccagc cagccgattc gagctcgccc 6960
cggggatcga ccagttgggt attttgaact tttgctttgc cacggaacgg tctgcgttgt 7020
cgggaagatg cgtgatctga tccttcaact cagcaaaagt tcgatttatt caacaaagcc 7080
gccgtccgt caagtcagcg taatgctctg ccagtgttac aaccaattaa ccaattctga 7140
ttagaaaaac tcatogagca tcaaatgaaa ctgcaattta ttcatatcag gattatcaat 7200

ES 2 445 152 T3

accatatttt tgaaaaagcc gtttctgtaa tgaaggagaa aactcaccga ggcagttcca 7260
 taggatggca agatcctggt atcgggtctgc gattccgact cgtccaacat caatacaacc 7320
 tattaatttc ccctcgtcaa aaataaggtt atcaagtgag aaatcaccat gagtgacgac 7380
 tgaatccggt gagaatggca aaagcttatg catttctttc cagacttggt caacaggcca 7440
 gccattacgc tcgcatcaa aatcactcgc atcaacaaaa ccgttattca ttcgtgattg 7500
 cgcctgagcg agacgaaata cgcgatcgcg gttaaaagga caattacaaa caggaatcga 7560
 atgcaaccgg cgcaggaaca ctgccagcgc atcaacaata ttttcacctg aatcaggata 7620
 ttcttctaata acctggaatg ctgttttccc ggggatcgcg gtggtgagta accatgcatc 7680
 atcaggagta cggataaaat gcttgatggt cggaagaggc ataaattccg tcagccagtt 7740
 tagtctgacc atctcatctg taacatcatt ggcaacgcta cctttgcoat gtttcagaaa 7800
 caactctggc gcatcgggct tcccatacaa tcgatagatt gtcgcacctg attgcccgac 7860
 attatcgcga gcccatttat acccatataa atcagcatcc atggttgaat ttaatcgcgg 7920
 cctcagcaaa gacgtttccc gttgaatatg gctcataaca ccccttgat tactgtttat 7980
 gtaagcagac agttttattg tcatgatga tatattttta tcttgtgcaa tgtaacatca 8040
 gagattttga gacacaacgt ggctttcccc cccccccct gcaggtctcg ggctattctt 8100
 ttgatttata agggattttg ccgatttcgg cctattgggt aaaaaatgag ctgatttaac 8160
 aaaaatttaa cgcgaatttt aacaaaatat taacgtttac aatttaaata tttgcttata 8220
 caatcttctt gtttttgggg cttttctgat tatcaaccgg ggtacatatg attgacatgc 8280
 tagttttacg attaccgttc atcgattctc ttgtttgctc cagactctca ggcaatgacc 8340
 tgatagcctt tgtagacctc tcaaaaatag ctaccctctc cggcatgaat ttatcagcta 8400
 gaacggttga atatcatatt gatggtgatt tgactgtctc cggcctttct cacccttttg 8460
 aatctttacc tacacattac tcaggcattg catttaaaat atatgagggt tctaaaaatt 8520
 tttatccttg cgttgaataa aaggcttctc ccgcaaaagt attacagggt cataatgttt 8580
 ttggtacaac cgatttagct ttatgctctg aggctttatt gcttaatttt gctaattctt 8640
 tgccttgccct gtatgattta ttggatggt 8669

<210> 32

<211> 8669

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> Fago colaborador resistente a interferencia de VCSM13, genoma completo.

<400> 32

ES 2 445 152 T3

tgcctgactc cccgtcgtgt agataactac gatacgggag ggcttaccat ctggccccag	60
tgctgcaatg ataccgcgag acccacgctc accggctcca gatttatcag caataaacca	120
gccagccgat tcgagctcgc ccggggatcg accagttggt gattttgaac ttttgctttg	180
ccacggaacg gtctcgtgtg tcgggaagat gcgtgatctg atccttcaac tcagcaaaag	240
ttcgatttat tcaacaaagc cgccgtcccc tcaagtcagc gtaatgctct gccagtgtta	300
caaccaatta accaattctg attagaaaa ctcacgcagc atcaaatgaa actgcaattt	360
attcatatca ggattatcaa taccatatth ttgaaaaagc cgtttctgta atgaaggaga	420
aaactcaccg aggcagttcc ataggatggc aagatcctgg tateggtctg cgattccgac	480
tcgtccaaca tcaatacaac ctattaatth cccctcgtca aaaataaggt tatcaagtga	540
gaaatcacca tgagtgcgca ctgaatccgg tgagaatggc aaaagcttat gcatttcttt	600
ccagacttgt tcaacaggcc agccattacg ctcgtcatca aaatcactcg catcaaccaa	660
accgttatth attcgtgatt gcgcctgagc gagacgaaat acgcgatcgc tgttaaaagg	720
acaattacaa acaggaatcg aatgcaaccg gcgcaggaac actgccagcg catcaacaat	780
atthtcacct gaatcaggat attcttctaa tacctggaat gctgtthtcc cggggatcgc	840
agtggtgagt aaccatgcat catcaggagt acggataaaa tgcttgatgg tcggaagagg	900
cataaattcc gtcagccagt ttagtctgac catctcatct gtaacatcat tggcaacgct	960
acthtgcca tgtthcagaa acaactctgg cgcacggggc thccataca atcgatagat	1020
tgtcgcacct gattgcccga cattatcgcg agcccattta tacccatata aatcagcatc	1080
catgttgga a tthaatcgcg gcctcgagca agacgthtcc cgttgaatat ggctcataac	1140
ccccctgta thactgttht tgtaagcaga cagththatt gthcatgatg ataththth	1200
atcttgthca atgtaacatc agagaththg aaacacaacg tggctthtcc ccccccccc	1260
ctgcaggtht cgggctatth ththgathth taagggathth tgccgathth ggctaththg	1320
thaaaaatg agctgathth acaaaaatth aacgcgaath thaaaaat athaacgthth	1380
acaaththaa ththtgthth tacaaththt ctgthththg ggctththtth aththcaacc	1440
ggggtacata tgattgacat gctagththt cgaththcgt tcatcgathth tctgtththg	1500
thcagactct caggcaatga cctgatagcc ththgtagacc ththcaaaaat agththcctc	1560
thcggcatga aththacagc tagaacgthth gaaththcatg thgatgththg ththgactgth	1620
thcggcttht thcaccctth thgaaththt cctacacath actcaggcat thcatththaa	1680
aththtgagg gthththaaaa ththththctct thcgtththaa thaaaggctth thccgcaaaa	1740

ES 2 445 152 T3

gtattacagg gtcataatgt ttttggtaga accgatttag ctttatgctc tgaggcttta 1800
 ttgcttaatt ttgctaattc tttgccttgc ctgtatgatt tattggatgt taacgctact 1860
 actattagta gaattgatgc caccttttca gctcgcgccc caaatgaaa tatagctaaa 1920
 caggttattg accatttgcg aaatgtatct aatgggtcaa ctaaactctac tcgttcgcag 1980
 aattgggaat caactgttac atggaatgaa acttccagac accgtacttt agttgcatat 2040
 ttaaaacatg ttgagctaca gcaccagatt cagcaattaa gctctaagcc atccgcaaaa 2100
 atgacctctt atcaaaagga gcaattaaag gtactctcta atcctgacct gttggagttt 2160
 gcttccggtc tggttcgctt tgaagctcga attaaaacgc gatatttgaa gtctttcggg 2220
 cttcctctta atctttttga tgcaatccgc tttgcttctg actataatag tcagggtaaa 2280
 gacctgattt ttgatttatg gtcattctcg ttttctgaac tgtttaaagc atttgagggg 2340
 gattcaatga atatttatga cgattccgca gtattggacg ctatccagtc taaacatttt 2400
 actattaacc cctctggcaa aacttctttt gcaaaagcct ctgctatctt tggtttttat 2460
 cgctgctggg taaacgaggg ttatgatagt gttgctctta ctatgcctcg taattccttt 2520
 tggcgttatg tatctgcatt agttgaaatg ggtattccta aatctcaact gatgaaatctt 2580
 tctacctgta ataatgttgt tccgttagtt cgttttatta acgtagattt ttcttcccaa 2640
 cgctcctgact ggtataatga gccagttctt aaaatcgcat aaggtaattc acaatgatta 2700
 aagttgaaat taaaccatct caagcccaat ttactactcg ttctgggtgtt tctcgtcagg 2760
 gcaagcctta ttcactgaat gagcagcttt gttacgttga tttgggtaat gaatatccgg 2820
 ttcttgtaaa gattactctt gatgaaggtc agccagccta tgcgcctggg ctgtacaccg 2880
 ttcactctgtc ctctttcaaa gttggtcagt tcggttccct tatgattgac cgtctgcgcc 2940
 tcgttccggc taagtaacat ggagcaggtc gcggatttcg acacaattta tcaggcgatg 3000
 atacaaatct ccgttgact ttgtttcgcg cttgggtataa tcgctggggg tcaaagatga 3060
 gtgttttagt gtattctttc gcctctttcg ttttaggttg gtgccttcgt agtggcatta 3120
 cgtattttac ccgtttaatg gaaacttctt catgaaaaag tctttagtcc tcaaagcctc 3180
 tgtagccgtt gctaccctcg ttccgatgct gtctttcgtc gctgagggtg acgatcccgc 3240
 aaaagcggcc tttactccc tgcaagcctc agcgaccgaa tatatcggtt atgctggtggc 3300
 gatggttggt gtcattgtcg gcgcaactat cggtatcaag ctgtttaaga aattcacctc 3360
 gaaagcaagc tgataaacgg atacaattaa aggctccttt tggagccttt ttttttgag 3420
 attttcaacg tgaaaaaatt attattcgca attcctttag ttgttccttt ctattctcac 3480

ES 2 445 152 T3

tccgctgaaa ctgttgaaag ttgtttagca aaaccccata cagaaaattc atttactaac 3540
gtctggaaag acgacaaaac tttagatcgt tacgctaact atgagggctg tctgtggaat 3600
gctacaggcg ttgtagtttg tactggtgac gaaactcagt gttacggtac atgggttcct 3660
attgggcttg ctatccoctga aaatgagggt ggtggctctg aggggtggcg ttctgagggt 3720
ggcggttctg aggggtggcg tactaaacct cctgagtaag gtgatacacc tattccgggc 3780
tatacttata tcaacctctc cgacggcact tatccgcctg gtactgagca aaaccccgct 3840
aatcctaate cttctcttga ggagtctcag cctcttaata ctttcatggt tcagaataat 3900
aggttccgaa ataggcaggg ggcattaact gtttatacgg gcaactgttac tcaaggcact 3960
gaccccgta aaacttatta ccagtacact cctgtatcat caaaagccat gtatgacgct 4020
tactggaacg gtaaattcag agactgcgct ttccattctg gctttaatga ggatccattc 4080
gtttgtgaat atcaaggcca atcgtctgac ctgcctcaac ctctgtcaa tgctggcggc 4140
ggctctggtg gtggttctgg tggcggctct gaggggtggtg gctctgaggg tggcggttct 4200
gaggggtggcg gctctgaggg aggcggttcc ggtggtggct ctggttccgg tgattttgat 4260
tatgaaaaga tggcaaacgc taataagggg gctatgaccg aaaatgccga tgaaaacgcg 4320
ctacagtctg acgctaaagg caaacttgat tctgtcgcta ctgattacgg tgctgctatc 4380
gatggtttca ttggtgacgt ttccggcctt gctaattgga atggtgctac tgggtgatttt 4440
gctggctcta attcccaaat ggctcaagtc ggtgacggtg ataattcacc tttaatgaat 4500
aatttccgtc aatatttacc ttccctccct caatcggttg aatgtcgccc ttttgtcttt 4560
ggcgtggtg aaccatatga attttctatt gattgtgaca aaataaactt attccgtggt 4620
gtctttgctg ttcttttata tgttgccacc tttatgtatg tattttctac gtttgctaac 4680
atactgcgta ataaggagtc ttaatcatgc cagtctcttt gggtattccg ttattattgc 4740
gtttcctcgg ttcccttctg gtaactttgt tcggctatct gcttactttt cttaaaaagg 4800
gcttcggtaa gatagctatt gctatttcat tgtttcttgc tcttattatt gggcttaact 4860
caattcttgt ggttatctc tctgatatta gcgctcaatt accctctgac tttgttcagg 4920
gtgttcagtt aattctccc tctaattgoc ttccctggtt ttatgttatt ctctctgtaa 4980
aggctgctat tttcattttt gacgttaaac aaaaaatcgt ttcttatttg gattgggata 5040
aataatatgg ctgtttatth tgtaactggc aaattaggct ctggaaagac gctcgttagc 5100
gttgtaaga ttcaggataa aattgtagct gggtgcaaaa tagcaactaa tcttgattta 5160
aggcttcaaa acctcccga agtcgggagg ttcgctaaaa cgctcgcgt tcttagaata 5220
ccggataagc cttctatate tgatttgctt gctattgggc gcggtaatga ttccacgat 5280

ES 2 445 152 T3

gaaaataaaa acggcttgct tgttctcgat gagtgcggta cttggtttaa taccggttct 5340
 tggaatgata aggaaagaca gccgattatt gattggtttc tacatgctcg taaattagga 5400
 tgggatatta ttttcttgt tcaggactta tctattgttg ataaacaggc gcgttctgca 5460
 ttagctgaac atgttgttta ttgtcgtcgt ctggacagaa ttactttacc ttttgcgggt 5520
 actttatatt ctcttattac tggctcgaaa atgcctctgc ctaaattaca tgttggcggt 5580
 gttaaatatg gcgattctca attaaagcct actgttgagc gttggcttta tactggtaag 5640
 aatttgata acgcatatga tactaaacag gctttttcta gtaattatga ttccggtggt 5700
 tattcttatt taacgcotta tttatcacac ggctcggatt tcaaaccatt aaatttaggt 5760
 cagaagatga aattaactaa aatatatttg aaaaagtttt ctgcggttct ttgtcttgcg 5820
 attgatttg catcagcatt tacatatagt tatataaacc aacctaaagcc ggaggttaa 5880
 aaggtagtct ctccagccta tgattttgat aaattcacta ttgactcttc tcagcgtctt 5940
 aatctaagct atcgtatgt tttcaaggat tctaaggaa aattaattaa tagcgacgat 6000
 ttacagaagc aaggttattc actcacatat attgatttat gtactgtttc cattaaaaaa 6060
 ggtaattcaa atgaaattgt taaatgtaat taattttggt ttcttgatgt ttgtttcatc 6120
 atcttctttt gctcaggtaa ttgaaatgaa taattcgcct ctgcgcgatt ttgtaacttg 6180
 gtattcaaag caatcaggcg aatccgttat tgtttctccc gatgtaaaag gtactgttac 6240
 tgtatattca tctgacgta aacctgaaaa tctacgcaat ttctttattt ctgttttacg 6300
 tgcaataaat tttgatatgg taggttctaa cccttccatt attcagaagt ataatccaaa 6360
 caatcaggat tatattgatg aattgccatc atctgataat caggaatatg atgataattc 6420
 cgctccttct ggtggtttct ttgttccgca aatgataat gttactcaa cttttaaaat 6480
 taataacggt cgggcaaagg atttaatacg agttgtcgaa ttgtttgtaa agtctaatac 6540
 ttctaaatcc tcaaagtat tatctattga cggctcta atctattagt ttagtgctcc 6600
 taaagatatt ttagataacc ttctcaatt cctttcaact gttgatttgc caactgacca 6660
 gatattgatt gagggtttga tatttgaggt tcagcaaggt gatgcttag attttctatt 6720
 tgctgctggc tctcagcgtg gcactgttgc aggcgggtgt aatactgacc gctcaacctc 6780
 tgttttatct tctgctgggt gttcgttcgg tattttta atggcgatggt tagggctatc 6840
 agttcgcgca ttaaagacta atagccattc aaaaatattg tctgtgccac gtattcttac 6900
 gctttcaggt cagaagggtt ctatctctgt tggccagaat gtccctttta ttactggtcg 6960
 tgtgactggt gaatctgcca atgtaataa tccatttcag acgattgagc gtcaaaatgt 7020

ES 2 445 152 T3

aggtatttcc atgagcggtt ttctgttgc aatggctggc ggtaatattg ttctggatat 7080
 taccagcaag gccgatagtt tgagttcttc tactcaggca agtgatgta ttactaatca 7140
 aagaagtatt gctacaacgg ttaatttgcg tgatggacag actcttttac tcggtggcct 7200
 cactgattat aaaaacactt ctcaggattc tggcgtaccg ttctgtcta aaatcccttt 7260
 aatcggcctc ctgttttagct cccgctctga ttctaacgag gaaagcacgt tatacgtgct 7320
 cgtcaaagca accatagtac gcgccctgta gcggcgctt aagcgcggcg ggtgtggtgg 7380
 ttacgcgcag cgtgaccgct acacttgcca gcgccttagc gcccgctcct ttcgctttct 7440
 tcccttcctt tctcgccacg ttcgccggct ttccccgtca agctctaaat cgggggctcc 7500
 ctttagggtt ccgatttagt gctttacggc acctcgacc caaaaaactt gatttgggtg 7560
 atggttcacg tagtgggcca tcgccctgat agacggtttt tcgccctttg acgttggagt 7620
 ccacgttctt taatagtga ctcttgttcc aaactggaac aacactcaac cctatctcgg 7680
 gacggatcgc ttcattgtggc aggagaaaaa aggtcgcacc ggtgcgtcag cagaatatgt 7740
 gatacaggat atattccgct tcctcgctca ctgactcgct acgctcggtc gttcgactgc 7800
 ggcgagcggg aatggccttac gaacggggcg gagatttctt ggaagatgcc aggaagatac 7860
 ttaacagggg aqtgagaggg ccgcggaaca gccgttttcc cataggtccc gccccctga 7920
 caagcatcac gaaatctgac gctcaaatca gtggtggcga aaccgcacag gactataaag 7980
 ataccaggcg tttccccctg gcggtccct cgtgcgctct cctgttccctg cctttcggtt 8040
 taccggtgtc attccgctgt tatggccgcg tttgtctcat tccacgcctg acactcagtt 8100
 ccgggtaggc agttcgctcc aagctggact gtatgcacga accccccgtt cagtccgacc 8160
 gctgcgcctt atccggtaac tatcgtcttg agtccaacc ggaaagacat gcaaaagcac 8220
 cactggcagc agccactggt aattgattta gaggagttag tcttgaagtc atgcgccggt 8280
 taaggctaaa ctgaaaggac aagttttggt gactgcgctc ctccaagcca gttacctcgg 8340
 ttcaaagagt tggtagctca gagaacctc gaaaaaccgc cctgcaaggc ggttttttcg 8400
 ttttcagagc aagagattac gcgcagacca aaacgatctc aagaagatca tcttattaag 8460
 gggctctgacg ctcagtggaa cgaaaactca cgtaagggg ttttggctcat gagattatca 8520
 aaaaggatct tcacctagat ccttttaaat taaaaatgaa gttttaaatc aatctaaagt 8580
 atatatgagt aaacttggtc tgacagttac caatgcttaa tcagtgaggc acctatctca 8640
 gcgatctgtc tatttcgttc atccatagt 8669

<210> 33

<211> 22

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> secuencia señal

<400> 33

Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala

1 5 10 15

Ala Gln Pro Ala Met Ala

20

10

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un genoma de fago o un fagémido que comprende un ácido nucleico que codifica una proteína de fusión que comprende la proteína de la cubierta menor de fago filamentosos pVII, en el que la proteína de fusión no comprende una secuencia señal N terminal.
- 10 2. El genoma de fago o fagémido de la reivindicación 1, en el que la proteína de fusión pVII comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en pos. 1-33, 2-33, 3-33, 4-33 y 5-33 de SEQ ID NO:1 (MEQVADFDTIYQAMIQISVVLFCFALGIIAGGQR).
- 15 3. El genoma de fago o fagémido de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el péptido exógeno de la proteína de fusión pVII está fusionado directamente al extremo N terminal de la secuencia pVII.
- 20 4. El genoma de fago o fagémido de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el péptido exógeno de la proteína de fusión pVII se selecciona del grupo que consiste en Avitag (SEQ ID NO:4), marca FLAG (SEQ ID NO:9), marca HIS (SEQ ID NO:12), marca HAT, marca HA, marca c-Myc, marca Strep, marca V5, anticuerpo o fragmento del mismo, receptor de linfocitos T o fragmento del mismo, MHC clase I y II, anquirina, IgNAR o fragmento del mismo, fibronectina o fragmento de la misma, dominio Z de proteína A, CTLA4 o fragmento del mismo, ImmE7 y GFP y otros fluoróforos codificados por genes biológicos.
- 25 5. El genoma de fago o fagémido de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el péptido exógeno de la proteína de fusión pVII es un miembro de colección.
- 30 6. Un fago filamentosos que comprende el genoma de fago o fagémido de cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
- 35 7. El fago filamentosos de la reivindicación 6, que comprende además un gen que codifica wt pVII y/o la proteína wt pVII.
- 40 8. El fago filamentosos de la reivindicación 6, en el que el fago no comprende un gen que codifica wt pVII y/o la proteína wt pVII.
9. El fago filamentosos de cualquiera de las reivindicaciones 6-8, que comprende además una proteína de fusión pIII o a una proteína de fusión pVIII.
10. Una colección de fagos filamentosos como se describe en cualquiera de las reivindicaciones 6-9 que presenta péptidos exógenos como fusiones para pIII, pVII o pVIII.
11. La colección de la reivindicación 10, en la que los péptidos se presentan de forma simultánea en pVII y pIII o bien pVIII, o ambas.
12. Un sistema de presentación en fagos que comprende un fagémido y un fago colaborador, en el que el fago colaborador comprende el ácido nucleico de la reivindicación 1.
- 45 13. Un sistema de presentación en fagos que comprende un fagémido y un fago colaborador, en el que el fagémido comprende el ácido nucleico de la reivindicación 1.
14. Un kit que comprende el sistema de presentación en fagos de la reivindicación 12 y/o 13.

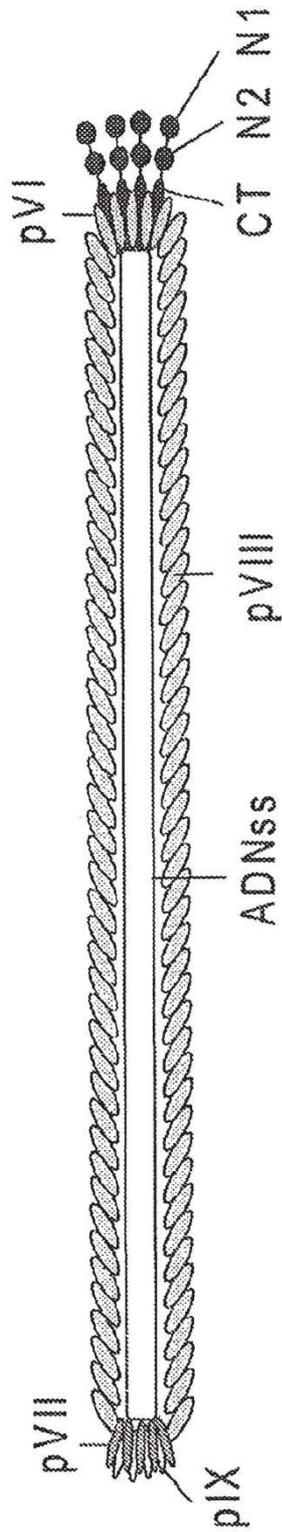
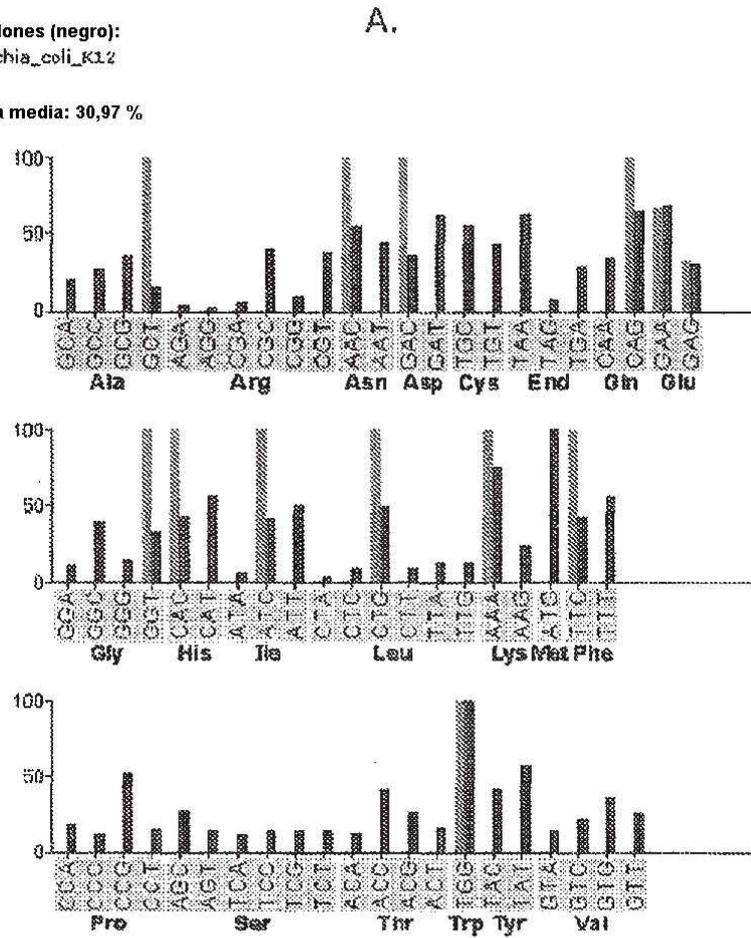


Fig. 1

Tabla de codones (negro):
Escherichia_coli_K12

Diferencia media: 30,97 %



B.

ADN (org): GGT CTG AAC GAC ATC TTC GAG GCT CAG AAA ATC GAA TGG CAC GAA
 ADN (negro): GG CTG AAC GA ATC TTC GA GC CAG AAA AT GA TGG CA GAA
 aa: G L N D I F E A Q K I E W H E

C.

ADN: GAC TAC AAG GAC GAT GAC GAC AAG
 aa: D Y K D D D D K

D.

DNA: CAT CAC CAT CAC CAT CAC
 aa: H H H H H H

Fig. 2

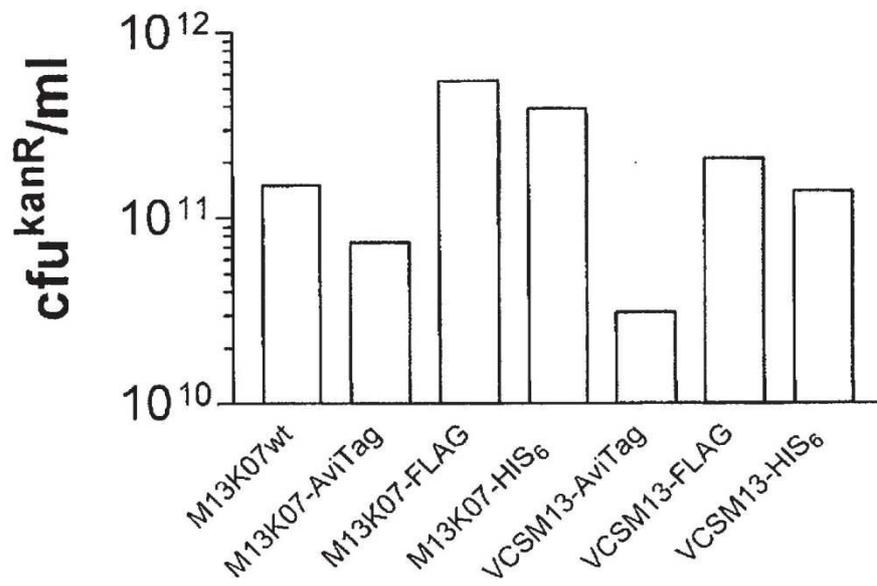


Fig. 3

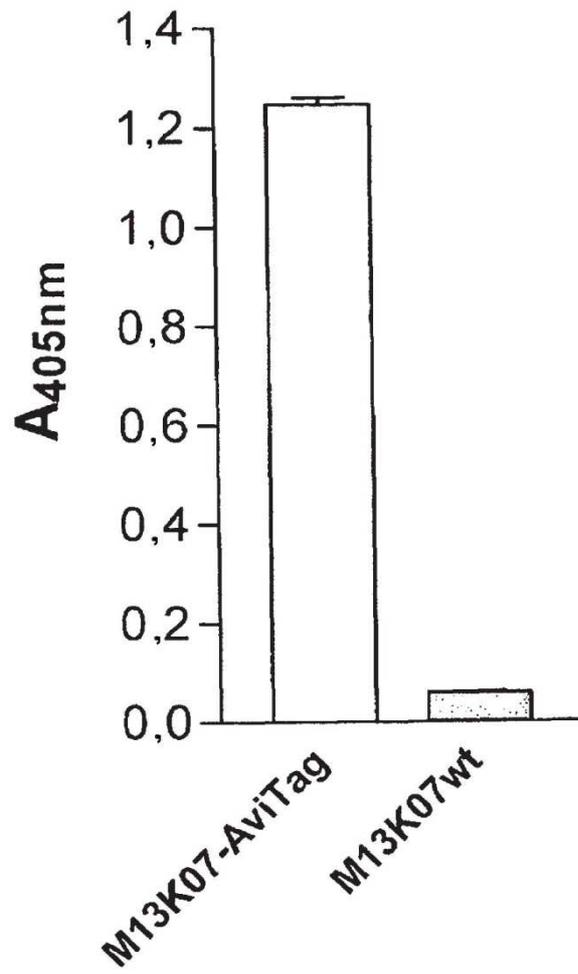


Fig. 4

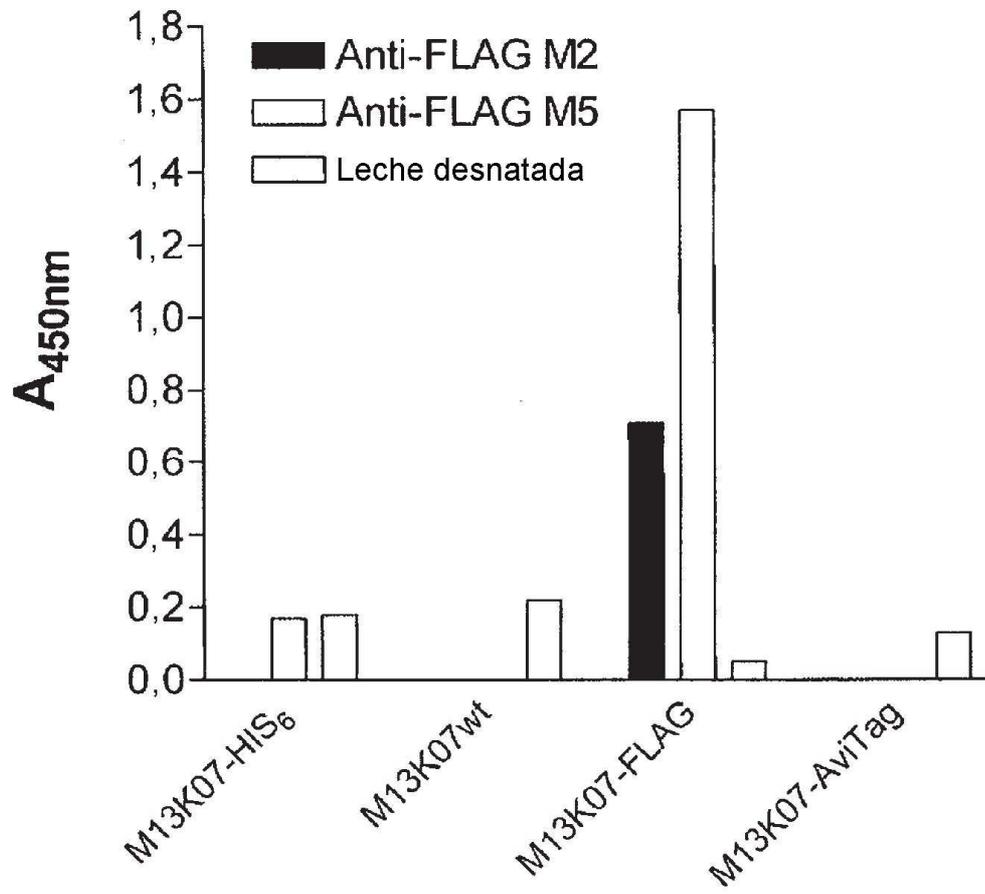


Fig. 5

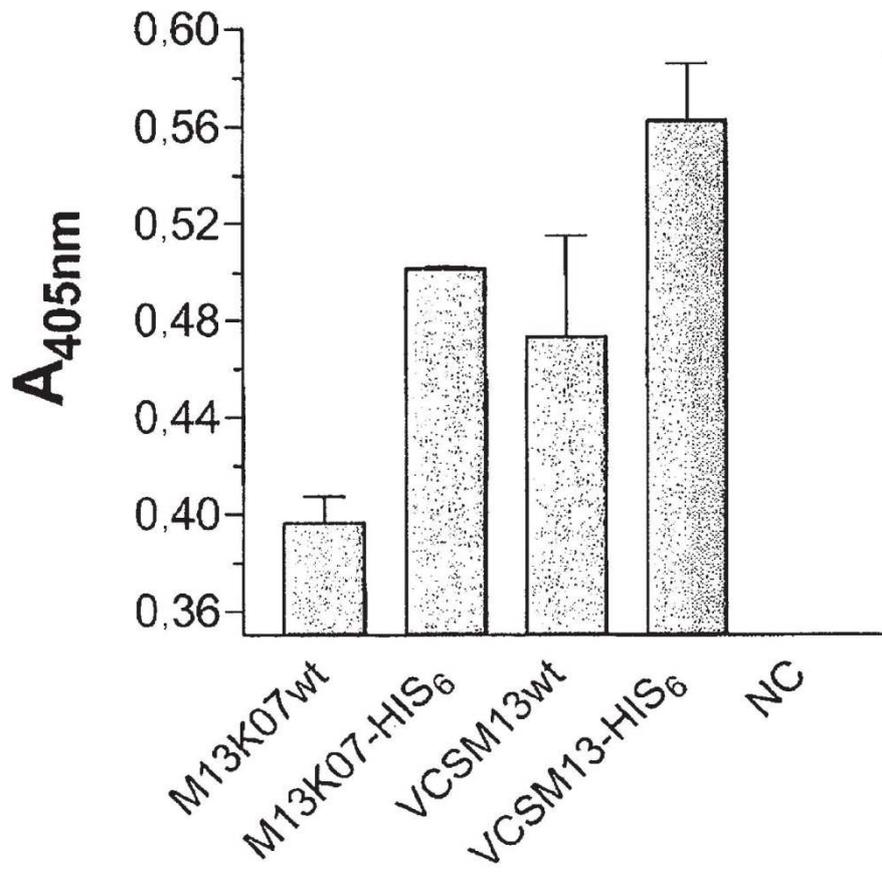


Fig. 6

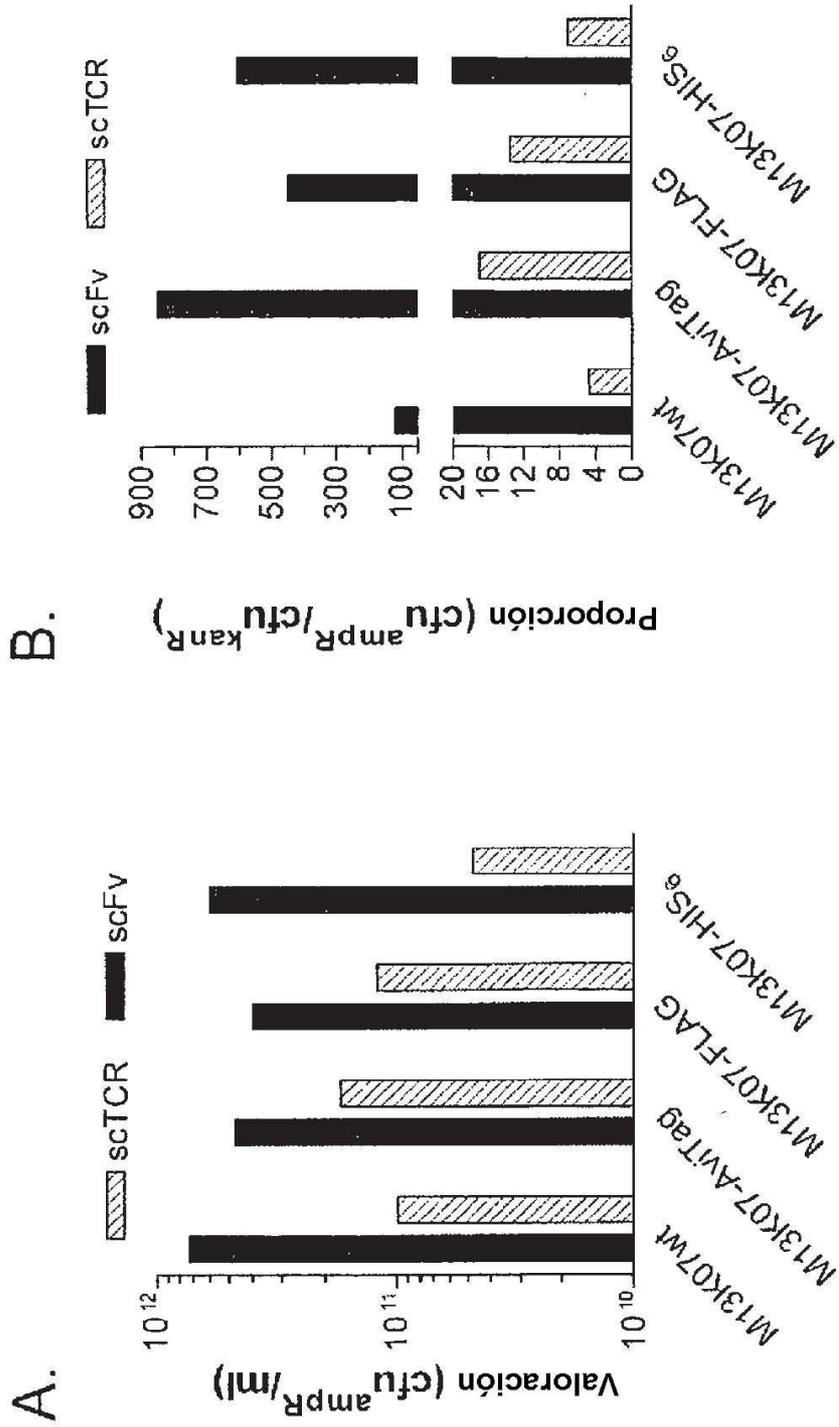


Fig. 7

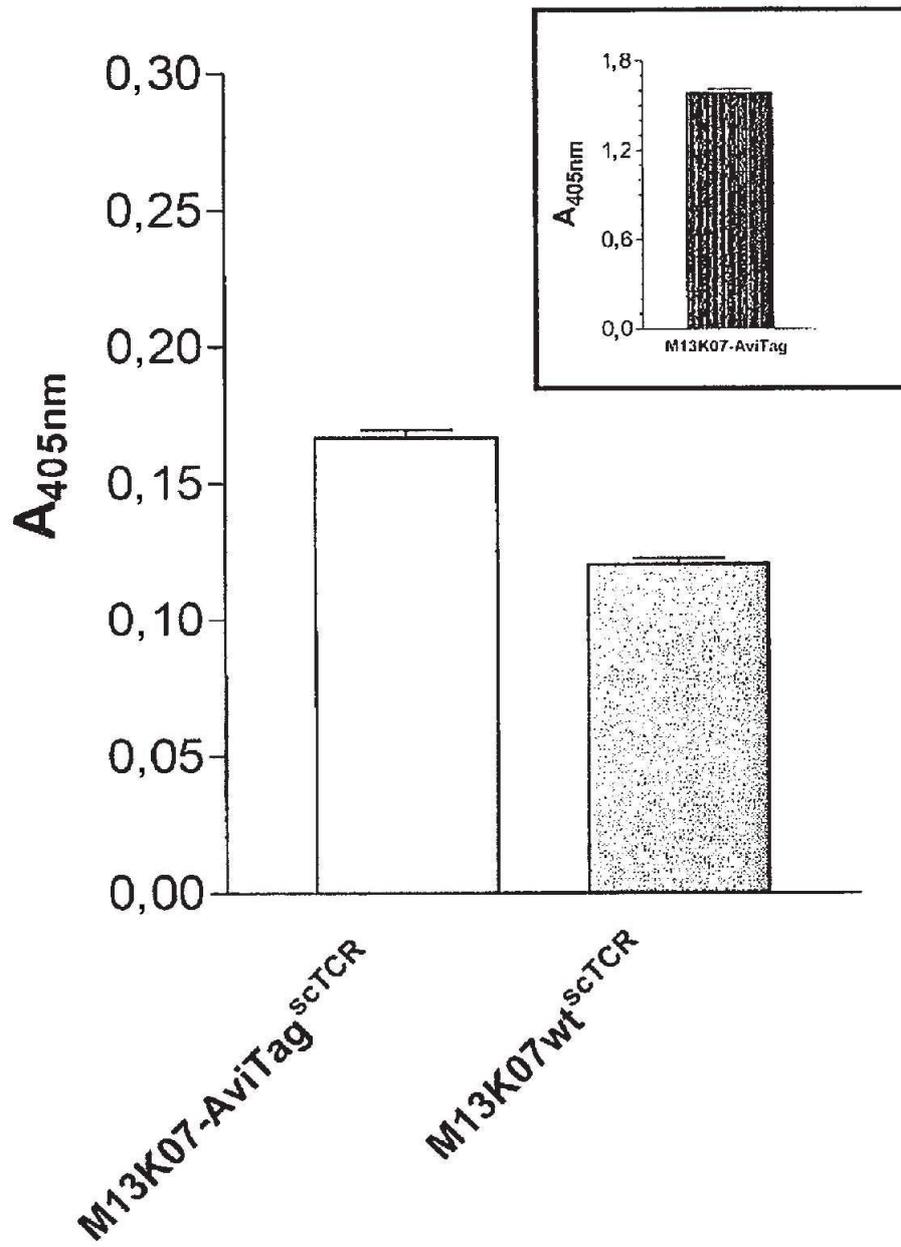


Fig. 8

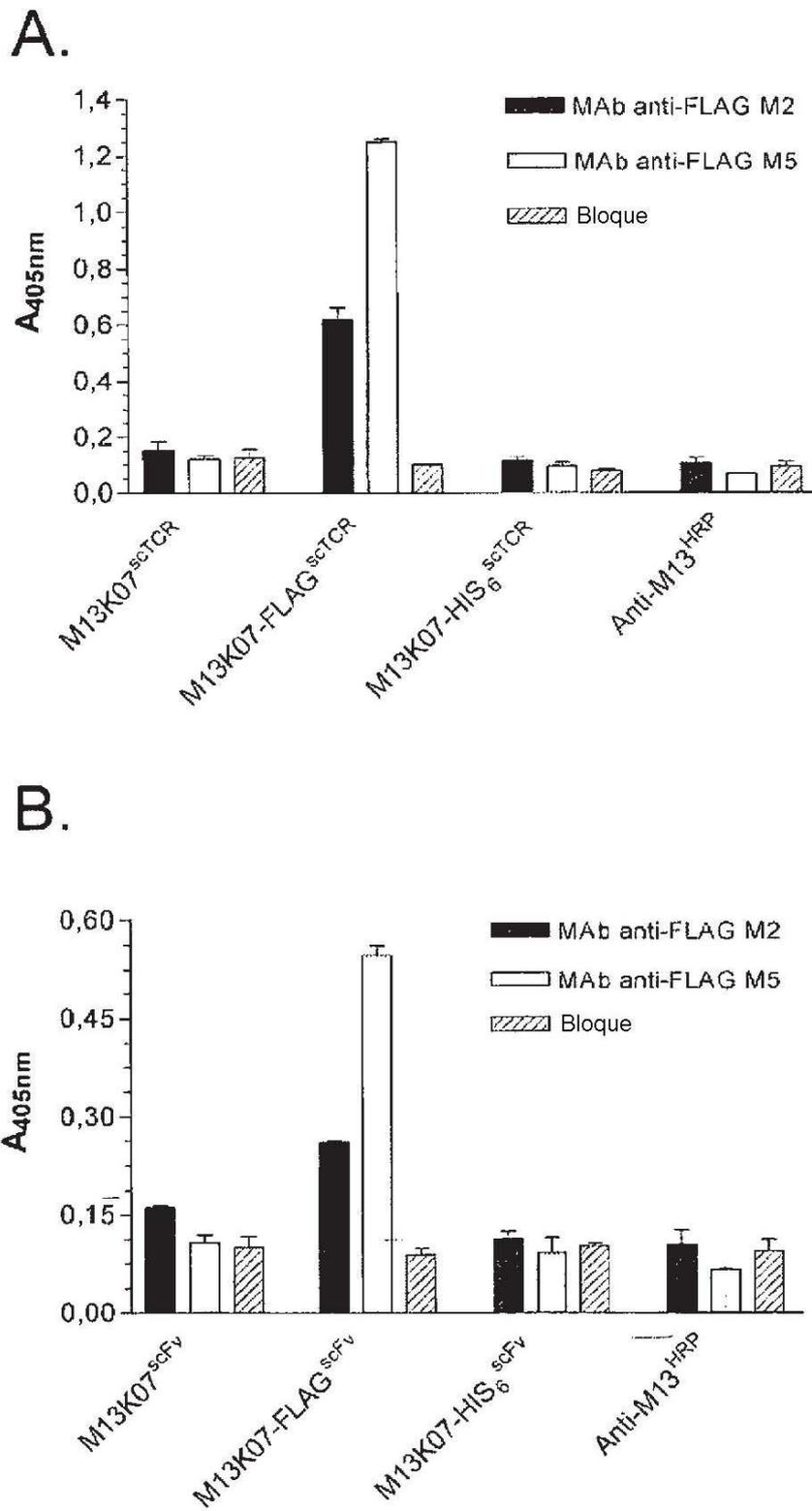


Fig. 9

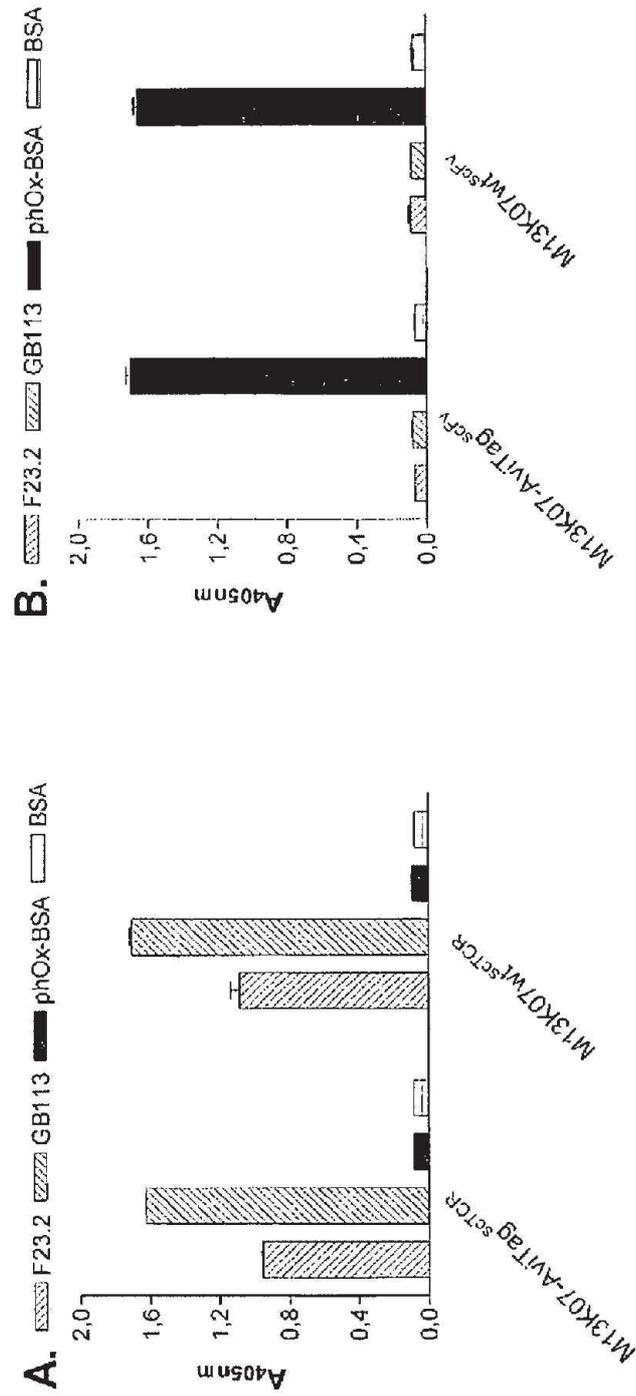


Fig. 10

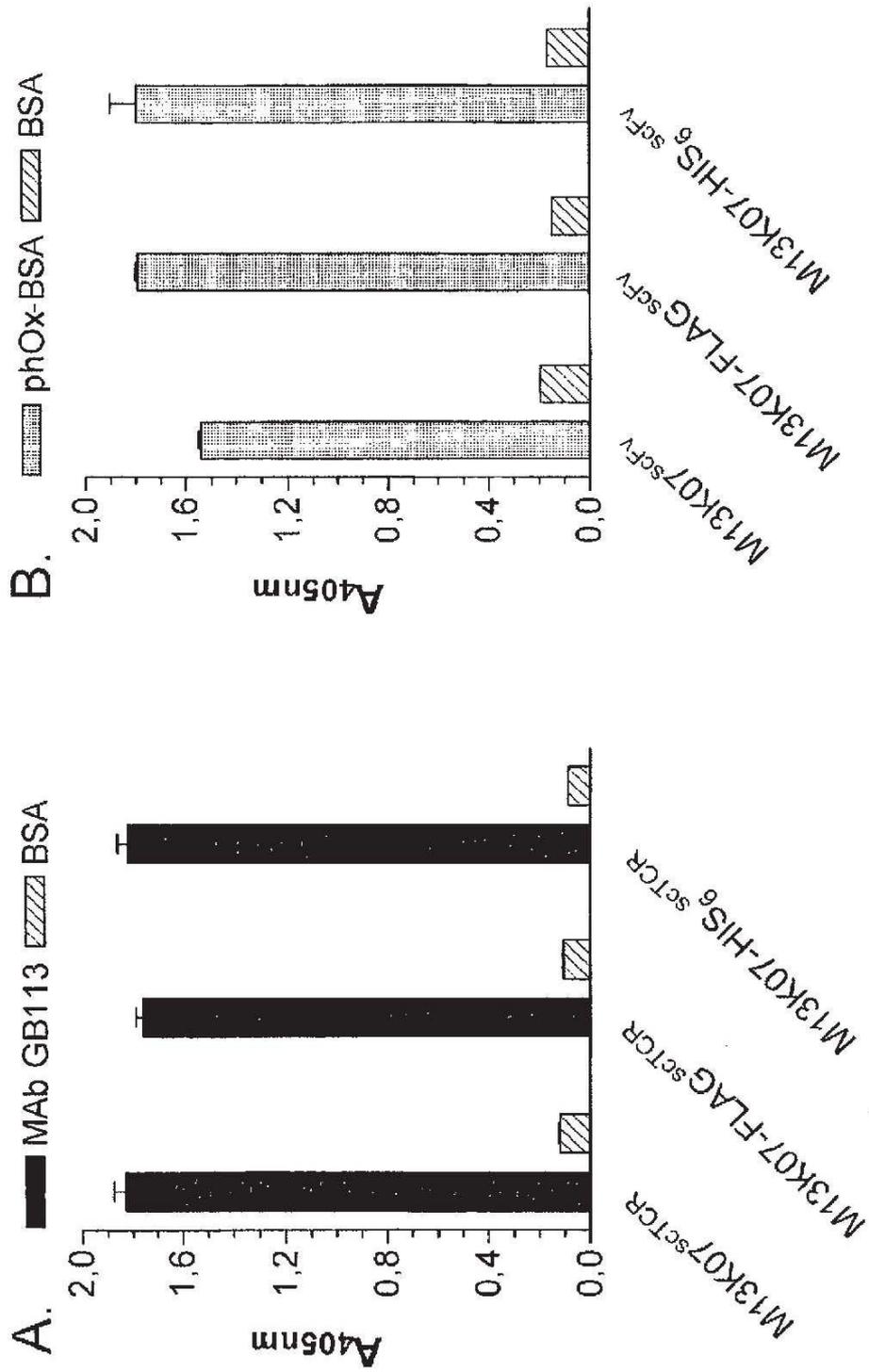


Fig. 11

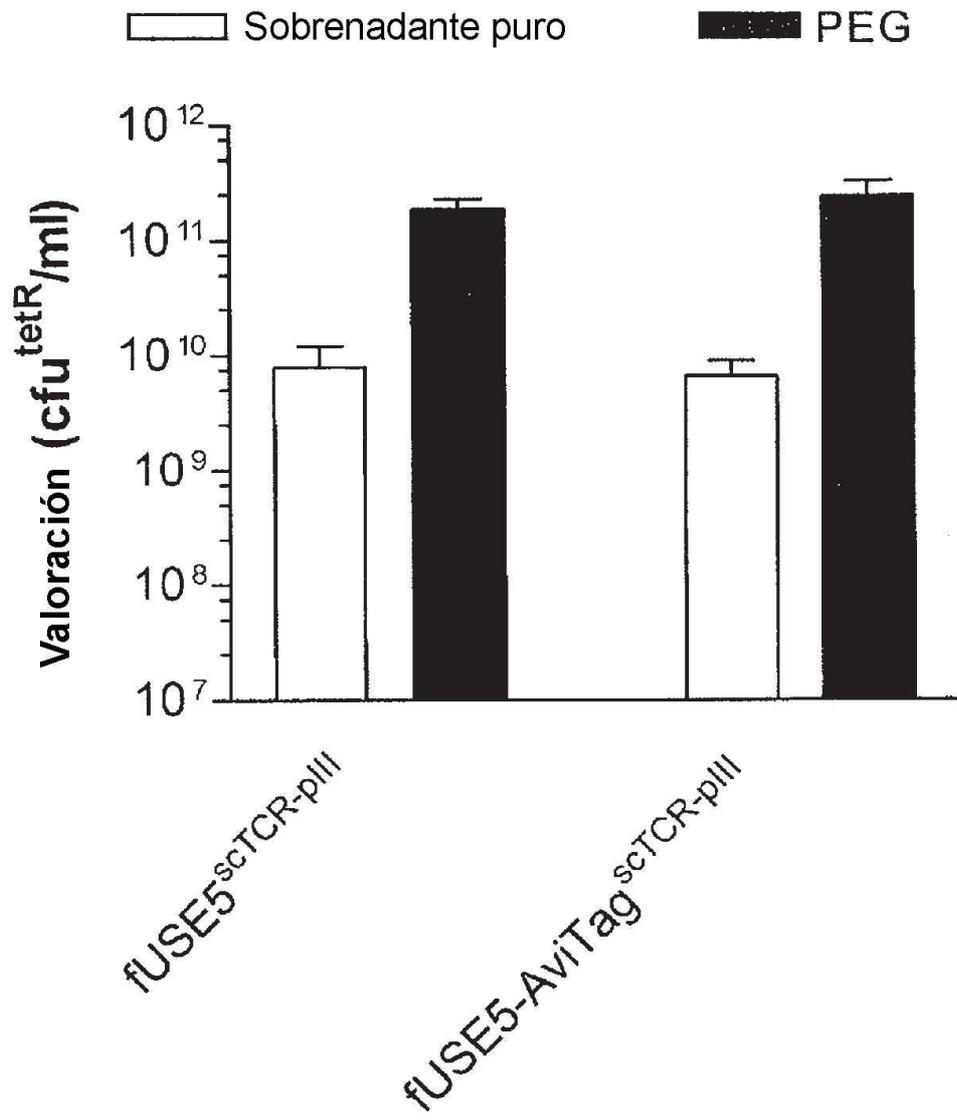


Fig. 12

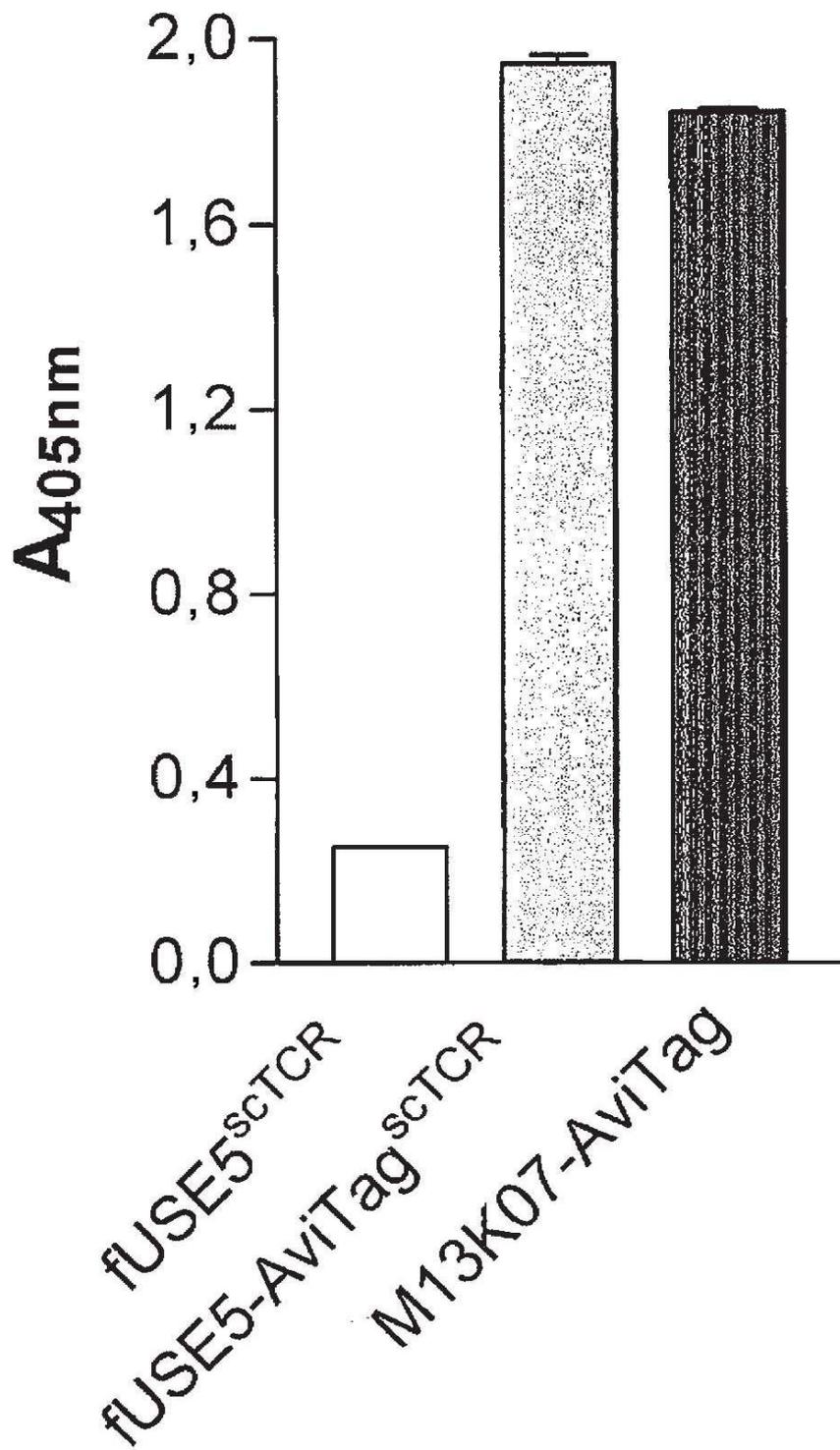


Fig. 13

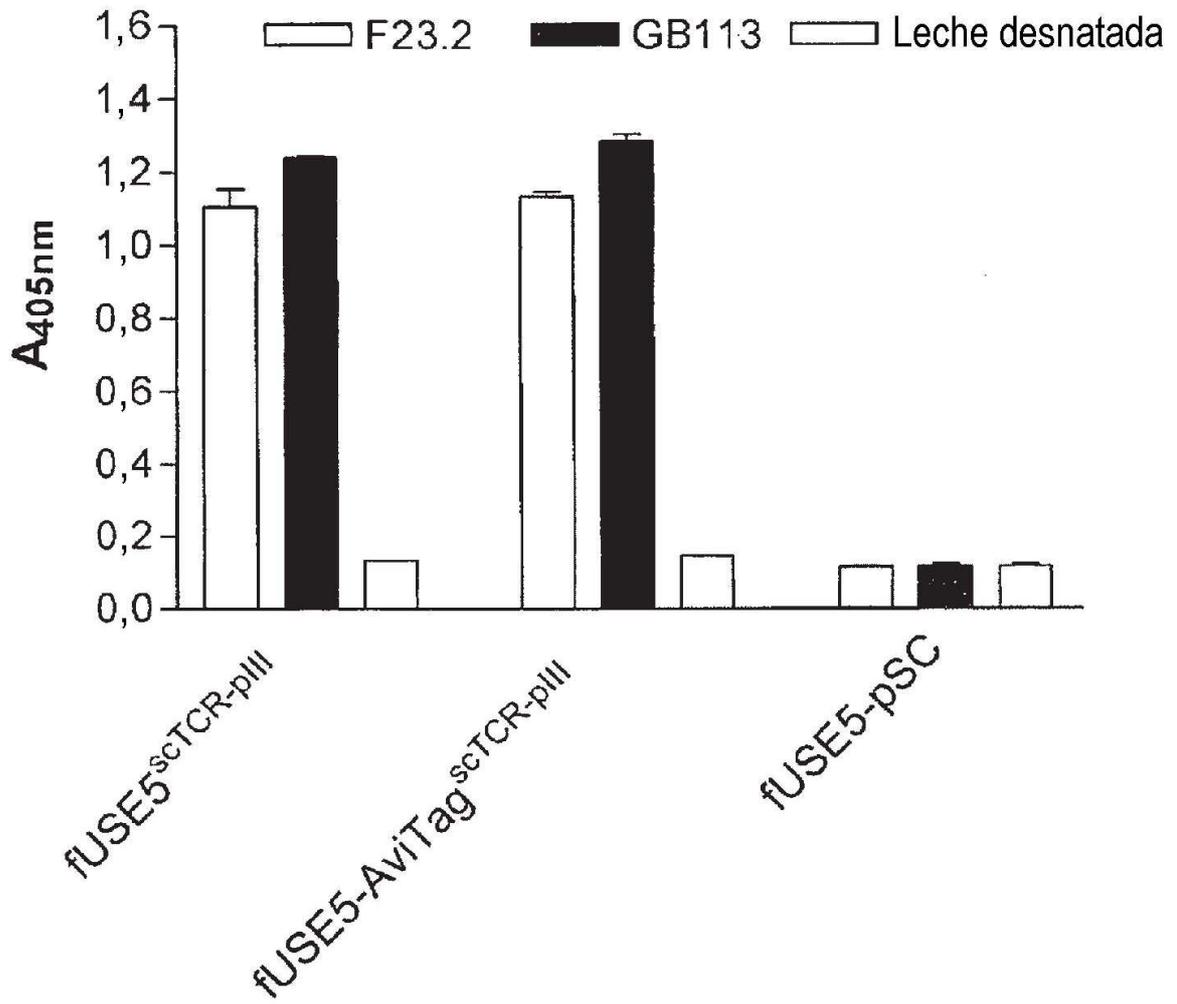


Fig. 14

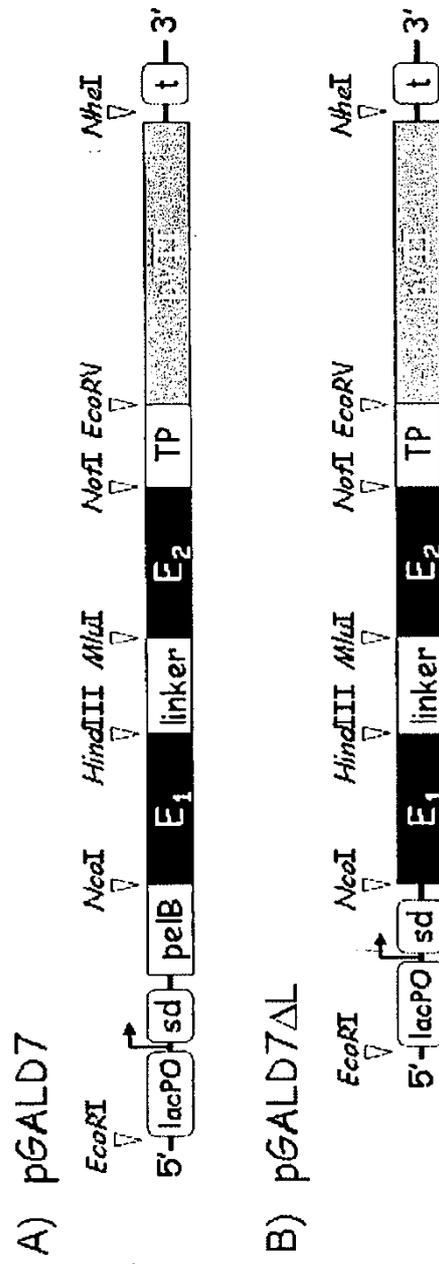


Fig. 15

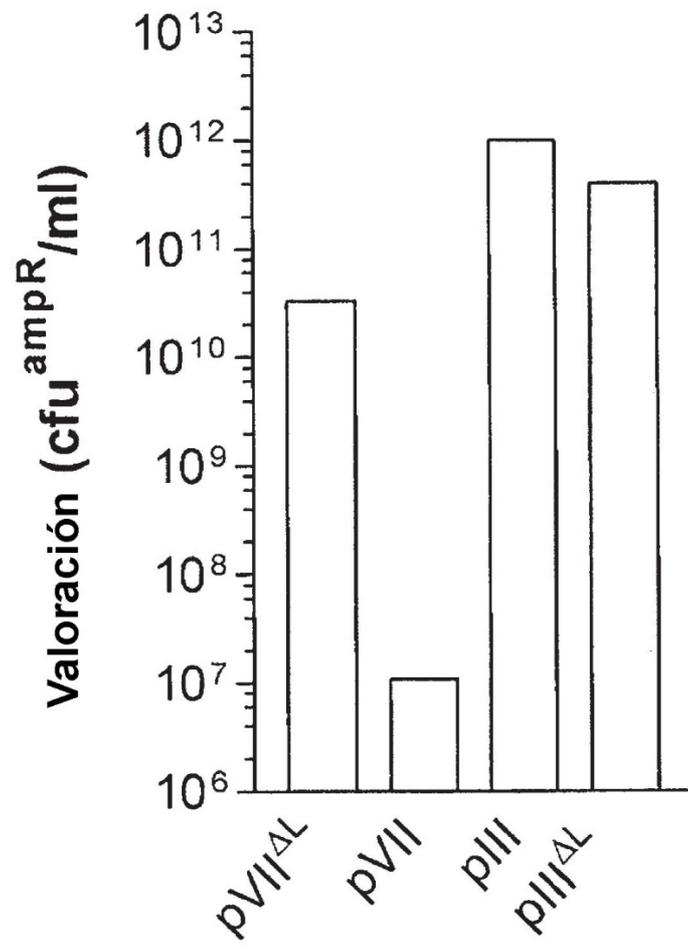


Fig. 16

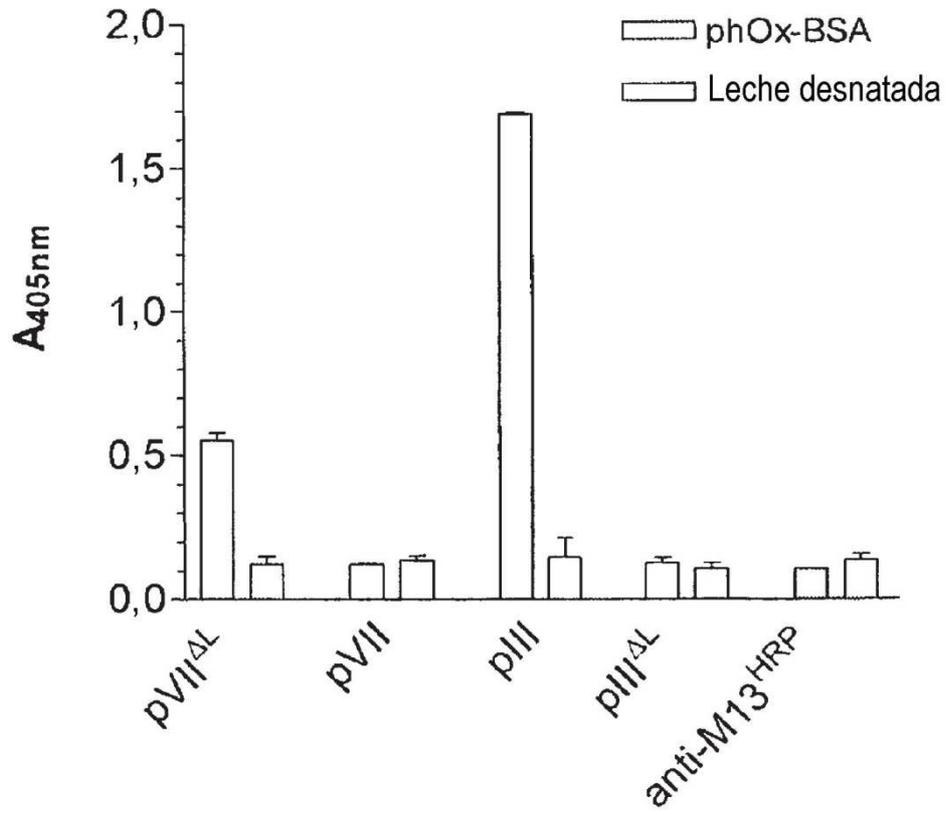


Fig. 17

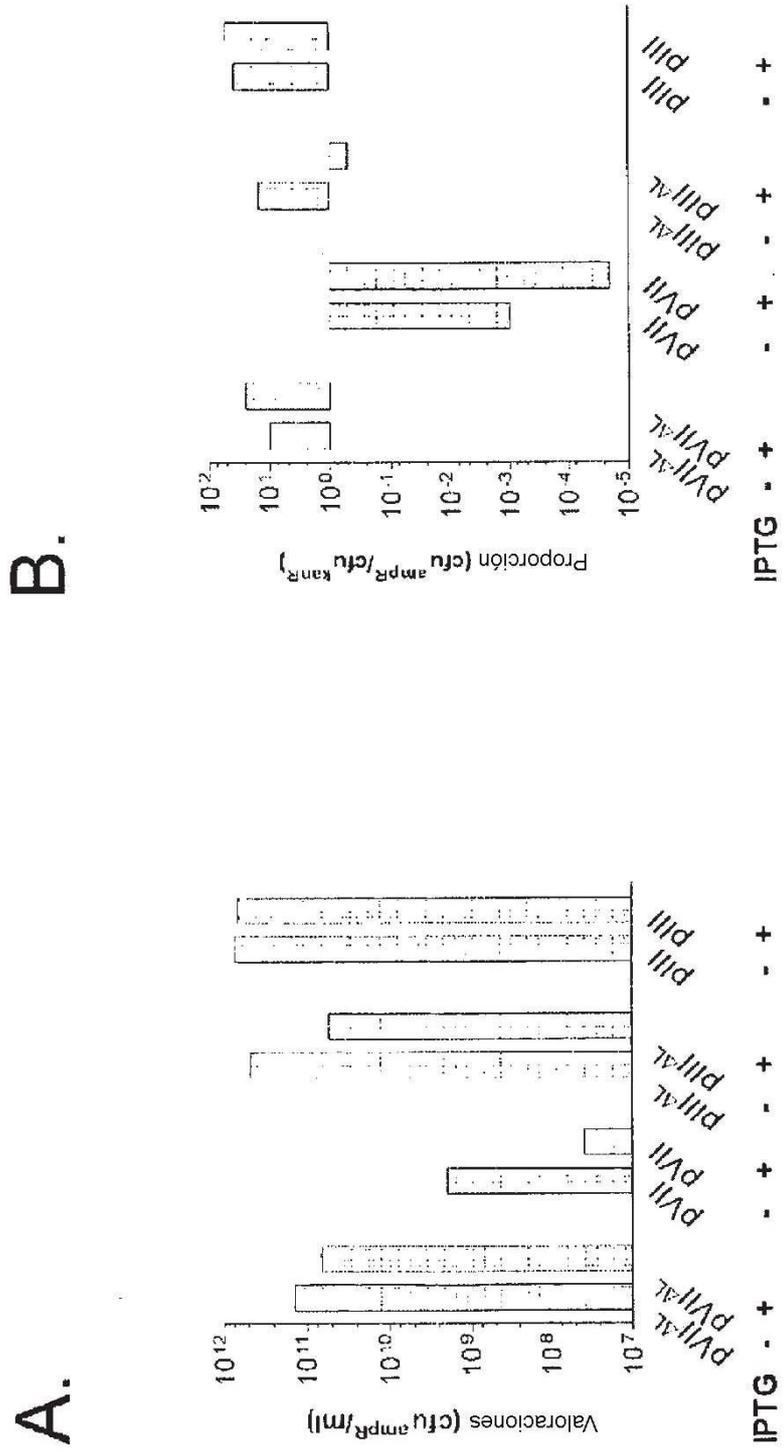


Fig. 18

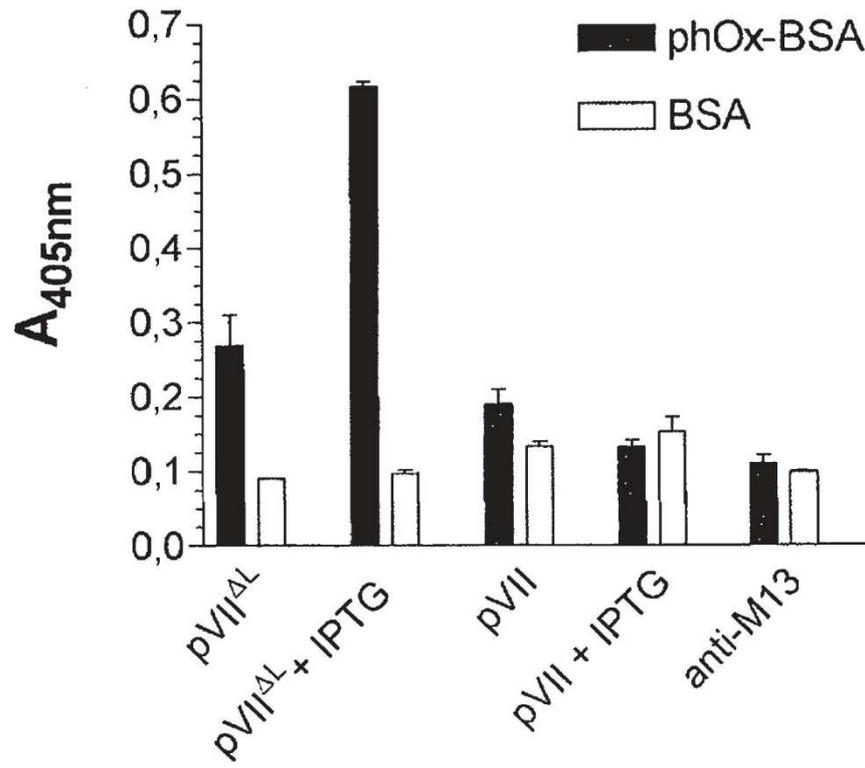


Fig. 19

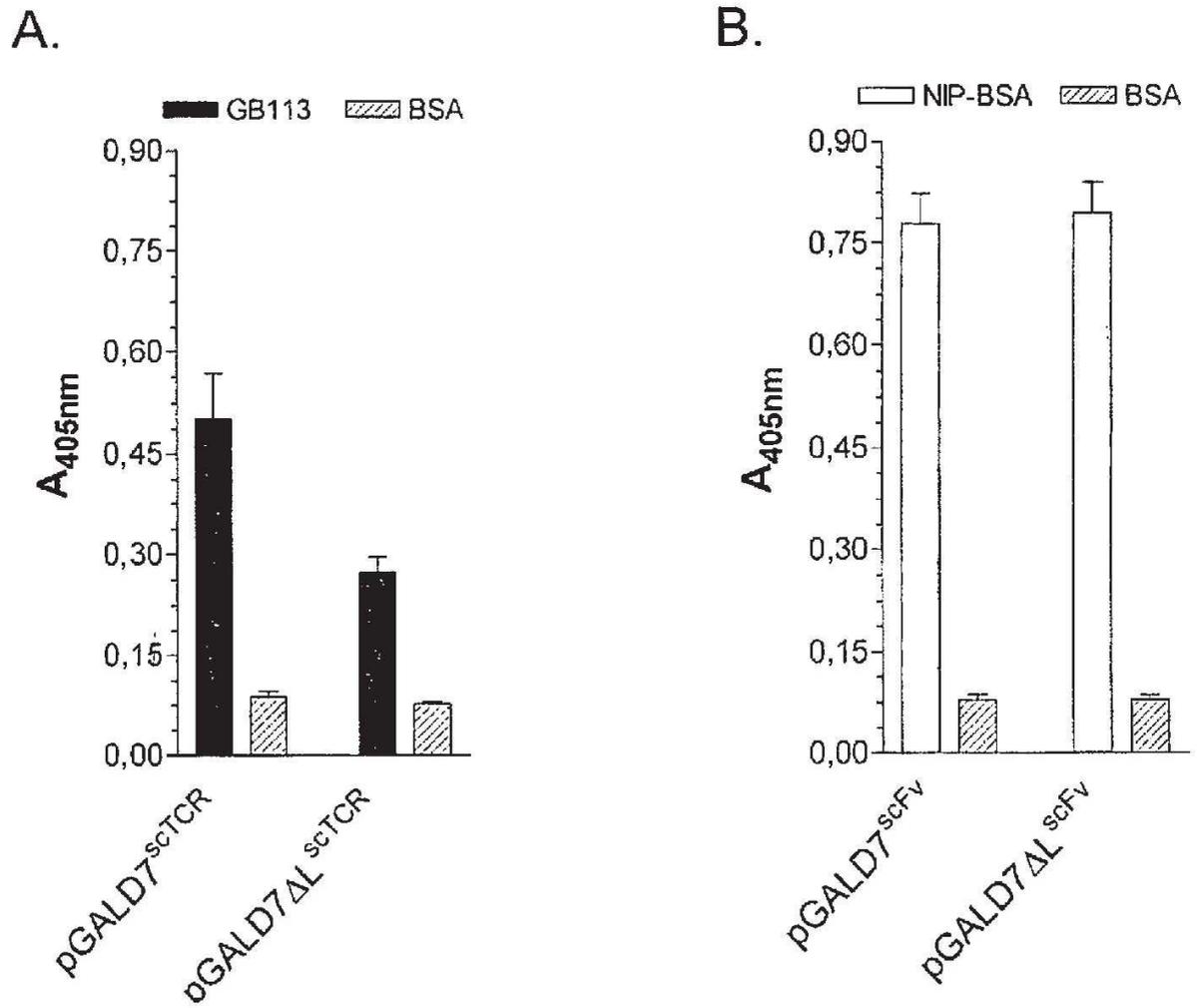


Fig. 20

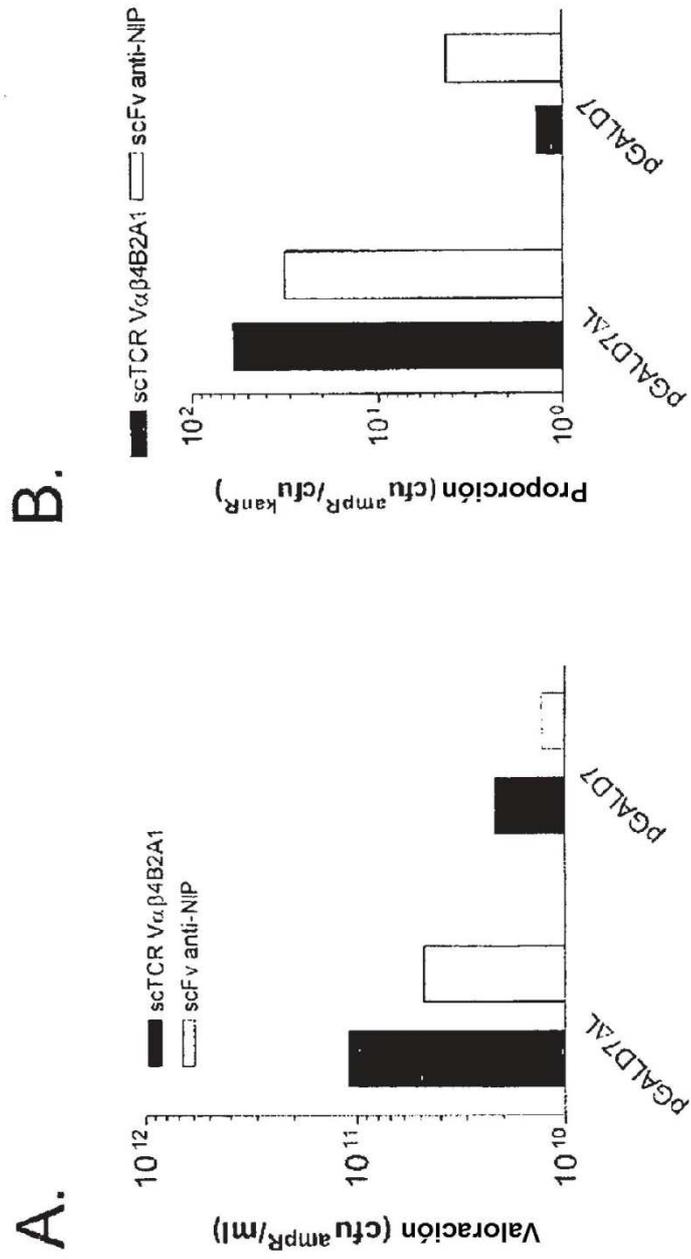


Fig. 21

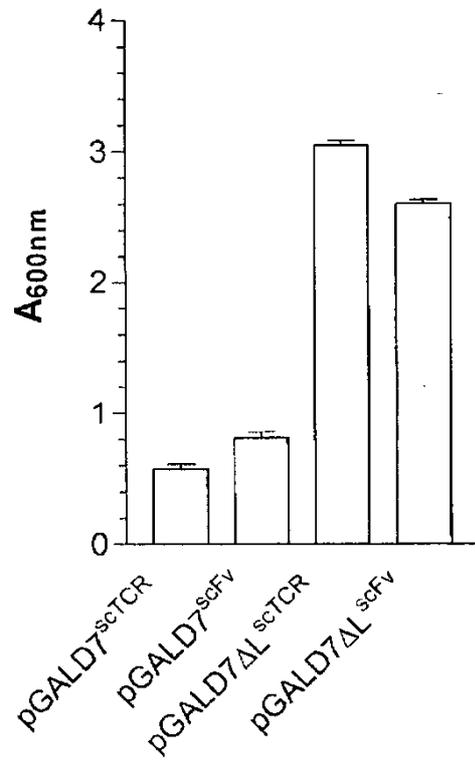


Fig. 22